**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA**

KELLY DA SILVA

**Ansiedade, Memória Espacial e Memória de Reconhecimento após o
consumo de Etanol em ratos**

Ribeirão Preto

2015

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA**

KELLY DA SILVA

Versão corrigida

**Ansiedade, Memória Espacial e Memória de Reconhecimento após o
consumo de Etanol em ratos**

**Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Psicobiologia

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria
Padovan**

Ribeirão Preto-SP

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Versão corrigida

Catálogo da Publicação
Serviço de documentação da FFCLRP-USP
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo

Silva, Kelly da
Ansiedade, Memória Espacial e Memória de Reconhecimento após o
consumo de Etanol em ratos / Kelly da Silva; Orientadora Cláudia Maria
Padovan. – Ribeirão Preto, 2015.
111 f.: il.

Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, 2015.

1. Etanol 2. Memória Espacial 3. Memória de Reconhecimento
4. Ansiedade

XXX XXX.XXX

Nome: SILVA, Kelly

Título: Ansiedade, Memória Espacial e Memória de Reconhecimento após o consumo de Etanol em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Adalberto e Luzinete, pelos ensinamentos valiosos e por ter me dado a oportunidade de trilhar este caminho acadêmico que a eles foi negado pelas circunstâncias de uma vida Severina. Por Terem a maior garra e fé que pude presenciar nesta vida.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por ter me dado a vida e com ela um mundo de oportunidades;
Ao meu pai, por ser tão guerreiro e doce ao mesmo tempo. Agradeço por sua
presença constante em minha vida, mesmo após sua partida.*

A minha mãe, por ser a minha fortaleza e o meu bem maior;

*Ao meu esposo, Vitor Almeida, por ser meu amor e melhor amigo. Por sua
presença na minha vida ser música e poesia. Por cada acorde e melodia que
harmonizam nosso lar.*

*À minha nova família, Rosa Maria Gomes Vicentine de Almeida, Ariberto Silva de
Almeida, Augusto Vicentine de Almeida e Beatriz Vicentine de Almeida, por sempre
me acolher.*

*À Prof^a. Dr^a Cláudia Maria Padovan pelos ensinamentos e pela amizade
motivadora, por permitir o estreitamento de laços que hoje me permite chamá-la de
amiga.*

*Agradeço a Patrícia Zuanetti, por estar sempre perto, por nutrir esta amizade que
é tão importante para mim.*

*Agradeço à Daiane Zuanetti, por me auxiliar com as estatísticas e com este
universo dos números.*

*Sou grata à Patrícia Zuanetti, Jaqueline Gentil, Letícia Bizari e Letícia Brunelli
Wolf pela amizade e carinho sempre certo.*

Aos meus irmãos, Gil, Ari, Inês Cristiane e Jacqueline, por fazerem parte de mim;

*Aos meus cunhados Alexandre, Shirley, Aninha e Celso, pela amizade e
incentivo.*

*Aos meus sobrinhos, Adriana, Anderson, Willian, Rafael, Wellington, Lucas,
Juliana, Débora, Ana Luísa, Camila, Fabiana, Sofia, Wesley e Bianca, pelas
brincadeiras e aventuras durante as férias.*

*Aos meus avós Alcindo Lopes de Almeida, Maria Gomes da Silva Almeida e
Apparecida Gomes Vicentine, por compartilharem a sabedoria que os anos lhes
trouxeram.*

*À técnica de biotério Thalita Prado pela imensa contribuição na realização deste
trabalho;*

*Ao professor Sebastião de Sousa, por gentilmente ceder os equipamentos para o
teste de Memória Espacial.*

*Meus sinceros agradecimentos à Renata Vicentini, por atuar de forma tão
competente.*

Agradeço também ao técnico Igor, pelas ajudas com os softwares e manutenção de computadores;

Aos meus amigos do Laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão, Diego e Jean, pelos auxílios nos experimentos e pelo trabalho em equipe.

Agradeço à Laís Bueno e ao professor Bruno Spinosa De Martinis, por me ceder o equipamento e me ensinar tão pacientemente a técnica de etanolemia utilizada nesta tese.

Aos discentes do curso de Fonoaudiologia da Universidade Federal de Sergipe, por me fazer, a cada dia, ter mais certeza de minha escolha profissional.

Ao meu novo e grande amigo Rodrigo Dornelas, por dividir a experiência de conciliar a docência com a finalização de uma tese.

Aos professores do Departamento de Fonoaudiologia, Carla César, Raphaela Granzotti, Daniele Domenis, Rodrigo Dornelas, Ariane Pellicani, Aline Cabral e Roxane Alencar, por transcenderem o sentido de equipe de trabalho e serem ótimos amigos.

Ao professor Carlos Tirapelli e sua equipe, pelas colaborações e happy hours;

Agradeço à Natália Almeida pelos auxílios nas coletas de sangue;

À Prof^a. Dr^a Marisa Fukuda, pelos ensinamentos e carinho;

Ao Prof. José Fernando Colafêmina, meu orientador de iniciação científica, por ser meu grande Mestre acadêmico.

À CAPES pelo apoio financeiro;

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Universidade Federal de Sergipe, pelo incentivo financeiro com a bolsa Thesis.

***“Mente Clara
Figura Viva
Muito forte e sensitiva
Nos faz sorrir, nos faz chorar
Nos faz viver ao acordar
Na esperança e na certeza
De encontrar sempre acesa esta luz
Este amor, esta força
Que beleza!!!
Pensar é querer saber
Pra dizer ou não dizer
Fazer ou não fazer
Resumindo: tudo isto é maravilhoso
Vivendo e aprendendo
Correndo e querendo chegar lá
Juntos, sempre juntos
Na certeza de encontrar
Sempre”
(Hermeto Pascoal)***

SILVA, K. **Ansiedade, Memória Espacial e Memória de Reconhecimento após o consumo de Etanol em ratos**. 2015. 111 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015.

Introdução: O etilismo é uma doença crônica e progressiva que tem um impacto significativo nos valores sociais e econômicos da sociedade. A interrupção abrupta do consumo crônico de etanol pode levar à Síndrome de Abstinência alcoólica (SAA) com repercussões na saúde do indivíduo. Atualmente, muita atenção também tem sido dada ao consumo espaçado de etanol em doses elevadas, caracterizado como “*binge*”. Dentre as várias consequências do consumo agudo e/ou crônico do etanol, podem-se destacar os déficits em teste de aprendizagem e de memória. **Objetivos:** verificar se a abstinência ao etanol após o consumo involuntário ou semivoluntário de etanol (crônico ou agudo) é capaz de interferir na aprendizagem, na memória e na ansiedade de ratos adultos. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 196 ratos albinos, *Wistar* e machos, com 21 dias de vida. Inicialmente os animais foram divididos em dois grandes grupos para compor o Estudo 1 ou o estudo 2. No estudo 1 a via de administração foi semivoluntária (etanol a 6%) e no estudo 2 foi involuntária (por gavagem intragástrica- 1g etanol/kg). Em ambos os estudos os animais foram divididos novamente em relação ao tipo de bebida que receberiam (água ou etanol) e tempo de consumo (agudo- 2 horas ou crônico- 21 dias, sendo que no estudo 2 a ingestão etílica aconteceu a cada 3 dias). No 23º dia (após 48 horas da última ingestão etílica) os animais foram testados no Teste de Memória de Reconhecimento (TMR), no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e no Labirinto Aquático de Morris (LAM) por dois dias consecutivos e retestados após 28 dias. **Resultados:** No estudo 1 os resultados indicaram que a abstinência ao etanol após o consumo agudo ou crônico de etanol não foi capaz de alterar a aprendizagem e a memória espacial no LAM, porém prejuízos na memória espacial de longo prazo foram observados nos animais submetidos ao consumo agudo de etanol. Não foram observadas alterações na Memória de Reconhecimento na Sessão treino e na Memória de Reconhecimento de Curto Prazo, porém a exposição aguda ao etanol foi capaz de gerar prejuízos na memória de Reconhecimento de Longo Prazo. Não houve diferenças nos níveis de ansiedade dos animais do estudo. Em relação ao estudo 2, foi possível observar que a abstinência do etanol após o consumo agudo foi capaz de gerar um prejuízo na memória espacial de curto prazo e que o consumo crônico e agudo de etanol não foram capazes de prejudicar a Memória de Reconhecimento dos animais estudados. Ainda que, os animais expostos ao consumo agudo e crônico de etanol, em abstinência ao etanol de 48 horas apresentaram níveis de ansiedade elevados. **Conclusão:** O etanol influencia de forma diferente a memória espacial, a memória de reconhecimento e os níveis de ansiedade a depender da via de administração (e, portanto da quantidade de etanol ingerida) e do tempo de consumo.

Palavras chaves: Etanol; Memória Espacial; Memória de Reconhecimento; Ansiedade

SILVA, K. **Anxiety, spatial memory and recognition memory after consumption of ethanol in rats**. 2015. 111 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015.

Introduction: Alcoholism is a chronic and progressive disease that has a significant impact on social and economic values of society. Abrupt withdrawal of chronic ethanol consumption can lead to alcohol withdrawal syndrome (AWS) which impacts on the health of the individual. Currently, much attention has also been attributed to the spaced ethanol consumption in high doses, characterized as "binge". Among the many consequences of acute and/or chronic consumption ethanol, can highlight the deficits in learning and memory test. **Objectives:** verify if abstinence to ethanol after the involuntary consumption of ethanol or semi-voluntary (chronic or acute) can interfere in the learning, memory and anxiety in adult rats **Materials and Methods:** were used 196 albino rats Wistar and males, with 21 days of life. Initially, the animals were divided into two groups to compose the study 1 or 2. In study 1 the administration route was semi voluntary (6% ethanol) and in Study 2 was involuntary (by gavage intragástrica- ethanol 1g / kg). In both studies, the animals were divided again in relation to the type of beverage that receive (water or ethanol) and time consumption (acute- 2 hours or chronic for 21 days, whereas in Study 2 the alcohol consumption occurred every 3 days). On the 23rd days (48 hours after the last alcohol consumption) the animals were tested in Recognition Memory Test (RMT), the Elevated Plus Maze (EPM) and Morris Water Maze (MAM) for two consecutive days (and retested after 28 days). **Results:** In study 1 the results indicated that abstinence to ethanol after acute or chronic ethanol consumption was not able to alter the learning and spatial memory in LAM, but damage on long-term spatial memory were observed in animals submitted to consumption acute ethanol. No changes were observed in recognition memory in Session training and Short-term recognition memory, but the acute ethanol exposure was able to generate damages on long-term recognition memory. There were no differences in anxiety levels of study animals. Regarding the study 2, we observed that abstinence after acute ethanol consumption was able to generate damage in spatial memory short term and that chronic and acute consumption of ethanol were not able to alter the Recognition Memory of animals studied. Although, animals exposed to acute and chronic ethanol consumption in abstinence to 48 hours ethanol showed elevated levels of anxiety. **Conclusion:** Ethanol affects differently the spatial memory, recognition memory and anxiety levels depending on the route of administration (and therefore the amount of intake of ethanol) and of the time consumption.

Key words: Ethanol; Spatial memory; Recognition memory; anxiety

Título da tabela	Página
Tabela 1. Critérios de dependência de substâncias psicoativas	26
Tabela 2. Critérios para abstinência de substâncias	27

Título das figuras	Páginas
Figura 1. Divisão dos grupos experimentais	38
Figura 2. Protocolo para o consumo crônico de etanol	39
Figura 3. Protocolo para o consumo semivoluntário AGUDO de etanol	40
Figura 4. Divisão dos grupos experimentais	41
Figura 5: Protocolo para o consumo de etanol tipo involuntário crônico	42
Figura 6: Protocolo para o consumo de etanol tipo involuntário agudo	43
Figura 7. Configuração básica de uma cromatógrafo	44
Figura 8. Esquema do Labirinto Aquático de Morris	46
Figura 9. Ilustração da Arena e da posição dos objetos no Teste de Memória de Reconhecimento	48
Figura 10. Vista Superior do Labirinto em Cruz Elevado	49
Figura 11: Curva de calibração obtida utilizando soluções padrões de etanol e padrão interno (isobutanol) para determinação de etanol em amostras de sangue de rato após separação por cromatografia a gás (CG) e detecção por ionização em chama (FID)	52
Figura 12. Concentração de etanol no sangue (g/L) dos animais submetidos ao consumo semivoluntário agudo OU crônico de etanol, após 48 horas de abstinência de etanol	53
Figura 13- Velocidade de nado dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), nas 24 tentativas da fase de aquisição de aprendizagem do Labirinto Aquático de Morris	55
Figura 14- Latência de Fuga dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), nas 24 tentativas da fase de aquisição de aprendizagem do Labirinto Aquático de Morris	56
Figura 15- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), em cada quadrante no primeiro minuto do <i>probe trial</i>	57
Figura 16- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), em cada quadrante no segundo minuto do <i>probe trial</i>	58

Figura 17- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), em cada quadrante no terceiro minuto do <i>probe trial</i>	59
Figura 18- Tempo total de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), em cada quadrante no <i>probe trial</i>	60
Figura 19. Latência de Fuga dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), no teste de retenção de memória do Labirinto Aquático de Morris	61
Figura 20. Velocidade de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), no teste de retenção de memória do Labirinto Aquático de Morris	62
Figura 21. Tempo Total médio de exploração dos objetos dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), na Sessão de Treino, de Teste de Memória de Curto Prazo e Teste de Memória de Longo Prazo	64
Figura 22. Índice de Reconhecimento dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), na Sessão de Treino, de Teste de Memória de Curto Prazo e Teste de Memória de Longo Prazo	65
Figura 23. Resultados do Labirinto em Cruz Elevado dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água)	66
Figura 24: Curva de calibração obtida utilizando soluções padrões de etanol e padrão interno (isobutanol) para determinação de etanol em amostras de sangue de rato após separação por cromatografia a gás (CG) e detecção por ionização em chama (FID)	77
Figura 25. Concentração de etanol no sangue (g/L) dos animais submetidos ao consumo involuntário agudo OU crônico de etanol Ou Água	78
Figura 26. Velocidade de nado dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de	80

água), nas 24 tentativas da fase de aquisição de aprendizagem do Labirinto Aquático de Morris

Figura 27. Latência de Fuga dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), nas 24 tentativas da fase de aquisição de aprendizagem do Labirinto Aquático de Morris 82

Figura 28- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), em cada quadrante no primeiro minuto do *probe trial* 84

Figura 29- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), em cada quadrante no segundo minuto do *probe trial* 84

Figura 30- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), em cada quadrante no terceiro minuto do *probe trial* 85

Figura 31- Tempo total de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), em cada quadrante no *probe trial* 85

Figura 32. Latência de Fuga dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), no teste de retenção de memória do Labirinto Aquático de Morris 86

Figura 33. Velocidade de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), no teste de retenção de memória do Labirinto Aquático de Morris 87

Figura 34. Tempo Total médio de exploração dos objetos dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), na Sessão de Treino, de Teste de Memória de Curto Prazo e Teste de Memória de Longo Prazo 88

Figura 35. Índice de Reconhecimento dos objetos dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo 89

OU Crônico de água), na Sessão de Treino, de Teste de Memória de Curto Prazo e Teste de Memória de Longo Prazo

Figura 36. Resultados do Labirinto em Cruz Elevado dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água) 91

Lista de Siglas e Abreviaturas

APA	American Psychological Association
CEUA	Comitê de Ética em Uso dos animais
CG	Cromatografia à gás
CID	Classificação Internacional de Doenças
DSM	Diagnostic na Statistical Manual of Mental disorders
DSMIV-TR	Diagnostic na Statistical Manual of Mental disorders, 4ª edição, Texto Revisado.
EPM	Erro Padrão da Média
EUA	Estados Unidos da América
%FA	Porcentagem de entrada nos braços abertos
FF	Frequência de entrada nos braços fechados
FID	Em português: Detector por Ionização em Chama
i.p	intraperitoneal
IR	índice de Reconhecimento
LAM	Labirinto Aquático de Morris
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
NaCl	Cloreto de Sódio
Q1	Quadrante 1
Q2	Quadrante 2
Q3	Quadrante 3
Q4	Quadrante 4
SAA	Síndrome de Abstinência do Álcool
TA	Tempo de exploração do objeto A
%TA	Porcentagem de Tempo Despendido nos braços abertos
TB	Tempo de exploração do objeto B
TMCP	Teste de Memória de Curta Duração
TMLP	Teste de Memória de Longa Duração

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
μl	Microlitro
cm	Centímetro
g	Grama
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mm	milímetro
°C	Graus Celsius
s	Segundos
v/v	Volume/volume

Capítulos	Páginas
I. Introdução	23
1.1 Histórico do uso de etanol	23
1.2 Epidemiologia do consumo de etanol	24
1.3 Evolução do conceito de etilismo: da tolerância à dependência	25
1.4 Síndrome de Abstinência Alcoólica (SAA)	26
1.5 Comportamento de “ <i>Binge Drinking</i> ”: Consumo abusivo de etanol em episódios espaçados	27
1.6 Alterações comportamentais e cognitivas decorrentes do consumo de etanol	28
1.6.1 Alterações afetivas decorrentes do consumo etílico: a depressão e a ansiedade como causadoras ou como resultantes da dependência?	28
1.6.2 Alterações Cognitivas decorrentes do consumo etílico	29
II. Objetivos	33
III. Materiais e Métodos	
3.1 Animais	35
3.2 Drogas	35
3.3 Equipamentos	36
3.4 Procedimentos	37
3.4.1 Estudo 1- Investigação da memória e sua correlação com a ansiedade em animais submetidos ao consumo semivoluntário de etanol	37
3.4.1.1 Divisão dos grupos experimentais	37
3.4.1.2 Protocolos das dietas líquidas	38
3.4.2 Estudo 2- Investigação da memória e sua correlação com a ansiedade em animais submetidos ao consumo involuntário de etanol	40
3.4.2.1 Divisão dos grupos experimentais	40
3.4.2.2 Protocolos das dietas líquidas	41
3.4.3 Etalonemia	43
3.4.4 Protocolos dos testes comportamentais (Estudos 1 e 2)	45
3.4.4.1 Teste de memória espacial- Labirinto Aquático de Morris	45
3.4.4.2 Teste de Memória de Reconhecimento	46
3.4.4.3 Labirinto em Cruz Elevado	48
3.4.5 Métodos de eutanásia	49
3.4.6 Análise dos dados	49
IV. Resultados Estudo 1. Investigação da memória e sua correlação com a ansiedade em animais submetidos ao consumo	51

etélico semivoluntário	
4.1 Estudo da linearidade da técnica de etanolemia	51
4.2 Labirinto Aquático de Morris	53
4.3 Fase de Aquisição de aprendizagem no LAM	53
4.4 Resultados do <i>Probe Trial</i>	56
4.5 Teste de retenção de memória	60
4.6 Memória de Reconhecimento	62
4.7 Labirinto em Cruz Elevado	65
V. Discussão Estudo I	68
VI. Conclusão Estudo I	74
VII. Resultados Estudo II: Investigação da memória e sua correlação com a ansiedade em animais submetidos ao consumo etílico involuntário	76
6.1 Estudo da linearidade da técnica de etanolemia	76
6.2 Labirinto Aquático de Morris	78
6.3 Fase de Aquisição de aprendizagem no LAM	78
6.4 Resultados do <i>Probe Trial</i>	83
6.5 Teste de retenção de memória	86
6.6 Memória de Reconhecimento	87
6.7 Labirinto em Cruz Elevado	90
VIII. Discussão Estudo II	93
IX. Conclusão Estudo II	96
X. Discussão geral	98
XI. Conclusão Geral	105
XII. Referências Bibliográficas	107

I. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico do uso do etanol

O álcool é uma substância que acompanha a humanidade desde os seus primórdios. Realiza um importante papel em diversas culturas, pois se encontra presente em momentos de rituais religiosos, de comemoração, na culinária, no preparo de perfumes, e ainda, é utilizado como veículo de vários medicamentos (GIGLIOTTI e BESSA, 2004).

Há relatos a respeito do consumo de bebidas alcoólicas que contém álcool etílico, ou etanol, desde o início da história da humanidade. Os primeiros registros são do Egito antigo e Babilônia e datam aproximadamente de 6.000 anos atrás. As primeiras bebidas alcoólicas a serem utilizadas foram as bebidas fermentadas. As bebidas destiladas começaram a ser consumidas apenas na idade média, com a introdução das técnicas de destilação pelos árabes (BERMOND e TOSE, 2000; GIGLIOTTI e BESSA, 2004).

Com a revolução industrial no século XVIII houve um aumento acentuado na produção e comercialização de bebidas alcoólicas, diminuindo seu custo, consequentemente, um maior número de pessoas passou a ter problemas relacionados ao consumo excessivo desta substância (GIGLIOTTI e BESSA, 2004). Surge nesta época o conceito de alcoolismo.

Desde o início de seu consumo, os efeitos do álcool sobre o comportamento das pessoas, causando desinibição, euforia e sedação já eram conhecidos e muitas vezes buscados pelas pessoas, podendo gerar estados mentais de confusão, incoordenação, coma e até morte (FADDA e ZVANI, 1998).

Ao longo dos anos, apesar do consumo de bebidas alcoólicas ainda ser amplamente aceito socialmente, a venda de bebidas alcoólicas tem sofrido restrições que procuram controlar ou prevenir o seu uso indevido. Mesmo com estas tentativas de diminuir o consumo excessivo destas bebidas, ainda é a substância psicoativa mais usada e o solvente mais utilizado depois da água (BERMOND e TOSE, 2000).

1.2 Epidemiologias do consumo de etanol

Embora o consumo de álcool nos últimos vinte anos tenha diminuído nos países desenvolvidos, o oposto tem ocorrido em países em desenvolvimento. Este indicador é importante, em especial, para América Latina onde o consumo etílico é um dos principais fatores de risco, ao se tratar de enfermidades evitáveis (OMS, 2004).

O etilismo é uma doença crônica e progressiva que tem um impacto significativo nos valores sociais e econômicos da sociedade. A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de dois bilhões de pessoas no mundo consomem bebidas alcoólicas e 76,3 milhões apresentam diagnósticos de transtornos relacionados ao consumo do etanol (OMS, 2004).

Os estudos epidemiológicos brasileiros mais abrangentes a respeito do uso de álcool na população geral foram realizados pelo CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (GALDURÓZ, 2000). Este centro realizou um amplo estudo domiciliar, englobando 107 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes. Os principais resultados foram alarmantes: o uso de álcool pela população total foi de 74,6%. Esta proporção se manteve próxima para as diferentes faixas etárias (CEBRID, 2005).

Outro resultado preocupante foi a prevalência da dependência de álcool que chegou a 12,3% da população entrevistada, apresentando uma prevalência maior de dependência entre o sexo masculino (CEBRID, 2005).

Indubitavelmente, a prevalência de dependência de álcool entre os adolescentes brasileiros tem preocupado as políticas de saúde pública. Segundo este mesmo levantamento citado acima, aproximadamente 7% dos adolescentes (12 a 17 anos) são dependentes de álcool.

Nos estados unidos, estima-se que 88% da população adulta consumam bebidas alcoólicas, dentre estes, 59% são jovens com idade entre 18 e 25 anos. Os problemas com dependência destas bebidas podem chegar a 14% neste país (BERMOND e TOSE, 2000).

1.3 Evolução do conceito de etilismo: da tolerância à dependência

O etilismo foi referido como doença pela primeira vez por Thomas Trotter, um psiquiatra americano (LARANJEIRA e NICASTRI, 1996). Outro autor que contribuiu para o avanço no entendimento do uso de bebidas alcoólicas foi o sueco Magnus Huss em 1849, que introduziu o conceito “alcoholismo crônico” como um estado de intoxicação pelo álcool que se manifestava em sintomas físicos, psiquiátricos ou mistos (GIGLIOTTI e BESSA, 2004).

Na segunda metade do século XX, Jellinek em seu clássico trabalho *“The Disease Concept of Alcoholism”* (em português – O conceito doença do alcoholismo), considera o alcoholismo como doença, apenas se o usuário apresentar tolerância, abstinência e perda de controle, onde tolerância refere-se à necessidade de doses cada vez maiores para que se obtenha o mesmo efeito, ou uma diminuição nos efeitos com doses anteriormente utilizadas. Ainda, designou como Síndrome de Abstinência um quadro de desconforto físico e/ou psiquiátrico frente à diminuição ou suspensão do consumo de etanol (JELLINEK, 1960).

Jellinek (1960) já diferenciava os transtornos por uso de álcool em pessoas com e sem dependência. Porém nos manuais de consulta do CID (Código Internacional de Doenças) e do DSM (em inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) esta diferenciação só aparece na oitava e terceira edições, respectivamente (CID-8 e DSM-III).

Atualmente, para que seja considerada dependência de substâncias químicas, como o etanol, o usuário deve apresentar um agrupamento de sinais e sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos e deve persistir no uso destas substâncias, apesar de apresentar problemas relacionados ao mesmo (DSM-IV TR, 2000). Para este diagnóstico é necessária a presença de ao menos três sintomas dos setes descritos pela APA (*American Psychiatric Association*, 2000) (tabela 1)

Tabela 1- Critérios de dependência de substâncias psicoativas

Um padrão mal adaptativo de uso de substância, levando a prejuízo ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por três (ou mais) dos seguintes critérios, ocorrendo a qualquer momento no mesmo período de 12 meses:	
1)	<i>tolerância, definida por qualquer um dos seguintes aspectos:</i> <i>(a) uma necessidade de quantidades progressivamente maiores da substância para adquirir a intoxicação</i> <i>ou</i> <i>(b) acentuada redução do efeito com o uso continuado da mesma quantidade de substância</i>
2)	<i>abstinência, manifestada por qualquer dos seguintes aspectos:</i> <i>(a) síndrome de abstinência característica para a substância (consultar os Critérios A e B dos conjuntos de critérios para Abstinência das substâncias específicas)</i> <i>(b) a mesma substância (ou uma substância estreitamente relacionada) é consumida para aliviar ou evitar sintomas de abstinência</i>
3)	<i>a substância é frequentemente consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido</i>
4)	<i>existe um desejo persistente ou esforços mal-sucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso da substância</i>
5)	<i>muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção da substância (por ex., consultas a múltiplos médicos ou fazer longas viagens de automóvel), na utilização da substância (por ex., fumar em grupo) ou na recuperação de seus efeitos.</i>
6)	<i>importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas são abandonadas ou reduzidas em virtude do uso da substância.</i>
7)	<i>o uso da substância continua, apesar da consciência de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pela substância (por ex., uso atual de cocaína, embora o indivíduo reconheça que sua depressão é induzida por ela, ou consumo continuado de bebidas alcoólicas, embora o indivíduo reconheça que uma úlcera piorou pelo consumo do álcool)</i>

Fonte: DSM- IV TR. American Psychiatric Association, 2002 .

1.4 Síndrome de Abstinência Alcoólica (SAA)

Ainda de acordo com os critérios diagnósticos do DSM-IV e do CID-10, a diminuição ou abstenção de etanol após o seu consumo crônico caracteriza a Síndrome de Abstinência Alcoólica (SAA), cujos sintomas mais frequentes são tremores, ansiedade, insônia e agitação psicomotora. A Tabela 2 aponta os critérios necessários para que seja considerada a abstinência de substâncias psicoativas segundo a APA, 2002.

Tabela 2- critérios para abstinência de substâncias

-
- A. *Desenvolvimento de uma síndrome específica à substância devido à cessação (ou redução) do uso pesado e prolongado da substância.*
- B. *A síndrome específica à substância causa sofrimento ou prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, ocupacional ou outras áreas importantes da vida do indivíduo.*
- C. *Os sintomas não se devem a uma condição médica geral nem são melhor explicados por outro transtorno mental.*
-

Fonte: DSM- IV TR. American Psychiatric Association, 2002.

Esta Síndrome tem suas principais complicações ou comorbidades clínicas associadas ao sistema nervoso central, gastrointestinal, osteomuscular, cardiovascular, endócrino, alterações metabólicas, renais e dermatológicas. A SAA sofre influência de diversos fatores como os genéticos, ambientais, gênero, padrão de consumo de álcool e características individuais (LARANJEIRA, et al., 2000).

Dentre as diversas áreas de estudo que pesquisam esta síndrome se destaca os estudos a respeito da neurobiologia envolvida na abstinência do etanol, pois fornece importantes informações sobre os mecanismos da dependência desse álcool e, por este motivo, os estudos a respeito da SAA tornaram-se de grande interesse para pesquisadores de todo o mundo (ESEL, 2006).

No que diz respeito aos efeitos no Sistema Nervoso Central, os sintomas da SAA aparecem no prazo de 6 à 24 horas após cessar o consumo, e a maioria dos sintomas desta síndrome parecem estar relacionados às mudanças adaptativas em neurotransmissores, neuropeptídeos e no sistema neuroendócrino decorrentes do uso crônico de etanol (KOOB, 2003; ESEL, 2006).

1.5 Comportamento de “*binge drinking*”: consumo abusivo de etanol em episódios espaçados.

Além dos estudos realizados com o consumo crônico de etanol e a SAA, o comportamento de “*binge drinking*” (em português: consumo excessivo de bebida etílica) tem ganhado destaque nas pesquisas a respeito do consumo de etanol. O termo em inglês “*binge drinking*” tem sido utilizado para caracterizar o comportamento de beber em situações em que a pessoa ingere altas doses de bebidas alcoólicas em uma única ocasião. Uma dose de álcool contém, aproximadamente, 10-12 gramas de álcool, e é considerado *binge* o consumo de

seis ou mais doses em uma única situação, o que equivale a 6 ou mais latas de cerveja (350 ml cada) com graduação alcoólica de 5%, ou seis doses de destilado que contenha de 40-50% de álcool (50 ml cada dose), ou, ainda, seis taças de vinho (90 ml cada) contendo aproximadamente 12% de graduação alcoólica (PILON e CORRADI-WEBSTER, 2006).

É de extrema importância chamar a atenção para os limites de beber de baixo risco, preconizados pela OMS que são de até duas doses por ocasião para mulheres e de até três doses para homens (BABOR e BIDDLE, 2001).

Sabe-se que o consumo abusivo de bebidas alcoólicas pode trazer consequências para a saúde e para o meio social do indivíduo. Acidentes automobilísticos, brigas e discussões, sexo sem proteção e baixo desempenho acadêmico tem seus índices aumentados em situações de *binge* alcoólico entre os jovens (McGEE e KYPRIK, 2004).

O impacto deste tipo de comportamento nos diversos órgãos e sistemas ainda tem sido pouco estudado. Não se sabe ainda se este comportamento é tão maléfico quanto o uso crônico de etanol, nem se também é capaz de gerar tolerância e abstinência. Desta forma, a primeira hipótese deste trabalho é de que animais em abstinência etílica, após o consumo do tipo *binge* alcoólico, apresentem alterações comportamentais e/ou neuroquímicas semelhantes aos animais em abstinência etílica após o consumo semivoluntário crônico de etanol.

1.6 Alterações comportamentais e cognitivas decorrentes da abstinência do consumo de etanol

1.6.1 Alterações afetivas decorrentes do consumo etílico: A depressão e a ansiedade como causadoras ou como resultantes da dependência?

Vários estudiosos têm se preocupado com a participação de aspectos da personalidade e fatores de comorbidade na dependência etílica. Estudos têm demonstrado a existência de uma forte associação entre distúrbios psiquiátricos, principalmente a depressão e a ansiedade, e o uso de drogas (LARANJEIRA, *et al.*, 2000).

Um importante estudo brasileiro mostrou que a história de dependência de álcool estava associada com o aumento no risco de abuso e dependência de outras

drogas, e ainda, que este risco era maior quando o usuário de etanol apresentava ao menos um transtorno psiquiátrico (LOPES, 1994). Ainda, sintomas de ansiedade e depressão são comuns no uso de várias drogas (CHRISTIE et al., 1988; SUTTAJIT et al., 2012). Desta forma, há uma crescente discussão sobre os transtornos de ansiedade e o uso de substâncias psicoativas, como o etanol, por exemplo.

O transtorno de ansiedade é frequente em indivíduos com abstinência ao etanol. Utilizando-se o teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) foi demonstrado que a abstinência ao etanol leva a um aumento dos níveis de ansiedade em ratos, evidenciada pelo maior número de entradas nos braços abertos quando comparados com animais controle e com a literatura (CABRAL et al., 2006; FILE et al., 1989; PADOVAN, et al., *in prep.*).

O LCE é uma importante ferramenta que pode ser utilizada para o estudo da ansiedade induzida pelo consumo crônico ou abstinência ao etanol em animais. Este modelo animal de ansiedade foi validado do ponto de vista farmacológico, bioquímico e comportamental por PELLOW et al. em 1985. Handley e Mithany foram os primeiros a empregarem o modelo do LCE, os quais observaram um maior número de entradas nos braços fechados quando comparados com o aberto em animais controle, devido aos estímulos naturais de novidade impostos pelas condições do modelo (LISTER, 1990).

Considerando tais pressupostos, sugere-se a hipótese de que a abstinência ao consumo crônico de etanol leva ao desenvolvimento de alterações cognitivas bem como de transtornos psiquiátricos.

1.6.2 Alterações cognitivas decorrentes da abstinência do consumo etílico.

Além dos Transtornos de Ansiedade, outras consequências do consumo do etanol são os déficits em teste de aprendizagem, memória, abstração, solução de problemas, análise e sínteses perceptuais, velocidade e eficiência no processamento de informação. (PARSONS, 1998). O uso agudo de etanol pode comprometer a atenção, memória, funções executivas e visuoespaciais, enquanto o uso crônico altera a memória, aprendizagem, análise e síntese visuoespacial, velocidade psicomotora, funções executivas e tomadas de decisões, podendo

chegar a transtornos persistentes de memória e demência alcoólica (CUNHA e NOVAES, 2004).

Outra evidência dos efeitos do etanol na cognição humana é a variedade de alterações cognitivas, comportamentais e psicossociais encontrada em crianças que foram expostas no período pré-natal ao etanol, sendo que a anormalidade cognitiva é expressa na dificuldade de resolução de problemas de abstração, atenção, aprendizagem e memória (American Academy of Pediatrics, 2000).

Em animais, os déficits cognitivos gerados pelo consumo de etanol podem ser avaliados utilizando-se testes comportamentais. Um importante teste de memória espacial e aprendizagem foi desenvolvido por Morris (1981) e tem se destacado por não ser necessário o uso de recompensa alimentar para motivação ao desempenho da tarefa e prévia privação do animal. Além disto, o uso desse modelo é útil, pois a tarefa não pode ser resolvida, com eficiência, sem a utilização de estratégias espaciais. A privação alimentar ou de líquidos do animal, utilizada em alguns testes de memória e aprendizagem, podem ofuscar os efeitos de algumas drogas na cognição, visto que a privação também é capaz de gerar alterações cognitivas.

A metodologia introduzida por Morris (1981) permite a utilização em duas formas de estudo de navegação espacial. Em ambas, o animal é colocado numa piscina circular com água e permitido nadar em direção a uma plataforma. Numa versão chamada pista proximal, a plataforma é visível e o rato nada diretamente para esta pista proximal. Neste caso, o animal não precisa estabelecer relações espaciais entre objetos, ele se orienta em direção a esta pista específica. Na outra versão, chamada pista distal, que foi utilizada neste trabalho, a plataforma é submersa e colocada numa posição fixa relativa a pistas externas a este labirinto. Para aprender a localização da plataforma, o rato deve usar estas pistas ambientais para nadar até a plataforma.

A exclusão das pistas proximais e ênfases nas pistas distais induz ao uso de estratégias de mapeamento espacial (MORRIS *et al*, 1982) e por isto foi escolhida para compor o presente estudo.

Outro teste também utilizado para o estudo da memória em animais é o teste da Memória de Reconhecimento (TMR). Este, diferente do LAM, é uma tarefa de julgamento e não de aprendizagem. O TMR foi idealizado em 1988 por Ennaceur e Delacour e se baseia no comportamento exploratório natural de ratos frente a

objetos novos ou já conhecidos. Estes autores puderam concluir que ratos dispendem mais tempo na exploração de novos objetos quando comparados com objetos familiares (ENNACEUR e DELACOUR, 1988).

Uma vantagem deste teste é de não necessitar de um sistema de recompensa (como no LAM) e ainda não ocorrer em uma situação de medo ou fome, avaliando a memória sem a associação de uma memória aversiva (ENNACEUR e DELACOUR, 1988).

Este teste avalia a Memória de Curto prazo e de Longo prazo. Conhecidamente, os sistemas de memória podem ser divididos em três: Memória de curta duração, de Longa duração e Memória Operacional (XAVIER, 1993). A memória sensorial ou imediata recebe os primeiros traços a serem armazenados e os transfere para a memória primária, também conhecida como a memória de trabalho ou de procedimento (BRANDÃO, 2004). Estas informações podem decair rapidamente ou ser mantida por minutos, horas ou dias, pela repetição mental do conteúdo que se deseja memorizar (XAVIER, 1993).

No que diz respeito à memória de curta duração há o armazenamento de quantidade limitada de informações por um tempo variável e está intimamente ligada ao processo atencional. Acredita-se que as informações repetidas na memória de curto prazo podem transitar para a memória de longo prazo, num processo chamado de consolidação da memória. Contudo, pacientes com alterações na memória de curto prazo podem apresentar a formação de memória de longo prazo, o que sugere que estes sistemas possam ser independentes (XAVIER, 1993).

A memória de Longa duração permite o armazenamento de grande quantidade de informações por um período indefinido de tempo. Neste sistema, a atenção não precisa ser recrutada continuamente para que haja a consolidação na memória.

Desta forma, mediante os efeitos já conhecidos do consumo crônico de etanol sobre a cognição, a hipótese é de que a abstinência ao consumo crônico de etanol, induz *déficits* de memória e de aprendizagem tanto após o consumo crônico semivoluntário quanto após o consumo do tipo *binge* alcoólico.

II. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi verificar se a abstinência ao etanol após o consumo involuntário ou semivoluntário de etanol (crônico ou agudo) é de capaz interferir na aprendizagem, na memória e na ansiedade de ratos adultos.

Objetivos específicos:

- **2.1** Avaliar a aprendizagem e memória espacial em animais em abstinência ao etanol após o consumo semivoluntário e involuntário de etanol, agudo e crônico;
- **2.2** Estudar a memória de reconhecimento de animais em abstinência ao etanol após o consumo semivoluntário e involuntário de etanol, agudo e crônico.
- **2.4** Estudar os efeitos da via de administração (semivoluntária e Involuntária) e do tempo de administração (Agudo ou Crônico) sobre o comportamento no LCE.
- **2.5** Comparar os achados do LCE com os achados de memória espacial e de reconhecimento.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 196 ratos albinos, *Wistar*, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, com 21 dias de vida (recém-desmamados).

Os animais foram alojados em gaiolas-viveiro de polipropileno (medidas: 41 × 34 × 16 cm) aos pares, com livre acesso a água e comida até a sétima semana de vida para o grupo que posteriormente foi submetido ao consumo crônico de etanol e até a décima semana para os animais que fizeram parte do grupo de consumo agudo¹.

As gaiolas-viveiro foram forradas com maravalha e o processo de higienização das mesmas foi realizado em dias alternados. Com exceção do contato para a limpeza das gaiolas, os animais permaneceram sem qualquer tipo de manipulação até a sétima semana de vida, quando se iniciaram os estudos.

Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão, o qual apresenta ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luzes ligadas das 6:30 às 18:30) e temperatura de 23°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) controlados.

Todos os protocolos utilizados neste estudo foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto (protocolos nº 13.1.232.53.4; 12.1.1332.53.1; 11.1.423.53.2 e 07.1.992.53.2).

3.2 Substâncias e compostos utilizados

- ❖ Etanol para dieta líquida (Synth; 2%, 4%, 6% para o consumo semivoluntário e 1g/kg de etanol para o consumo involuntário);
- ❖ Fluoreto de sódio (para análise de etanol sanguínea por cromatografia gasosa);
- ❖ Uretana (Anestésico para eutanásia; Aldrich, EUA; 25%; 5 ml/kg; i.p.).
- ❖ Heparina (Crystalia; 5.000 UI/ml; 0,25ml por animal).

¹ Os animais submetidos ao consumo agudo de etanol permaneceram no biotério por mais três semanas (período de tratamento dos animais submetidos ao consumo crônico de bebidas) para que a idade, no momento do teste, fosse semelhante a idade do grupo submetido ao consumo crônico.

3.3 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- ❖ Labirinto aquático de Morris (LAM): O LAM é constituído de um tanque circular de fibra de vidro, cor preta. Possui 1,50 cm de diâmetro e 39 cm de altura. Este tanque é preenchido com água em temperatura controlada de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). É dividido em quatro quadrantes virtuais, delimitados pelo sistema *ETHOVISION®*. Entre o quadrante I e o centro do tanque encontra-se uma plataforma de acrílico para dificultar a visualização da mesma pelo animal. Nas paredes da sala onde se encontra o LAM há pistas em formatos geométricos distintos em cada parede, de modo que auxilie na orientação espacial dos animais. Sobre este aparato há uma câmara filmadora, cujas imagens são capturadas pelo sistema de vídeo *Ethovision*.
- ❖ Ethovision: software que possui sistema de captura de vídeo para análise do comportamento. Para este estudo o software foi programado para registro da latência para encontrar a plataforma, além de calcular outras medidas como a velocidade média de nado e o tempo despendido em cada quadrante.
- ❖ Campo aberto: Este aparato é formado por uma arena circular com paredes de acrílico transparente (75 cm de diâmetro x 50 cm de altura), colocada sobre um assoalho dividido em 12 quadrantes.
- ❖ Labirinto em Cruz Elevado (LCE): O LCE é constituído de dois braços abertos (50 x 10 cm) perpendiculares a dois braços fechados de mesma medida, mas circundados por paredes elevadas (40 cm de altura). Nos braços abertos, há uma barreira de 1 cm de *plexiglass*, que ajuda evitar a queda do animal desses braços. Todo o aparato encontra-se elevado 50 cm do solo (PELLOW et al., 1985);
- ❖ Câmera filmadora e computador. Os comportamentos dos animais foram registrados por uma câmara e gravados em um computador

para posterior análise e quantificação, utilizando-se o software Ethovision.

- ❖ Peças de Lego®, nas cores vermelha e amarela.
- ❖ Cromatógrafo gasoso CG Flaming ionidetect da marca Agilente 7890.
- ❖ Agulha de aço Inox BD-12. Cânula diâmetro 1,2 mm cm esfera 2,3 mm, raio de 40 mm e comprimento de 54 mm.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Estudo 1. Investigação da memória e sua correlação com a ansiedade em animais submetidos ao consumo semivoluntário de etanol.

3.4.1.1 Divisão dos grupos experimentais

Quando completadas as sete semanas de vida, os animais foram divididos de acordo com o tipo de bebida que receberiam (água OU etanol) e com o tempo de consumo de bebidas (agudo OU crônico).

Cabe salientar que, para seguir as recomendações éticas e minimizar o número de animais nos experimentos, optou-se por não diferenciar em agudo OU crônico os grupos submetidos ao consumo de água de forma semivoluntária, uma vez que o procedimento para estes grupos são idênticos.

Os animais foram separados de acordo com o experimento que iriam compor, conforme a ilustração abaixo (Figura 1).

Figura 1: Divisão dos grupos experimentais.

Cabe destacar que o grupo denominado de semivoluntário teve acesso apenas ao líquido ofertado (etanol ou água), ou seja, eles não tiveram livre acesso a outro tipo de bebida, porém poderiam consumir na quantidade desejada.

3.4.1.2 Protocolos das dietas líquidas

- **Protocolo de consumo semivoluntário crônico de etanol**

Este protocolo teve duração de 23 dias, com suas etapas descritas a seguir.

Para adaptação do animal, foi iniciado o tratamento com uma solução de etanol a 2% por três dias consecutivos, no quarto dia a graduação alcoólica da solução foi aumentada para 4% e do sétimo dia ao 20º foi mantida a concentração de 6% de etanol. Neste período, estes animais não receberam água, apenas a solução etílica.

No vigésimo dia as soluções de etanol 6% foram retiradas e os animais ficaram restritos de qualquer líquido por 24 horas. No 21º dia, estas soluções foram novamente oferecidas durante duas horas. Após este breve período, os animais

receberam apenas água em sua dieta líquida, até o 23º dia, quando foram iniciados os testes comportamentais.

O grupo controle recebeu apenas água em sua dieta líquida, porém também foi submetido à restrição de água por 24 horas para que se garantissem as mesmas condições experimentais.

A figura 2 ilustra o protocolo citado acima.

Figura 2. Protocolo para o consumo crônico de etanol.

- **Protocolo de consumo semivoluntário agudo de etanol**

Os animais integrantes deste grupo receberam água potável *ad libitum* do primeiro dia experimental (com sete semanas de vida) até o 20º dia do experimento. No 20º dia eles foram submetidos à privação de líquidos por 24 horas e, no dia seguinte (21º dia) foi ofertado etanol a 6% por duas horas. Após este período, novamente foi oferecida água potável até o 23º dia em que foram iniciados os testes comportamentais (Figura 3)

Figura 3: Protocolo para o consumo semivoluntário AGUDO de etanol.

3.4.2 Estudo 2. Investigação da memória e sua correlação com a ansiedade em animais submetidos ao consumo involuntário de etanol.

3.4.2.1 Divisão dos grupos experimentais

Quando completadas as sete semanas de vida, os animais foram divididos de acordo com o tipo de bebida que receberiam (água OU etanol) e com o tempo de consumo de bebidas (agudo OU crônico).

Nestes experimentos, houve separação entre os grupos submetidos ao consumo agudo e Crônico de Água, pois neste estudo, os procedimentos não eram idênticos para estes grupos. Os animais foram separados de acordo com o grupo que iriam compor, conforme a ilustração abaixo (Figura 4).

Figura 4. Divisão dos grupos experimentais

3.4.2.2 Protocolos das dietas Líquidas

- **Protocolo do consumo involuntário crônico**

Neste estudo os animais foram pesados a cada três dias e, pela manhã, foi administrada a quantidade de etanol ou água por gavagem intragástrica (etanol ou água) tendo, portanto quantidade de bebida controlada pelo pesquisador. Após este procedimento os animais tiveram a sua disposição bebedouros com água, podendo consumi-la *ad libitum*.

A duração deste protocolo também foi de 23 dias (como no protocolo de consumo semivoluntário). Neste modelo, os animais receberam 1g de etanol por quilo de massa corporal (1g/kg) em uma única dose, à 20% de etanol, a cada três dias, por 21 dias.

No 21º dia os animais receberam a última dose de etanol e foram iniciados os testes comportamentais no 23º dia. Segue abaixo na figura 3 o esquema temporal deste protocolo (Figura 5).

O grupo controle foi submetido semelhantemente às gavagens intragástricas, porém com ingestão de água no mesmo volume que os animais experimentais receberam.

Figura 5: Protocolo para o consumo de etanol tipo involuntário crônico

- **Protocolo do consumo involuntário agudo (água e etanol)**

A duração deste protocolo foi de 23 dias (como no protocolo de consumo involuntário crônico). Neste modelo, os animais receberão 1g de etanol por quilo de massa corporal (1g/Kg) em uma única dose, à 20%, por meio de gavagem intragástrica, apenas no 21º dia e foram testados no 23º dia. Segue abaixo na figura 6 o esquema temporal deste protocolo.

O grupo controle foi submetido semelhantemente às gavagens intragástricas, porém com ingestão de água no mesmo volume que os animais experimentais receberam.

Figura 6: Protocolo para o consumo de etanol tipo involuntário agudo

3.4.3 Etalonemia

- **Calibração e análise das amostras de sangue de rato por cromatografia á gás (CG) e detecção por ionização em chama (FID)**

A curva de calibração para determinação de etanol nas amostras de sangue de rato foi obtida utilizando-se soluções padrões de etanol nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g/L, preparadas a partir de diluição de uma solução de estoque de etanol de 10 g/L. Foram utilizados como padrão interno uma solução de isobutanol 1,0 g/L e 100 g/L de NaCl, que foram adicionados a cada amostra de sangue de rato e também utilizados na calibração do aparelho.

Em cada ponto da curva de calibração, foram adicionados 100 µL de solução padrão de etanol e 500 µL do padrão interno em um frasco de *headspace* (Microliter Analytical Supplies, EUA). Foram utilizadas as mesmas quantidades de amostra de sangue e padrão interno. O frasco de *headspace* foi aquecido a 90 °C por 10 minutos em agitação de 250 rpm. Nesta temperatura, tanto o etanol quanto o isobutanol são vaporizados. Com uma seringa apropriada, foram coletadas 400 µL da amostra na fase vapor. Posteriormente a seringa foi levada ao injetor do cromatógrafo a gás e a amostra foi introduzida no equipamento.

As determinações de etanol em amostras de sangue de rato foram realizadas em um cromatógrafo a gás (CG) (7890 A, *Agilent Technologies*, EUA) acoplado a um detector de ionização por chama (FID) utilizando um fluxo de 40 ml/min de gás hidrogênio, 20 ml de gás nitrogênio/min e 400 ml/min de ar sintético. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 250°C e 300°C, respectivamente. A injeção da amostra foi realizada no modo *splitless* e utilizando um amostrador automático GC *Sampler* 80 operando no modo *Headspace*. A coluna capilar possuía 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e revestimento interno de 0,25 µm de polietilenoglicol como fase estacionária. Como gás de arraste foi utilizado gás nitrogênio a um fluxo de 1 ml/min. A temperatura inicial da coluna foi elevada de 50°C para 200°C a uma taxa de aquecimento de 20°C/min por dois minutos. Um esquema simplificado do equipamento é apresentado na Figura 7.

Figura 7. Configuração básica de uma cromatógrafo. Adaptado de: Gouveia e Seracopi. Acessado em 2014.

Após 48 horas de abstinência ao consumo de água ou etanol, previamente descrito, os animais foram anestesiados com Uretana (2,5%) para retirada da amostra sanguínea. O sangue foi retirado da veia cava inferior e colocado em um *eppendorf* de 5 ml, banhado internamente com heparina e com Fluoreto de sódio.

As amostras foram coletadas em duplicata e armazenadas a -70° C até o dia da análise.

A análise foi realizada por cromatografia gasosa, também em duplicata para maior fidedignidade dos achados.

3.4.4 Protocolos dos Testes Comportamentais utilizados nos estudos 1 e 2

3.4.4.1 Teste de memória espacial- Labirinto Aquático de Morris

O teste teve início no 23º dia (quando os ratos estavam com 48 horas de abstinência ao etanol, conforme descrito nos protocolos de consumo de bebidas).

O teste de labirinto aquático é um teste de aprendizagem e memória espacial. O rato inicialmente é colocado na plataforma durante 60 segundos. Após este período, o animal é então posicionado de costas para o centro do tanque, em um dos quadrantes escolhido previamente de forma aleatória (com exceção do quadrante I onde se encontra a plataforma) (Figura 8). O animal então nada em busca da plataforma por 60 segundos. O experimento foi realizado em três dias. O 1ª e 2ª dias foram compostos por 12 tentativas de 60 segundos, totalizando 24 tentativas, sendo analisada a latência em que o animal é colocado no labirinto e o momento em que o mesmo encontra a plataforma, também chamado de Latência de Fuga e a velocidade de nado (cm/s).

Após as 12 tentativas do segundo dia de teste foi realizado o *Pobre Trial*, em que a plataforma foi removida e o animal colocado no quadrante diagonalmente oposto àquele que continha a plataforma por 180 segundos para a natação. No *Pobre Trial* foi registrado o tempo de permanência em cada quadrante. Após 28 dias o animal é submetido a uma nova tentativa de 60 segundos e foi computada a latência para encontrar a plataforma e a velocidade de natação.

Figura 8. Esquema do Labirinto Aquático de Morris. Legenda: Q1: Quadrante 1; Q2: Quadrante 2; Q3: Quadrante 3 e Q4: Quadrante 4.

3.4.4.2 Teste de memória de reconhecimento (TMR)

O TMR foi realizado na Arena circular com paredes de acrílico transparente (75 cm de diâmetro x 50 cm de altura), colocada sobre um assoalho dividido em 12 quadrantes.

O teste foi realizado conforme descrito por de Lima e colaboradores (2007) e será detalhado a seguir:

- Dia 1: Realizado no 23º dia experimental

Sessão de habituação na arena.

Neste dia os ratos foram colocados no campo aberto, coberto com maravalha, durante 5 minutos para habituação no ambiente. A figura 8 ilustra o Teste.

- Dia 2: Realizado no 24º dia experimental

Sessão de treino

Os ratos foram expostos a dois objetos idênticos (A_1 e A_2) durante 5 minutos. Os objetos foram posicionados em dois cantos adjacentes da arena a 9 cm da parede.

Teste de Memória de Curto Prazo (TMCP)

Após 90 minutos da sessão de treino os animais foram novamente colocados no campo aberto por 5 min. Havia, neste momento na arena, além do objeto familiar

A, um novo objeto B. A posição destes objetos foram as mesmas da sessão de treino.

Dia 3: no 25º dia experimental

Sessão de Teste de Memória de Longo Prazo (TMLP)

Esta sessão ocorreu 24h após a sessão de treino. Nesta fase, o animal pôde explorar o campo aberto por 5 min., na presença do objeto familiar A e um terceiro objeto C (Figura 9).

Todos os objetos utilizados no teste de memória de reconhecimento apresentaram texturas, cores e tamanhos similares, mas formas diferentes.

Entre cada Sessão de teste as peças de Lego eram higienizadas com papel toalha e álcool à 10%. Após o teste de cada animal a maravalha era trocada e as paredes e assoalho da arena era higienizadas com álcool a 10%.

A exploração dos objetos foi mensurada usando dois cronômetros para registrar o tempo despendido na exploração dos objetos durante as sessões experimentais. A exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz. Além disto, foi calculado o índice de reconhecimento (IR) para cada animal. O IR é expresso pela razão $T_B/(T_A+T_B)$, sendo:

T_A = tempo explorando o objeto A;

T_B = tempo explorando o objeto B.

Para análise estatística foi utilizado o teste Anova seguido de *Post Hoc* de Tukey.

Figura 9. Ilustração da Arena e da posição dos objetos no Teste de Memória de Reconhecimento. Legenda: TMCP: Teste de Memória de Curto Prazo e TMLP: Teste de Memória de Longo Prazo.

3.4.4.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O teste no LCE ocorreu no 23º dia experimental, ou seja, após 48 horas da última ingestão de etanol dos animais.

Os animais foram colocados no meio do LCE com a cabeça direcionada para o braço fechado. Foi aferido o Tempo e Número de Entradas dos braços abertos e braços fechados. Entre os animais o LCE foi limpo com álcool a 10%.

As sessões de teste no LCE foram filmadas e analisadas posteriormente. Foram analisadas a porcentagem de frequência nos braços abertos (%FA), calculada pela fórmula: $\%FA = \frac{\text{número de entradas nos braços abertos} \times 100}{(\text{número de entrada nos braços abertos} + \text{número de entrada nos braços fechados})}$, a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%TA), pela fórmula $\%TA = \frac{\text{número de entradas nos braços abertos} \times 100}{(\text{tempo despendido nos braços abertos} + \text{tempo despendido nos braços fechados})}$ e o número de entradas nos braços fechados do labirinto. A Figura 10 representa o LCE.

Figura 10. Vista Superior do Labirinto em Cruz Elevado.

3.4.5 Método de Eutanásia

Após o término dos procedimentos experimentais os animais foram submetidos a injeção intraperitoneal de Uretana (25%; 5ml/kg; i.p.). Em seguida, os animais mortos foram transferidos para o Biotério Central para incineração.

3.4.6 Análise dos dados

Os dados comportamentais extraídos do LAM foram submetidos a uma Anova de Medidas Repetidas, com exceção da análise do *Pobre Trial* que foi realizada por meio de uma Anova de uma via e a comparação entre a tentativa 24 com a tentativa 25, que foi realizada por meio do teste T para amostras pareadas. Os dados relativos ao TMR foram tratados estatisticamente pelo teste *T* de *Student* para amostras pareadas e Anova de uma via. Para análise dos dados do LCE foi utilizada a Anova de uma via. Para todos os testes foi utilizado o teste Post Hoc de Tukey. Os resultados foram considerados significantes quando o *p* valor $<0,05$. Para comparação da concentração de etanol sanguíneo entre os grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

IV. RESULTADOS

ESTUDO I

ESTUDO I. Investigação da memória e sua correlação com a ansiedade em animais submetidos ao consumo etílico semivoluntário.

Objetivo: *Investigar o comportamento no Labirinto Aquático de Morris (LAM), no Teste de Memória de Reconhecimento (TMR) e no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) dos animais com abstinência após o consumo semivoluntário crônico ou agudo de Etanol.*

Animais e grupos de estudo: Foram utilizados neste experimento 92 ratos, sendo que 12 foram utilizados para o estudo da etanolemia, 30 foram testados no LAM, 24 fizeram parte do TMR e 26 compuseram o experimento do LCE.

Procedimentos: Os procedimentos foram conduzidos conforme descritos no item “procedimentos” do capítulo de Materiais e Métodos.

RESULTADOS ESTUDO I

4.1 Estudo da linearidade da técnica de alcoolemia

O sinal analítico utilizado para construção da curva de calibração é a razão entre a área integrada do sinal de etanol e a área integrada do sinal de isobutanol. A curva de calibração demonstrou que o método apresenta linearidade na faixa de concentração utilizada como controle. A faixa de concentração (g/L) utilizada foi de 0,0358; 0,1430; 0,2653 e 0,54072. A equação da regressão linear da curva de calibração foi $S=0,2651c+0,0077$ (S: razão entre área integrada de etanol e isobutanol, c: concentração de etanol), com coeficiente de correlação de $R^2= 0,9995$ (Figura 11).

Figura 11: Curva de calibração obtida utilizando soluções padrões de etanol e padrão interno (isobutanol) para determinação de etanol em amostras de sangue de rato após separação por cromatografia a gás (CG) e detecção por ionização em chama (FID). O sinal analítico obtido é referente a razão entre a área integrada do pico de etanol e a área integrada do pico de isobutanol. A equação da regressão linear da curva de calibração foi $S=0,2651c+0,0077$ (S: razão entre área integrada de etanol e isobutanol, c: concentração de etanol), com coeficiente de correlação de $R^2=0,9995$.

A figura 12 ilustra a concentração de etanol no sangue (g/L) dos animais, 48 horas após ao último consumo de etanol. Foi considerado como critério para presença de etanol no tecido sanguíneo a concentração de etanol maior ou igual a 0,1 g/L. Nenhuma amostra de tecido apresentou resultado positivo para a presença de etanol no tecido. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 2. O teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* não identificou diferenças estatísticas significantes entre os grupos estudados ($p>0,05$).

Figura 12. Concentração de etanol no sangue (g/L) dos animais submetidos ao consumo semivoluntário agudo OU crônico de etanol, após 48 horas de abstinência de etanol. As barras indicam a concentração média+Erro Padrão da Média (EPM) de etanol no sangue de ratos com abstinência de etanol por 48 horas, submetidos ao consumo semivoluntário de etanol, durante um (agudo) ou 21 dias (crônico), ou ao consumo semivoluntário de água. A concentração de etanol foi calculada a partir da razão entre área do pico de etanol e a área de pico de isobutanol. O teste *Kruskal-Wallis* não identificou diferença entre os grupos estudados ($p>0,05$). Cada Grupo foi composto por quatro animais.

4. 2 Labirinto Aquático de Morris (LAM)

4.2.1 Fase de Aquisição de aprendizagem no LAM

No primeiro dia de teste observaram-se maiores velocidades médias de nado nos animais submetidos ao consumo agudo de etanol, porém no segundo dia de teste as maiores velocidades médias foram do grupo submetido ao consumo crônico de etanol. Em ambos os dias de teste o grupo controle (água) obteve menor velocidade média de nado (Figura 13).

No primeiro dia de teste foi observada diferença significativa referente a velocidade de natação entre os grupos estudados ($F_{2,29}= 4,495$; $p<0,05$). O teste *Post Hoc* de *Tukey* identificou que esta diferença ocorreu entre o grupo controle (Água) e o grupo submetido ao consumo Agudo de Etanol ($p<0,05$).

No segundo dia de teste, que corresponde às Tentativas 13 à 24, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados quanto a velocidade de natação ($F_{2,29}=0,817$; $p>0,05$).

Ao se comparar estatisticamente as velocidades de nado nas 24 tentativas (dia 1 e dia 2), não foram observadas diferenças ($F_{2,29}=2,125$; $p>0,05$).

A comparação entre a velocidade de natação da última Tentativa do dia 1 com a primeira Tentativa do dia 2 (Tentativas 12 *versus* 13) revelou significativa diferença entre os grupos ($F_{2,29}= 3,647$; $p<0,05$). O teste *Post Hoc* de *Tukey* identificou que a diferença estava presente entre o grupo controle e o grupo submetido ao consumo Crônico de Etanol ($p<0,05$).

O gráfico 14 ilustra o tempo médio que cada grupo dispendeu para encontrar a plataforma, em segundos. Este parâmetro também é chamado de Latência de Fuga. O gráfico demonstra o efeito da aprendizagem no decorrer das Tentativas, pois em todos os grupos houve uma latência menor de fuga nas últimas Tentativas, tanto no dia 1, quanto no dia 2.

A análise da Latência de Fuga dos grupos estudados não revelou diferenças significantes no primeiro dia de teste ($F_{2,29}= 0,150$; $p>0,05$), no segundo dia ($F_{2,29}=0,393$; $p>0,05$) e nem ao se comparar as 24 Tentativas ($F_{2,29}=0,272$; $p>0,05$). Não houve diferença significativa ao se comparar a tentativa 12 com a Tentativa 13 ($F_{2,29}=0,789$; $p>0,05$).

Figura 13- Velocidade de nado dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), nas 24 tentativas da fase de aquisição de aprendizagem do Labirinto Aquático de Morris. Os animais foram submetidos ao consumo semivoluntário de etanol, durante um (agudo) ou 21 dias (crônico), ou ao consumo semivoluntário de água e foram submetidos ao teste do Labirinto Aquático de Morris após 48 horas de abstinência ao etanol. As linhas indicam as médias+Erro Padrão da Média (EPM) da velocidade média de natação, em cm/s nas 24 tentativas. O símbolo * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle (Água) e o grupo semivoluntário Agudo Etanol, no primeiro dia de teste e o símbolo # indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo submetido ao consumo crônico de etanol ao se comparar a Tentativa 12 (primeiro dia) e a Tentativa 13 (segundo dia) (ANOVA de medidas repetidas seguida de *Tukey*). Cada grupo foi composto por 10 animais.

Figura 14- Latência de Fuga dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), nas 24 tentativas da fase de aquisição de aprendizagem do Labirinto Aquático de Morris. As linhas indicam as médias+EPM da latência para encontrar a plataforma nas 24 tentativas. Não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados (ANOVA de medidas repetidas). Cada grupo foi composto por 10 animais. Maiores especificações do experimento no texto ou na Figura 13.

4.2.2 Resultados do *Probe Trial*

Após a última tentativa do segundo dia foi realizado o *Pobre Trial*, nesta etapa a plataforma era retirada e os animais eram colocados na piscina por 180 segundos. Para análise, o tempo foi dividido em três blocos de 60 segundos cada. Foi analisado o tempo despendido em cada quadrante em cada bloco de tempo e no tempo total de 180 segundos (Figuras 15, 16, 17 e 18).

No primeiro momento do *Pobre Trial* (primeiro minuto) foi observado um tempo maior de natação no quadrante 1, onde antes estava localizado a plataforma, em relação aos demais quadrantes, o que foi identificado pelo Teste T para amostra pareada como significativo para os três grupos estudados ($P < 0,05$) (Figura 15).

O teste Anova não revelou diferenças entre os grupos nos quadrantes 1, 2, 3 e 4 (Q1: $F_{2,29}=1,702$; $p > 0,05$; Q2: $F_{2,29}=0,775$; $p > 0,05$; Q3: $F_{2,29}=0,714$; $p > 0,05$; Q4: $F_{2,29}=0,106$; $p > 0,05$).

Figura 15- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), em cada quadrante no primeiro minuto do *probe trial*. Legenda: Q1: Quadrante 1; Q2: Quadrante 2; Q3: Quadrante 3 e Q4: Quadrante 4. As barras indicam Média+EPM do tempo em segundos dispendido pelos diferentes grupos experimentais em cada Quadrante de 0 a 60 segundos do *Probe Trial* (prova de verificação da aquisição de memória). Os animais foram submetidos ao consumo semivoluntário de etanol, durante um (agudo) ou 21 dias (crônico), ou ao consumo semivoluntário de água e foram submetidos ao teste do Labirinto Aquático de Morris após 48 horas de abstinência ao etanol. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos em cada quadrante estudado (Anova). O símbolo * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos estudados ao se comparar o tempo de exploração no Quadrante 1 com os demais quadrantes (Anova). Maiores especificações a respeito do experimento encontram-se ao longo do texto. Cada grupo foi composto por 10 animais.

Em relação ao segundo bloco de tempo, ou seja, o tempo de natação de 60 a 120 segundos, também foram observados maior tempo de natação no Quadrante 1. O teste T para amostras pareadas identificou significantes diferenças entre os grupos Controle e Crônico Etanol ao se comparar o tempo de nado entre o Quadrante (Q) 1 e Q2 ($p < 0,05$); Q1 e Q3 ($p < 0,05$) mas não na comparação de Q1 e Q4 ($p > 0,05$). Já ao se comparar o grupo controle com o Agudo Etanol houve significantes diferenças na comparação entre todos os quadrantes com o quadrante 1 ($p < 0,05$) (Figura 16).

O teste Anova não revelou diferenças entre os grupos nos quadrantes 1, 2, 3 e 4 (Q1: $F_{2,29}=0,475$; $p > 0,05$; Q2: $F_{2,29}=0,146$; $p > 0,05$; Q3: $F_{2,29}=0,248$; $p > 0,05$; Q4: $F_{2,29}=0,912$; $p > 0,05$).

Figura 16- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), em cada quadrante no segundo minuto do *probe trial*. As barras indicam Média +EPM do tempo em segundos dispendido em cada Quadrante por cada grupo experimental de 60 a 120 segundos do *Probe Trial*. O teste Anova não identificou diferença entre os grupos ao se comparar o tempo de exploração no Quadrante 1 com o tempo nos demais Quadrantes. Maiores especificações do experimento no texto ou na figura 15. Cada grupo foi composto por 10 animais. Legenda: Q1: Quadrante 1; Q2: Quadrante 2; Q3: Quadrante 3 e Q4: Quadrante 4.

No último Bloco de tempo (de 120 a 180 segundos) ao se comprar o Grupo Controle com o Crônico Etanol foi observado diferença significativa pelo Teste T pareado apenas ao se comparar Q1 e Q2 ($p < 0,05$), não sendo demonstradas diferenças na comparação entre Q1 e Q3 ($p > 0,05$) e Q1 e Q4 ($p > 0,05$). Porém, ao se comparar o grupo Controle com o Agudo Etanol esta diferença ocorreu apenas na comparação de Q1 com Q2 ($p < 0,05$) (Q1 versus Q3: $p > 0,05$ e Q1 versus Q4: $p > 0,05$).

O teste Anova não revelou diferenças entre os grupos nos quadrantes 1, 2 e 4 (Q1: $F_{2,29}=2,253$; $p > 0,05$; Q2: $F_{2,29}=0,552$; $p > 0,05$; Q4: $F_{2,29}=1,426$; $p > 0,05$). Porém foi encontrada diferença significativa entre os grupos na exploração do Quadrante 3 ($F_{2,29}= 4,069$; $p < 0,05$). O teste *Post Hoc* de *Tukey* identificou que esta diferença ocorre entre os grupos Controle e Crônico Etanol ($p < 0,05$), mas não ocorre entre o Controle e o Agudo Etanol ($p > 0,05$). (figura16).

Figura 17- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), em cada quadrante no terceiro minuto do *probe trial*. As barras indicam Média +EPM do tempo em segundos dispendido em cada Quadrante por cada grupo experimental de 120 a 180 segundos do *Probe Trial*. Legenda: Q1: Quadrante 1; Q2: Quadrante 2; Q3: Quadrante 3 e Q4: Quadrante 4. Cada grupo foi composto por 10 animais. O símbolo * indica $p < 0,05$ entre o grupo Controle e Semivoluntário Crônico Etanol, de acordo com o teste Anova e *Post Hoc* de Tukey. Maiores especificações a respeito do experimento do texto ou na figura 13. Cada grupo foi composto por 10 animais.

Com relação a somatória do tempo total de natação, o teste Anova não revelou diferenças entre os grupos nos quadrantes 1, 2 e 4 (Q1: $F_{2,29}=0,086$; $p > 0,05$; Q2: $F_{2,29}=1,214$; $p > 0,05$ e Q4: $F_{2,29}=0,393$; $p > 0,05$). Porém significativa diferença foi evidenciada no tempo total de natação no quadrante 3 ($F_{2,29}=4,075$; $p < 0,05$). O teste *Post Hoc* de Tukey identificou que estas diferenças ocorreram entre o Grupo Controle e o Grupo Agudo Etanol ($p < 0,05$) e identificou uma tendência significativa entre os grupos Controle e Crônico Etanol ($0,05 > p < 0,10$).

Figura 18- Tempo total de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), em cada quadrante no *probe trial*. As barras indicam Média +EPM do tempo em segundos dispendido em cada Quadrante por cada grupo experimental no *Probe Trial*. Legenda: Q1: Quadrante 1; Q2: Quadrante 2; Q3: Quadrante 3 e Q4: Quadrante 4. O símbolo * indica $p < 0,05$ de acordo com o teste Anova e *Post Hoc* de Tukey entre os grupos Controle e semivoluntário Agudo Etanol. Cada grupo foi composto por 10 animais.

4.2.3 Teste de Retenção de Memória

Após 28 dias do segundo dia de teste os animais foram novamente submetidos a uma tentativa final. Nesta tentativa foi observada a latência para encontrar a plataforma (latência de fuga) e a velocidade média de natação entre os grupos estudados.

O teste Anova evidenciou diferenças significantes na latência de fuga entre os grupos Água e Agudo Etanol ($F_{2,29}=5,134$; $p < 0,05$) mas não identificou entre o grupo Água e Crônico Etanol ($F_{2,29}=0,660$; $p > 0,05$) e entre os grupos Crônico e Agudo Etanol ($F_{2,29}=2,102$; $p > 0,05$) (Figura 19).

Ao se comparar a Latência de Fuga da Tentativa 24 com a Latência de fuga no reteste, o teste T para amostras pareadas evidenciou diferenças significantes entres os grupos Água (controle) e Crônico Etanol ($p < 0,05$), Água (controle) e Agudo Etanol ($p < 0,05$) e Crônico e Agudo Etanol ($p < 0,05$) (Figura 19).

Figura 19. Latência de Fuga dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), no teste de retenção de memória do Labirinto Aquático de Morris. As barras indicam Média +EPM da latência para encontrar a plataforma (em segundos) no Reteste, após 28 dias do segundo dia de teste no Labirinto Aquático de Morris. O símbolo # indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle (Água) e Semivoluntário Agudo Etanol. O símbolo *, & e + indicam diferenças significantes entre a Tentativa 24 e o reteste entre os grupos Água (controle) e Crônico Etanol; Água (controle) e Agudo Etanol e semivoluntário Crônico Etanol e semivoluntário Agudo Etanol, respectivamente (testes Anova e Teste T para amostras pareadas). Cada grupo foi composto por 10 animais.

Outro parâmetro investigado no reteste foi a velocidade de natação dos animais. O teste Anova não evidenciou diferenças significantes entre os grupos do estudo ($F_{2,29}=0,471$; $p > 0,05$) (Figura 19).

Ao se comparar a velocidade de natação da Tentativa 24 com a do reteste, o teste T para amostras pareadas também não demonstrou diferenças significantes entres os grupos Água (controle) e Crônico Etanol ($p > 0,05$), Água (controle) e Agudo Etanol ($p > 0,05$) e Crônico e Agudo Etanol ($p > 0,05$) (Figura 20).

Figura 20. Velocidade de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), no teste de retenção de memória do Labirinto Aquático de Morris.. As barras indicam Média +EPM da latência para encontrar a plataforma (em segundos) no Reteste, após 28 dias do segundo dia de teste no Labirinto Aquático de Morris. Para maiores especificações consultar a figura 19. Cada grupo foi composto por 10 animais.

4.3 Teste da Memória de Reconhecimento (TMR)

Foram analisados o Tempo de Exploração dos objetos (objeto Familiar + Objeto Novo) e o Índice de Reconhecimento dos objetos Novos (Tempo de exploração do Objeto novo/ (Tempo de exploração do Objeto novo + Tempo de exploração do Objeto Familiar).

No que diz respeito ao Tempo de exploração dos objetos foi observado que os animais do grupo controle (Água) apresentaram maior média de tempo de exploração quando comparados aos animais submetidos ao consumo crônico e Agudo de Etanol, tanto na Sessão de Treino, quanto na Sessão de teste da Memória de Curto Prazo (TMCP) e na Sessão de Teste da Memória de Longo Prazo (TMLP) (Figura 21).

O Teste Anova não evidenciou diferenças estatísticas significantes no tempo de exploração na sessão de treino, no teste da Memória de Curto Prazo (TMCP) e no Teste da Memória de Longo Prazo (TMLP) entre os grupos estudados ($F_{2,29}=1,839$; $p>0,05$; $F_{2,29}=0,444$; $p>0,05$ e $F_{2,29}=0,628$; $p>0,05$, respectivamente).

Ao comparar as médias de exploração na Sessão Treino com a Sessão de TMCP e com a Sessão de TMLP não foram observadas significantes diferenças pelo

teste Anova ($F_{2,29}=1,221$; $p>0,05$ e $F_{2,29}=1,241$; $p>0,05$, respectivamente). Ainda, não foram identificadas diferenças significativas ao se comparar a Sessão de TMCP com a de TMLP ($F_{2,29}=0,513$; $p>0,05$).

As médias de índice de reconhecimento (IR) estão apresentadas na figura 22. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos de estudo quanto ao IR na Sessão Treino e na Sessão de TMCP ($F_{2,29}=0,989$; $p>0,05$; $F_{2,29}=0,06$; $p>0,05$, respectivamente). Porém houve diferenças entre os grupos estudados na Sessão de TMLP ($F_{2,29}=3,827$; $p<0,05$). O teste *Post Hoc* de *Tukey HSD* evidenciou que esta diferença se encontra entre o grupo controle (Água) e o Agudo Etanol ($p<0,05$), não havendo diferenças entre os grupos controle e o grupo Crônico Etanol ($p>0,05$).

Ao se comparar os IR dos grupos de estudo nas três Sessões de teste, ou seja, Treino, TMCP e TMLP o Teste Anova de medidas repetidas não identificou diferenças entre os grupos ($F_{2,29}=2,265$; $p>0,05$). Ao se comprar o IR da Sessão de Treino com o IR da Sessão de TMCP também não foram encontradas diferenças expressivas estatisticamente ($F_{2,29}=0,201$; $p>0,05$). Porém, ao se comprar a IR da Sessão Treino com a TMLP foi observada diferença significativa $F_{2,29}=4,195$; $p<0,05$) e o teste *Post Hoc* de *Tukey HSD* identificou que esta diferença ocorre entre o grupo Controle e o Agudo Etanol ($p<0,05$), não havendo diferença estatística, embora haja uma tendência, entre o grupo Controle e o Crônico Etanol ($0,05>p<0,07$).

Ainda, Foi comparado o IR da Sessão TMCP com a de TMLP e não foram observadas significantes diferenças ($F_{2,29}=1,665$; $p>0,05$).

Figura 21. Tempo Total médio de exploração dos objetos (Familiar e Novo) dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), na Sessão de Treino, de Teste de Memória de Curto Prazo e Teste de Memória de Longo Prazo. Os animais foram submetidos ao consumo semivoluntário de etanol, durante um (agudo) ou 21 dias (crônico), ou ao consumo semivoluntário de água e foram submetidos ao teste de Memória de Reconhecimento após 48 horas de abstinência ao etanol. As barras indicam Média +EPM do tempo de exploração dos objetos (segundos) na Sessão Treino, na TMCP e na TMLP. Legenda: TMCP: Sessão de Teste de Memória de Curto Prazo; TMLP: Sessão de Teste da Memória de Longo Prazo. Cada grupo foi composto por oito animais.

Figura 22. Índice de Reconhecimento dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água), na Sessão de Treino, de Teste de Memória de Curto Prazo e Teste de Memória de Longo Prazo. Índice de Reconhecimento expresso pelo cálculo (Tempo de exploração do Objeto novo/ (Tempo de exploração do Objeto novo + Tempo de exploração do Objeto Familiar). nos grupos estudados, na Sessão de Treino, de Teste de Memória de Curto Prazo e Teste de Memória de Longo Prazo. Legenda: TMCP: Sessão de Teste de Memória de Curto Prazo; TMLP: Sessão de Teste da Memória de Longo Prazo. * e # indicam $p < 0,05$ segundo o Teste Anova. Para maiores informações consultar o texto ou a figura 21.

4.4 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A Figura 23 é constituída por dois painéis. O painel superior ilustra a frequência de entrada nos braços fechados (FF) enquanto o painel inferior mostra a porcentagem de entrada nos braços abertos (%FA- barras claras) e à porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%TA-barras escuras).

Neste estudo, a Anova de uma via não revelou diferença estatisticamente significativa da FF, da %FA e da %TA ($F_{2,25}=0,912$; $p > 0,05$; $F_{2,25}=0,230$; $p > 0,05$ e $F_{2,25}=0,046$; $p > 0,05$, respectivamente).

Figura 23. Resultados do Labirinto em Cruz Elevado dos animais em abstinência do etanol (após o consumo semivoluntário Agudo ou Crônico de etanol) e de um grupo controle (consumo semivoluntário de água). Os animais foram submetidos ao consumo semivoluntário de etanol, durante um (agudo) ou 21 dias (crônico), ou ao consumo semivoluntário de água e foram submetidos ao teste do Labirinto Aquático de Morris após 48 horas de abstinência ao etanol. Legenda: o painel superior mostra as médias+EPM da Frequência de Entradas nos Braços Fechados (FF). O painel inferior apresenta as médias+EPM da porcentagem de Entrada nos Braços Abertos %FA (barras Claras) e da Porcentagem de Tempo despendido nos Braços Abertos %TA (barras escuras). O número inferior indica o número de animais em cada grupo. Para maiores informações consultar o texto.

V. DISCUSSÃO

ESTUDO I

No LAM alguns parâmetros são de interesse para o estudo dos efeitos da exposição ao etanol em animais. Dentre eles estão a velocidade de nado e a latência de fuga.

Cabe salientar que neste estudo os animais foram testados em fase de abstinência etílica. Para confirmação da abstinência etílica foi realizado a alcoolemia destes animais após 48 horas da última ingestão de etanol.

Os resultados não indicaram presença significativa de etanol no sangue dos animais. Foi considerado como positivo valores maiores que 0,1 g/L de sangue, e desta forma, nenhum animal apresentou resultado positivo para os níveis de etanol no sangue. Este achado vai de encontro com o estudo de Livy e colaboradores (2003) que observaram um significativo declínio da concentração de etanol após 500 minutos da ingestão, tanto em ratos quanto em camundongos.

No primeiro dia de teste no LAM (Tentativas de 1 a 12) foi observada diferença estatisticamente significativa entre as velocidades de nado entre os grupos. Esta diferença ocorreu entre os grupos Água e Agudo Etanol. Já no segundo dia de teste, embora não tenham sido evidenciadas diferenças significantes pelo teste estatístico, pode-se claramente observar uma velocidade de nado maior nos grupos expostos ao etanol (Agudo e principalmente Crônico) quando comparado aos animais do grupo controle.

Dados do nosso grupo de pesquisa indicaram que a abstinência ao etanol é capaz de promover o aumento da ansiedade, observado pela diminuição do número de entradas nos braços abertos no teste do Labirinto em Cruz Elevado (PADOVAN; PADOVAN *in prep.*).

Assim, para elucidação das causas deste aumento da velocidade de nado nestes animais com abstinência ao etanol foi realizado o teste do LCE. Neste teste não houve diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Também não foram observadas diferenças na porcentagem de tempo despendido nos braços abertos e na porcentagem de número de entrada nos braços abertos.

Desta forma, os achados do LCE discordam com a literatura da área que prevê um aumento dos níveis de ansiedade em animais em abstinência. De acordo com a literatura, o etilismo promove desordens de ansiedade como consequência do uso prolongado da substância e/ou pela Síndrome de abstinência, ao cessar o consumo (KUSHNER *et al.*, 2000).

Talvez estes níveis elevados de ansiedade não tenham sido evidenciados pela baixa dose de etanol aos quais foram submetidos estes animais (6%) e/ou pelo período de tempo no qual os animais foram expostos ao consumo de Etanol. A grande variedade de protocolos para consumo etílico presentes na literatura dificultam a discussão destes achados. Segundo Garcia-Moreno (2002) as discrepâncias encontradas entre os resultados descritos na literatura referente aos efeitos do etanol e memória podem ser explicados pelas condições experimentais, devido ao tempo e à magnitude das alterações neuropatológicas que dependem da duração do consumo de etanol e de sua retirada (PAULA-BARBOSA, 1993).

Ainda, não se pode garantir a quantidade de líquido ingerido por estes animais durante os 21 dias de exposição ao etanol, visto que para realização deste controle seria necessária a coleta de sangue diária para determinação da alcoolemia, o que *per se* já causaria um aumento dos níveis de ansiedade devido ao procedimento invasivo.

Outro fator a ser discutido é a interferência sazonal no desempenho de ratos no LCE já observada em nosso laboratório. Os dados foram coletados durante o inverno e frequentemente padrões atípicos em testes de ansiedade têm sido observados pelos pesquisadores de nosso laboratório. Para elucidar esta interferência, seria necessário um estudo a respeito da influência sazonal no desempenho de animais naipes nos testes de Ansiedade.

Ademais, o fato de não haver diferenças significativas no número de entrada dos braços fechados nos indica que não havia alteração locomotora nos grupos estudados. Isto nos permite concluir que o aumento significativo da velocidade de natação no primeiro dia do grupo Agudo Etanol não ocorreu por alterações locomotoras.

Outro parâmetro estudado foi a latência de fuga. Verificou-se que as latências para encontrar a plataforma foram menores no segundo dia do que no primeiro de teste em todos os grupos estudados. Este achado está de acordo com a literatura onde em diferentes modelos experimentais o mesmo padrão foi encontrado (CHIN *et al.*, 2011; D'HOOGE & DE DEYN, 2001). Esta diminuição da latência de fuga no decorrer das tentativas nos indica que todos os animais foram capazes de aprender e memorizar as pistas distais que os levariam até o alvo (plataforma).

Na tentativa 1 observa-se que a maior média de latência foi a do grupo submetido ao consumo crônico de etanol, seguido pelo consumo agudo de etanol. Desta forma, as menores latências encontradas nesta tentativa foi a do grupo controle.

Os achados da Tentativa 13 e da comparação entre a tentativa 12 e 13 são de extrema importância, pois nos indica o efeito de retenção mnemônica da tarefa, visto que a tentativa 13 ocorre 24 horas após a tentativa 12. Nesta comparação estatística também não houve diferenças significativas entre os grupos estudados.

Após a última tentativa do segundo dia (tentativa 24) foi realizado o *Pobre Trial*. Esta prova avalia a consolidação de memória ao verificar a manutenção das estratégias para encontrar a plataforma no Quadrante 1. Para verificar a extinção do comportamento de buscar a plataforma no quadrante 1, esta prova teve o tempo total de 180 segundos, separadas para análise em três blocos de um minuto cada. No momento um (primeiros 60 segundos) foi observada diferença significativa entre a exploração do quadrante 1 e dos demais quadrantes na comparação dos achados do grupo Controle tanto com o grupo Crônico Etanol quanto com o Agudo Etanol.

É possível verificar graficamente um número mais elevado do tempo dispendido no Quadrante 1, em comparação com os demais quadrantes. Isto demonstra que a memória visuoespacial foi consolidada. No segundo bloco de tempo (Figura 13) embora seja observada uma redução do número de exploração do quadrante 1 em comparação com o primeiro minuto da prova, ainda assim os animais de todos os grupos dispenderam mais tempo no Quadrante 1. Por fim, no último bloco de tempo (120-180 segundos) houve uma diminuição novamente da exploração do Quadrante 1, quando comparada aos demais blocos de tempo.

Outro achado que deve ser discutido é o fato de que no último minuto o grupo controle alterou suas estratégias para encontrar a plataforma, aumentando a exploração do quadrante 3 (quadrante diametralmente oposto ao quadrante 1) em detrimento da exploração do Quadrante 1.

Quanto aos resultados do reteste, que avalia a memória de longo prazo (após 28 dias da realização do *Pobre Trial*), foram evidenciadas diferenças estatísticas entre o grupo controle e o grupo submetido ao consumo agudo de etanol na latência para encontrar a plataforma. Para este parâmetro, não foram evidenciadas diferenças entre o grupo controle e o grupo crônico Etanol. Desta forma,

aparentemente o grupo submetido ao consumo agudo de etanol foi o que apresentou mais dificuldades em evocar as estratégias e utilizar as pistas distais para encontrar a plataforma, mesmo após um período de abstinência ao etanol de 30 dias. Este achado concorda com o estudo conduzido por Matthews e colaboradores (2002) que concluíram que administração aguda de etanol acarreta prejuízos na prova de memória espacial do labirinto de Morris.

Ainda a respeito da dose de etanol utilizada, Novier et al. (2012) verificaram que baixas doses não prejudicaram significativamente a memória espacial em ratos adultos e adolescentes. O mesmo resultado foi encontrado no presente estudo, onde se observou que o consumo crônico de etanol 6% v/v por 21 dias não prejudicou de forma significativa a memória espacial quando comparada aos demais grupos estudados.

Em relação ao desempenho para encontrar a plataforma nas diferentes tentativas, foi observada uma diminuição da latência ao longo das tentativas, sendo as latências das tentativas finais de cada dia menores que as encontradas nas latências iniciais. Embora os animais submetidos ao consumo de etanol apresentem latências maiores que o grupo controle esta diferença não foi significativa. Embora nossos dados não permitam conclusões definitivas, observa-se que as latências para encontrar a plataforma nas tentativas iniciais são aumentadas para os grupos submetidos ao consumo crônico de etanol, o que sugere uma dificuldade inicial em estabelecer as pistas distais e utiliza-las.

Outro paradigma experimental utilizado no estudo da memória é o teste de memória de reconhecimento (TMR). Este teste foi idealizado tendo por base o comportamento exploratório natural de ratos frente a objetos novos, não familiares (ENNACEUR e DELACOUR, 1988). Este teste tem sido demonstrado como eficaz na avaliação de memória de curto e longo prazo em animais, ao se mensurar a exploração de objetos novos em detrimento aos objetos familiares (CRUZ, ET AL., 2009).

No presente estudo não foram evidenciadas diferenças significantes entre os grupos quanto ao tempo de exploração dos objetos nas sessões Treino, TMCP e TMLP. Porém, quanto ao Índice de Reconhecimento (IR) do objeto novo foi observada diferença significativa entre os grupos na Sessão de TMLP. Esta diferença ocorreu entre o grupo controle e o grupo Agudo Etanol. Ainda, ao se

comparar o IR da Sessão Treino com o IR da Sessão de TMLP houve diferença significativa, também entre o grupo controle e o grupo Agudo Etanol. Estes achados de prejuízo na memória de Longo prazo nos animais submetidos ao consumo agudo de etanol concordam com os nossos resultados do reteste no LAM, em que diferenças estatísticas entre o grupo exposto ao consumo agudo e o grupo controle também foram observadas.

Estes achados demonstram que os animais submetidos ao tratamento agudo com etanol apresentaram alterações de memória de reconhecimento mais acentuadas que o grupo submetido ao consumo crônico de etanol. Porém, outros estudos devem ser conduzidos a fim de comprovar que este teste é sensível para detectar as alterações de memória ocasionadas pela abstinência ao etanol.

Dados da literatura demonstram o caráter seletivo das alterações cognitivas em decorrência do consumo agudo de etanol, que parece alterar mais acentuadamente uma tarefa de memória espacial do que a não espacial (SILVERS, 2003).

VI. CONCLUSÃO

ESTUDO I

- A abstinência ao etanol após o consumo agudo ou Crônico de etanol não foi capaz de alterar a aprendizagem e a memória espacial no LAM, porém prejuízos na memória espacial de longo prazo foram observados nos animais submetidos ao consumo agudo de etanol.
- Não foram observadas alterações na Memória de Reconhecimento na Sessão treino e na Memória de Reconhecimento de Curto prazo, porém a exposição aguda ao etanol foi capaz de gerar prejuízos na memória de Reconhecimento de Longo Prazo.
- Não houve diferenças nos níveis de ansiedade dos animais do estudo, porém novos estudos devem ser conduzidos para melhor compreensão deste resultado.

VII. RESULTADOS

ESTUDO II

Estudo II. Investigação da memória e sua correlação com a ansiedade em animais submetidos ao consumo etílico involuntário.

Objetivo: *Investigar o comportamento de ratos no Labirinto Aquático de Morris (LAM), no Teste de Memória de Reconhecimento (TMR) e no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) dos animais em abstinência de etanol após o consumo Involuntário crônico ou agudo de etanol.*

Animais e grupos de estudo: Foram utilizados neste experimento 104 animais, sendo que 12 foram utilizados para o estudo da etanolemia, 43 foram testados no LAM, 24 fizeram parte do TMR e 25 compuseram o experimento do LCE.

Procedimentos: Os procedimentos foram seguidos conforme descritos no item *Procedimentos* dos Materiais e Métodos.

7.1 Estudo da linearidade da técnica de etanolemia

O sinal analítico utilizado para construção da curva de calibração foi expresso pela razão entre a área integrada do sinal de etanol e a área integrada do sinal de isobutanol. A curva de calibração demonstrou que o método apresenta linearidade na faixa de concentração utilizada como controle. A equação da regressão linear da curva de calibração foi $S=0,2651c+0,0077$ (S: razão entre área integrada de etanol e isobutanol, c: concentração de etanol), com coeficiente de correlação de $R^2= 0,9995$ (Figura 24).

Figura 24: Curva de calibração obtida utilizando soluções padrões de etanol e padrão interno (isobutanol) para determinação de etanol em amostras de sangue de rato após separação por cromatografia a gás (CG) e detecção por ionização em chama (FID). O sinal analítico obtido é referente a razão entre a área integrada do pico de etanol e a área integrada do pico de isobutanol. A equação da regressão linear da curva de calibração foi $S=0,2651c+0,0077$ (S: razão entre área integrada de etanol e isobutanol, c: concentração de etanol), com coeficiente de correlação de $R^2=0,9995$.

A figura 25 ilustra a concentração de etanol no sangue (g/L) dos animais, 48 horas após ao último consumo de etanol. Foi considerado como critério para presença de etanol no tecido sanguíneo a concentração de etanol maior ou igual a 0,1 g/L. Nenhuma amostra de tecido apresentou resultado positivo para a presença de etanol no tecido. O teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* não identificou diferença estatística significantes entre os grupos estudados ($p>0,05$).

Figura 25. Concentração de etanol no sangue (g/L) dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água). As barras indicam a concentração média+Erro Padrão da Média (EPM) de etanol no sangue de ratos com abstinência de etanol por 48 horas, submetidos ao consumo involuntário de etanol ou água, durante um (agudo) ou 21 dias, a cada três dias (crônico). A concentração de etanol foi calculada a partir da razão entre área do pico de etanol e a área de pico de isobutanol. O teste *Kruskal-Wallis* não identificou diferença entre os grupos estudados ($p>0,05$). Cada Grupo foi composto por quatro animais.

7.2 Labirinto Aquático de Morris (LAM)

7.2.1 Fase de Aquisição da aprendizagem

No teste do LAM foram analisados a Latência de Fuga e a velocidade de natação dos animais.

A respeito da velocidade média de natação, observou-se no primeiro dia teste que o grupo submetido ao consumo crônico de etanol obteve as menores velocidades médias. Já no segundo dia de teste, embora em algumas tentativas tenha sido observada esta menor velocidade neste grupo, esta diferença não foi tão evidente (Figura 26).

A Anova de Medidas Repetidas não identificou diferenças entre os grupos no primeiro dia de teste ($F_{3,42}=1,397$; $p>0,05$) e nem no segundo dia experimental ($F_{3,42}=0,622$; $p>0,05$). Ao se comparar todas as tentativas dos dias 1 e 2 também não houve diferença significativamente identificada ($F_{3,42}=0,578$; $p>0,05$).

Ainda, foi comparada a velocidade média de nado entre as tentativas T12 e T13, ou seja, a última Tentativa do dia 1 com a primeira Tentativa do Dia 2 e também não foram evidenciadas diferenças entre os grupos ($F_{3,42}=0,578$; $p>0,05$).

Figura 26. Velocidade de nado dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), nas 24 tentativas da fase de aquisição de aprendizagem do Labirinto Aquático de Morris. Os animais foram submetidos ao consumo involuntário de etanol ou água, durante um (agudo) ou 21 dias, a cada três dias (crônico) e foram submetidos ao teste do Labirinto Aquático de Morris após 48 horas de abstinência ao etanol. As linhas indicam as médias+Erro Padrão da Média (EPM) da velocidade média de natação, em cm/s nas 24 tentativas. (ANOVA de medidas repetidas obteve $p > 0,05$ em todas as comparações realizadas). O grupo Involuntário Crônico Água foi composto por 11 animais, o grupo Involuntário Crônico Etanol por 12 animais e os grupos submetidos ao tratamento Agudo (Agudo e Crônico) foi composto por 10 animais cada. Para maiores informações consulte a figura 24 e o texto.

Outro parâmetro de navegação utilizado foi a latência de fuga, ou seja, a latência em segundos que o animal dispendeu para encontrar a plataforma submersa. Nos primeiros dias de teste pode-se observar pela figura 27 que os grupos submetidos ao consumo agudo apresentaram maior latência de fuga e ainda, que as menores latências para encontrar a plataforma foram obtidas pelo grupo submetido ao consumo crônico de água. Embora isto seja observado graficamente, a Anova de Medidas Repetidas não identificou diferenças significantes entre os grupos no primeiro dia, no segundo e nem ao se comparar as 24 tentativas ($F_{3,42}=1,336$; $p>0,05$; $F_{3,42}=1,445$; $p>0,05$ e $F_{3,42}=1,601$; $p>0,05$, respectivamente).

Figura 27. Latência de Fuga dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), nas 24 tentativas da fase de aquisição de aprendizagem do Labirinto Aquático de Morris. Os animais foram submetidos ao consumo involuntário de etanol ou água, durante um (agudo) ou 21 dias, a cada três dias (crônico) e foram submetidos ao teste do Labirinto Aquático de Morris após 48 horas de abstinência ao etanol. As linhas indicam as médias+Erro Padrão da Média (EPM) da velocidade média de natação, em cm/s nas 24 tentativas. O símbolo * representa $p < 0,05$ ao se comparar os grupos submetidos ao consumo involuntário agudo de Água e agudo de etanol (ANOVA de medidas repetidas $p < 0,05$). Para as demais comparações o teste ANOVA de medidas repetidas não identificou diferenças significantes. O grupo Involuntário Crônico Água foi composto por 11 animais, o grupo Involuntário Crônico Etanol por 12 animais e os grupos submetidos ao tratamento Agudo (Agudo e Crônico) foi composto por 10 animais cada. Para maiores informações consulte a figura 24 e o texto.

Ao se comparar a Tentativa 12 com a Tentativa 13 dos quatro grupos estudados, a Anova de Medidas Repetidas revelou diferenças significantes para os grupos estudados ($F_{3,42}=3,339$; $p<0,05$). Esta diferença, segundo o Teste *Post Hoc* de *Tukey*, ocorreu entre os grupos submetidos ao consumo agudo de água e agudo de etanol.

7.2.2 Resultados do *Probe Trial*

Após a última tentativa do Dia II experimental, a plataforma foi retirada e os animais foram expostos ao teste *Pobre Trial* por 180 segundos. Este tempo foi separado em três blocos de 60 segundos, para análise.

Os Gráficos 28, 29, 30 e 31 indicam um maior tempo de natação no quadrante 1, de todos os grupos e em todos os blocos de tempo. Não foram identificadas diferenças estatísticas ao se comparar o tempo despendido em cada Quadrante nos três blocos de tempo (Q1: $F_{3,42}=0,316$; Q2: $F_{3,42}=0,870$; Q3: $F_{3,42}=1,827$ e Q4: $F_{3,42}=0,807$, $p>0,05$).

O teste *T-Student* para amostras pareadas identificou entre os grupos submetidos ao consumo crônico diferença estatística ao se comparar o tempo de exploração do Quadrante 1 com os demais quadrantes no primeiro e no segundo bloco de tempo ($p<0,01$). Porém no terceiro bloco de tempo não houve diferença significativa ao se comparar a exploração do quadrante 1 com a dos quadrantes 2 e 4 ($<0,05p>0,1$ e $p>0,05$, respectivamente).

Quanto aos grupos submetidos ao consumo agudo de água ou etanol, o mesmo teste também identificou diferenças significantes entre a exploração do quadrante 1 e dos demais no primeiro e o segundo bloco de tempo. No terceiro bloco de tempo não foram identificadas diferenças entre a exploração no quadrante 1 e quadrante 3 ($p>0,05$).

Figura 28- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), em cada quadrante no primeiro minuto do *probe trial*. Legenda: Q1: Quadrante 1; Q2: Quadrante 2; Q3: Quadrante 3 e Q4: Quadrante 4. As barras indicam Média+EPM do tempo em segundos dispendido pelos diferentes grupos experimentais em cada Quadrante de 0 a 60 segundos do *Probe Trial* (prova de verificação da aquisição de memória). Os animais foram submetidos ao consumo involuntário de etanol ou água, durante um (agudo) ou 21 dias, a cada três dias (crônico) e foram submetidos ao *probe trial* após 72 horas de abstinência ao etanol. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos em cada quadrante estudado (Anova). Para demais especificações consulte o texto.

Figura 29- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), em cada quadrante no segundo minuto do *probe trial*. Legenda: Q1: Quadrante 1; Q2: Quadrante 2; Q3: Quadrante 3 e Q4: Quadrante 4. As barras indicam Média+EPM do tempo em segundos dispendido pelos diferentes grupos experimentais em cada Quadrante de 60 a 120 segundos do *Probe Trial* (prova de verificação da aquisição de memória). Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos em cada quadrante estudado (Anova). Para demais especificações consulte o texto ou a legenda da figura 28..

Figura 30- Tempo de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), em cada quadrante no terceiro minuto do *probe trial*. Legenda: Q1: Quadrante 1; Q2: Quadrante 2; Q3: Quadrante 3 e Q4: Quadrante 4. As barras indicam Média+EPM do tempo em segundos dispendido pelos diferentes grupos experimentais em cada Quadrante de 0 a 60 segundos do *Probe Trial* (prova de verificação da aquisição de memória). Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos em cada quadrante estudado (Anova). Para demais especificações consulte o texto ou a legenda da figura 28..

Figura 31- Tempo total de natação dos animais submetidos ao consumo involuntário agudo OU crônico de etanol Ou Água, em cada quadrante no *probe trial*. Legenda: Q1: Quadrante 1; Q2: Quadrante 2; Q3: Quadrante 3 e Q4: Quadrante 4. As barras indicam Média+EPM do tempo em segundos dispendido pelos diferentes grupos experimentais em cada Quadrante de 0 a 60 segundos do *Probe Trial* (prova de verificação da aquisição de memória). Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos em cada quadrante estudado (Anova). Para demais especificações consulte o texto ou a legenda da figura 28.

7.2.3 Teste de Retenção de Memória

Após 28 dias do término do *Pobre Trial* foi realizado o reteste dos animais. Neste evento foram avaliadas a velocidade de natação e a latência de fuga.

O teste Anova de uma via não identificou diferença significativa entre os grupos estudados para o parâmetro latência de fuga ($F_{3,42}=1,280$; $p>0,05$). Ainda, foi realizada a comparação entre a latência de fuga da tentativa 24 com a do Reteste e também não foram identificadas diferença estatísticas entre os grupos ($F_{3,42}=1,361$; $p>0,05$) (Figura 32).

Figura 32. Latência de Fuga dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), no teste de retenção de memória do Labirinto Aquático de Morris. As barras indicam Média+EPM do tempo em segundos dispendido pelos diferentes grupos experimentais em cada Quadrante de 0 a 60 segundos do *Probe Trial* (prova de verificação da aquisição de memória). Os animais foram submetidos ao consumo involuntário de etanol ou água, durante um (agudo) ou 21 dias, a cada três dias (crônico) e foram submetidos ao *probe trial* após 72 horas de abstinência ao etanol. O teste anova não identificou diferenças significantes entre os grupos. O grupo Involuntário Crônico Água foi composto por 11 animais, o grupo Involuntário Crônico Etanol por 12 animais e os grupos submetidos ao tratamento Agudo (Agudo e Crônico) foi composto por 10 animais cada. Para maiores informações consulte o texto.

Quanto ao parâmetro velocidade, também não foram encontradas diferenças entre os grupos no reteste e na comparação entre a tentativa 24 e o reteste (Figura 33). Para uma análise mais detalhada foi analisado estatisticamente os animais

submetidos ao consumo crônico e agudo, separadamente. Nesta comparação observou-se clara diferença entre as amostras ao se comparar a tentativa 24 e o reteste dos animais submetidos ao protocolo do consumo crônico ($p < 0,01$), mas não entre os animais que receberam o consumo de forma aguda ($p > 0,05$).

Figura 33. Velocidade de natação dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), no teste de retenção de memória do Labirinto Aquático de Morris. As barras indicam Média +EPM da latência para encontrar a plataforma (em segundos) no reteste, após 28 dias do segundo dia de teste no Labirinto Aquático de Morris. O teste anova não identificou diferenças significantes entre os grupos. O grupo Involuntário Crônico Água foi composto por 11 animais, o grupo Involuntário Crônico Etanol por 12 animais e os grupos submetidos ao tratamento Agudo (Agudo e Crônico) foi composto por 10 animais cada. Para maiores informações consulte o texto.

7.3 Teste de Memória de Reconhecimento

O Teste Anova não evidenciou diferenças estatísticas significantes no tempo de exploração na sessão de treino, no teste da Memória de Curto Prazo (TMCP) e no Teste da Memória de Longo Prazo (TMLP) entre os grupos estudados ($F_{3,23}=1982$; $p > 0,05$; $F_{3,23}=0,845$; $p > 0,05$; $F_{3,23}=0,503$; $p > 0,05$, respectivamente) (Figura 34).

Ao comparar as médias de exploração na Sessão Treino com a Sessão de TMCP e com a Sessão de TMLP não foram observadas significantes diferenças

($F_{3,23}=0,346$; $p>0,05$). Ainda, não foram identificadas diferenças significativas ao se comparar a exploração da Sessão Treino com a de TMCP, da Sessão Treino com a Sessão de TMLP e da Sessão de TMCP e TMLP ($F_{3,23}=0,169$; $p>0,05$; $F_{3,23}=1,882$; $p>0,05$ e $F_{3,23}=0,301$; $p>0,05$, respectivamente).

As médias de índice de reconhecimento (IR) estão apresentadas na figura 35. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos de estudo quanto ao IR na Sessão Treino, na Sessão de TMCP e na de TMLP ($F_{3,33}= 2,334$; $0,05>p<0,10$; $F_{3,23}=0,271$, $p>0,05$; $F_{3,23}=1,394$; $p>0,05$, respectivamente).

Ao se comparar os IR dos grupos de estudo nas três Sessões de teste, ou seja, Treino, TMCP e TMLP o Teste Anova de medidas repetidas não identificou diferenças entre os grupos ($F_{3,23}=0,767$; $p>0,05$). Ao se comprar o IR da Sessão de Treino com o IR da Sessão de TMCP também não foram encontradas diferenças expressivas estatisticamente ($F_{3,23}=1,047$; $p>0,05$). Semelhantemente não houve diferenças entre a comparação do IR do Treino com a do TMLP ($F_{3,23}=1,098$; $p>0,05$). Por último e com resultados similares, também não foram evidenciadas diferenças entre a Sessão de TMCP e de TMLP ($F_{3,23}=0,854$; $p>0,05$).

Figura 34. Tempo Total médio de exploração dos objetos dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), na Sessão de Treino, de Teste de Memória de Curto Prazo e Teste de Memória de Longo Prazo. Os animais foram submetidos ao consumo involuntário de etanol ou água, durante um (agudo) ou 21 dias, a cada três dias (crônico) e foram submetidos ao *probe trial* após 48 horas de abstinência ao etanol. As barras indicam Média+EPM do tempo de exploração dos objetos (em segundos) na sessão Treino, na TMCP e TMLP. O teste Anova não identificou diferenças entre os grupos ($p>0,05$). TMCP: Sessão de Teste de Memória de Curto Prazo; TMLP: Sessão de Teste de Memória de Longo Prazo. Cada grupo foi composto por 6 animais.

Figura 35. Índice de Reconhecimento dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água), na Sessão de Treino, de Teste de Memória de Curto Prazo e Teste de Memória de Longo Prazo. Índice de reconhecimento expresso pelo cálculo (Tempo de exploração do Objeto novo/ (Tempo de exploração do Objeto novo + Tempo de exploração do Objeto Familiar) As barras indicam Média+EPM do tempo de exploração dos objetos (em segundos) na sessão Treino, na TMCP e TMLP. O teste Anova não identificou diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). TMCP: Sessão de Teste de Memória de Curto Prazo; TMLP: Sessão de Teste de Memória de Longo Prazo. Maiores especificações na figura 34. Cada grupo foi composto por 6 animais.

7.4 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A Anova de uma via revelou diferença estatisticamente significativa na Frequência de entrada dos braços Fechados (FF) ($F_{3,24}=6,903$; $p < 0,01$). O teste *Post Hoc* de *Tukey* identificou que esta diferença ocorreu entre os grupos submetidos ao Consumo crônico de Água e Agudo de Etanol ($p < 0,05$).

Em relação a %FA não houve diferença estatística entre os grupos ($F_{3,24}=1,108$; $p > 0,05$). Porém foi observada significativa diferença na % de TA ($F_{3,24}=4,209$; $p < 0,05$). O teste *Post Hoc* de *Tukey* evidenciou que esta diferença ocorreu entre grupos Crônico Etanol e Agudo Água e Crônico Etanol e Agudo Etanol ($p < 0,05$, para ambos) (Figura 36).

Figura 36. Resultados do Labirinto em Cruz Elevado dos animais em abstinência do etanol (após o consumo involuntário agudo OU crônico de etanol) e dos grupos controles (após consumo involuntário agudo OU Crônico de água). Os animais foram submetidos ao consumo involuntário de etanol ou água, durante um (agudo) ou 21 dias, a cada três dias (crônico) e foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado após 48 horas de abstinência ao etanol. As barras indicam Média+EPM o painel superior mostra as médias+EPM da Frequência de Entradas nos Braços Fechados (FF). O painel inferior apresenta as médias+EPM da porcentagem de Entrada nos Braços Abertos %FA (barras Claras) e da Porcentagem de Tempo despendido nos Braços Abertos %TA (barras escuras). O símbolo * indica $p < 0,05$ pelo teste Anova ao se comparar a frequência de entradas nos braços fechados entre o grupo submetido ao consumo crônico de água e o grupo submetido ao consumo agudo de etanol; o & indica diferença entre o grupo submetido ao consumo crônico de etanol e o grupo submetido ao consumo agudo de água e o # indica $p < 0,05$ ao se comprar o grupo submetido ao crônico de etanol com o grupo submetido ao consumo agudo de água. O grupo crônico água foi composto por 8 animais, o crônico etanol por 5, o agudo água por 7 e o agudo etanol por 5. Para maiores informações consultar o texto.

VIII. DISCUSSÃO

ESTUDO II

Após 48 horas da última ingestão de etanol, os animais foram anestesiados com Uretana e tiveram 5 ml de seu sangue coletado. Os resultados não indicaram presença significativa de etanol no sangue dos animais. Foi considerado como positivo valores maiores que 0,1 g/L de sangue, e desta forma, nenhum animal do estudo apresentou resultado positivo para os níveis de etanol no sangue. Este achado vai de encontro com o estudo de Livy e colaboradores (2003) que observaram um significativo declínio da concentração de etanol após 500 minutos (aproximadamente 8 horas) da ingestão, tanto em ratos quanto em camundongos.

Este resultado confirmou bioquimicamente que os animais expostos ao consumo de etanol, independente da via e tempo de administração estavam em abstinência ao mesmo.

No LAM não foram observados diferenças na velocidade de natação entre os grupos estudados. Isto nos indica que mesmo os animais submetidos ao consumo crônico de etanol na concentração de 1g/Kg por 21 dias (a cada três dias) não apresentaram alterações locomotoras. A frequência de entrada nos braços fechados do LCE pode ser utilizada como um indicativo da atividade locomotora dos animais e, contrariamente ao encontrado no parâmetro velocidade de nado, houve diferença significativa entre os grupos submetidos ao consumo crônico de etanol e o grupo que recebeu etanol uma única vez (agudo).

Este resultado no LCE nos indica um efeito ansiogênico nos animais que foram submetidos ao consumo agudo (Figura 36) e pode ser explicado pelo estresse da via de administração por gavagem. Em outros modelos de estresse, como por exemplo, o de restrição forçada, os efeitos do estresse agudo foram detectáveis até 48 horas da exposição ao evento estressor (SILVA e PADOVAN, *in Prep.*). Nos animais submetidos ao consumo crônico, com o estresse repetido da manipulação espera-se a formação da tolerância ao estresse, o que está de acordo com a teoria de Deakin e Graeff (1989) e com outros estudos de nosso laboratório (SILVA e PADOVAN, *in Prep.*).

No que diz respeito a latência para encontrar a plataforma no teste de memória espacial, não foram identificadas diferenças entre os grupos, nem no primeiro e nem no segundo dia de teste. Estes achados discordam de alguns estudos que mostraram alterações de memórias espaciais após consumo crônico de etanol em níveis significantes (ARENDT *et al.* 1989 *apud* MATTHEWS e MORROW, 1999). No

entanto, a literatura não é conclusiva, uma vez que há relatos de ausência de efeitos do etanol sobre esses processos (TOMBAUGH, 1981; MAIER e POHORECKY, 1987; BLOKLAND *et al.* 1993; STEIGERWALD e MILLER, 1997).

No TMR, não foram encontradas diferenças entre os grupos no tempo de exploração dos objetos e nem ao se comparar os Índices de Reconhecimento no Treino, no Teste de Memória de Curto Prazo (TMCP) e no Teste da Memória de Longo Prazo (TMLP). Esses resultados sugerem que o consumo de etanol e sua retirada não foram capazes de afetar a memória de reconhecimento nos grupos estudados, ou seja, um tipo de memória não espacial, o que está de acordo com a literatura (MATTHEWS e MORROW, 1999; STEIGERWALD e MILLER, 1997).

Um último aspecto a ser comentado refere-se à dificuldade de comparação dos dados aqui obtidos com outros da literatura, devido à enorme variabilidade nos protocolos de tratamento com etanol, considerando não somente as vias de administração, o tempo de tratamento e os modelos animais utilizados (espécie e linhagem), mas, principalmente, as diferentes concentrações de etanol administradas.

IX. CONCLUSÃO

ESTUDO II

- A abstinência ao etanol após o consumo agudo foi capaz de gerar um prejuízo na memória espacial de curto prazo.
- Consumo crônico e Agudo de Etanol não alterou a Memória de Reconhecimento dos animais estudados.
- Animais expostos ao consumo agudo e Crônico de etanol, em abstinência ao etanol de 48 horas apresentaram níveis de ansiedade elevados.

X. DISCUSSÃO GERAL

A alta prevalência de indivíduos dependentes de álcool em todo o mundo, sobretudo nos países ocidentais, tem estimulado estudos que visam ampliar os conhecimentos a respeito dos efeitos desta droga em todo o organismo.

Em 2012 foi realizado o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) sobre os padrões de consumo do etanol e de outras drogas na população brasileira. Neste estudo foram entrevistadas 4.607 pessoas, em 149 municípios brasileiros. Neste levantamento foram entrevistados indivíduos de 14 anos de idade ou mais, entre novembro de 2011 e março de 2012. Os resultados do LENAD evidenciam que o número de adultos que ingerem bebidas alcoólicas pelo menos uma vez por semana subiu 20 % de 2006 a 2012. Outro resultado expressivo é o de que o padrão de beber pesado episódico (*Binge drinking*) pelo menos uma vez no ano que antecedeu a pesquisa aumentou 31,1% em adultos quando comparados os achados de 2006 com os de 2012 (II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas- LENAD).

Estes dados certamente trazem um alerta para a Saúde Pública de nosso país, visto que além das alterações em diversos órgãos ocasionadas pelo uso de etanol, vários estudos neuropsicológicos indicam que indivíduos com dependência etílica apresentam alterações cognitivas, comportamentais e emocionais (PARSONS, 1998; CUNHA e NOVAES, 2004; VIEIRA *et al.* 2007).

Além dos estudos em humanos, uma variedade de estudos com animais têm confirmado, tanto do ponto de vista comportamental quanto neuroquímico os efeitos adversos do etanol na memória e na aprendizagem.

Nestes trabalhos os pesquisadores têm utilizado o LAM para estudar a aprendizagem e a memória em modelos animais com roedores (D'HOOGE & DE DEYN, 2001). Outros modelos alternativos para o estudo de memória em animais são os testes que envolvem a memória de reconhecimento (TMR) (ENNACEUR e DELACOUR, 1988). Os dois testes embora investiguem a memória são utilizados para averiguar tipos de memória diferentes, sendo o Labirinto Aquático de Morris (LAM) utilizado para verificação da memória visuoespacial e o TMR para estudo da memória de reconhecimento (que não depende de informações espaciais para sua realização).

A memória de reconhecimento faz parte da memória declarativa e se refere à capacidade de julgar um item recentemente apresentado como familiar. Em humanos, esta memória apresenta dois componentes: um episódico e um familiar.

Já a memória visuoespacial compõe a memória de procedimento, um tipo de memória implícita.

Outro forte componente nos estudos com animais sobre os efeitos do etanol na memória e aprendizagem tem sido a etanolemia, que afere a quantidade de etanol nos fluidos biológicos dos animais.

A cromatografia gasosa acoplada ao *Headspace* tem sido descrita como o método preferencial para dosagem de etanol em fluidos biológicos. A primeira publicação desta técnica ocorreu em 1963 e desde então sofreu vários aperfeiçoamentos. Hoje esta técnica conta com uma automatização total, principalmente na etapa crítica de amostragem e injeção da amostra (PORTARI, 2006).

Os dados de linearidade da curva de calibração, dos estudos 1 e 2, foram satisfatórios, com valores de coeficiente de correlação de 0,9995 semelhante ao encontrado na literatura (De MARTINIS, 2002; ZILLY *et al.* 2003; PORTARI, 2006).

Tanto no Estudo 1 quanto no estudo 2 não foram identificadas quantidades significativas de Etanol no sangue de nenhum animal testado. Como já foi discutido isto concorda com a literatura (LIVY, 2003), devido o tempo da última exposição e a retirada de sangue para realização da etanolemia.

Dentre as formas de ingestão etílica utilizada na literatura estão a de administração i.p., intravenosa, intragástrica (pela técnica de gavagem), autoadministração oral, inalação ou por via intracraniana (MATTHEWS *et al.* 1999; GREEN e GRAHAME, 2008; TORRES, 2011).

Neste estudo foram utilizados o consumo semivoluntário e intragástrico (involuntário) de etanol, escolhidos por simularem as situações reais de consumo em pequenas doses, porém diários e o consumo do beber pesado, também chamado de *Binge Drinking*.

Certamente a administração de etanol em animais é um evento aversivo, mesmo quando o consumo é semivoluntário, visto que a maioria das cepas de ratos não consome etanol em altas quantidades por livre escolha. (TORRES, 2011).

Protocolos que se aproximam do consumo desta substância por humanos são mais factíveis de demonstrar os efeitos do consumo de etanol em si, desvinculando-o dos efeitos do estresse na administração. Desta forma, Rowland e colaboradores (2005) utilizaram em seu estudo o uso de ingestão voluntária por meio da adição de

policosse®, uma gelatina que além de deixar a bebida mais palatável aumentava a permanência dos níveis de etanol no sangue ao diminuir a cinética de absorção e metabolização do etanol.

Não descartamos, porém o efeito do estresse em nossos achados, principalmente nos grupos de animais submetidos ao consumo involuntário por gavagem e por este motivo decidimos utilizar o LCE.

Handley e Mithany foram os primeiros pesquisadores a utilizar o LCE. Foi observado por eles um maior número de entrada nos braços fechados quando comparados com os abertos. Este achado pode ser explicado pelos estímulos naturais de novidade impostos pelo modelo experimental do LCE (LISTER, 1990). Os estudos de Padovan e Guimarães (2000) demonstraram que o LCE pode ser utilizado para avaliar os efeitos comportamentais decorrentes da exposição à eventos aversivos ou estressores.

A diminuição significativa da %FA e %TA nos grupos expostos ao consumo involuntário agudo de água quando comparado com os demais vão de encontro com a literatura. Estudos sobre eventos aversivos, crônicos ou agudos, postulam que a exposição ao mesmo agente estressor, com a mesma magnitude, pode levar a tolerância ao estresse. O mesmo não ocorre quando há um evento estressor único (DEAKIN e GRAEFF, 1989; 1991; PADOVAN e GUIMARÃES, 2000).

Outro fato que precisa ser discutido é o estresse causado pela retirada do consumo de etanol dos animais submetidos ao consumo crônico. Se por um lado é descrito na literatura que o uso de etanol tem efeitos ansiolíticos (PADOVAN e PADOVAN *in prep.*) também é descrito que a interrupção de sua administração acarreta a chamada Síndrome de Abstinência ao etanol (LARANJEIRA, et al., 2000). Partindo destes pressupostos, não é esperado que os animais submetidos ao consumo agudo de etanol (independentemente da via de administração) apresentem níveis de ansiedade elevados causados pela retirada de etanol. Porém, nos grupos submetidos ao consumo involuntário a elevação dos níveis de ansiedade (quando comparados com o controle) pode aparecer em decorrência da manipulação e do protocolo utilizado.

Contrariamente à nossa hipótese inicial, no Estudo 1 não foram observadas diferenças entre o comportamento no LCE entre os grupos estudados (controle, crônico e agudo etanol). Isto como discutido acima não era esperado no animal

submetido ao consumo agudo, mas nos animais submetidos ao consumo crônico de etanol, devido à aversão ocasionada pela abstinência.

A explicação para essa ausência de diferença não é clara, entretanto dois aspectos podem ser considerados. Primeiramente, a quantidade e concentração de etanol ingerida pelos animais não foi capaz de gerar um quadro de dependência, o que, conseqüentemente, não induziria a SAA. Alguns estudos relatam a importância da dose e do tempo de administração para o efeito da SAA. Outra possível explicação refere-se ao tempo necessário para o aparecimento dos sinais de ansiedade, detectáveis pelo teste utilizado. Nesse sentido, é possível que o intervalo de 48 horas entre a última dose ingerida e o teste no LCE tenha sido insuficiente para que tais sinais pudessem ser detectados.

Nos grupos submetidos ao consumo involuntário podemos concluir a existência de dois agentes aversivos: a gavagem (presente em todos os animais deste estudo) e a SAA nos animais submetidos ao consumo crônico. No estudo 2 observamos que os animais com menor exploração aos braços abertos foram os animais submetidos ao consumo Involuntário Agudo de Etanol.

Este resultado pode, ao menos em parte, ser explicado pela teoria de Deakin e Graeff (1989) que postularam que às projeções ao Hipocampo originadas no Núcleo Mediano da Rafe (NmnR) são responsáveis pela modulação de respostas desencadeadas por eventos aversivos crônicos, favorecendo o desenvolvimento de tolerância por um mecanismo de desconexão dos eventos aversivos e suas conseqüências emocionais. Desta forma, os animais submetidos a ingestão involuntária crônica de etanol desenvolveram tolerância ao estresse da manipulação, efeito esse diferente do observado quando ocorre uma única exposição ao evento aversivo.

Outra discussão pertinente referente aos achados dos Estudos 1 e 2 é sobre o papel do Hipocampo nas provas de memória e na aprendizagem., visto que seu papel em relação a ansiedade já está bem descrito (DEAKIN e GRAEFF, 1989, 1991; SILVA e PADOVAN *in prep.*)

Para tentar elucidar esta questão vários estudos tem investigado o papel da formação hipocampal nas tarefas de aprendizagem e memória (O'KEEFE e NADEL, 1978; MATTHEWS *et al.* 1999; MATTHEWS e MORROW, 2000).

Estudos têm demonstrado que lesões nesta estrutura comprometem a aprendizagem espacial (O'KEEFE e NADEL, 1978) e o uso de memória espacial (JARRARD, 1983). Porém, alguns estudos têm indicado que estas lesões podem facilitar tanto a aprendizagem quanto o uso de informações não espaciais (MATTHEWS *et al.* 1999).

Ainda, estudos tem demonstrado que os efeitos do consumo de etanol se assemelham aos efeitos da lesão hipocampal, independentemente do tempo de tratamento (MATTHEWS *et al.* 1999).

Concentrações fisiologicamente relevantes de etanol são capazes de alterar a neurofisiologia do sistema hipocampal, potencializando a inibição central mediada pelo GABA, no Septo Medial e no Hipocampo, mas não no Septo Lateral. Por outro lado, também bloqueia a ação do NMDA por resposta neural evocada também no Hipocampo e no septo medial e novamente sem interferir no septo lateral (MATTHEWS *et al.* 1999).

Embora seja sugerido que o etanol seja capaz de alterar a função hipocampal e por isto o comportamento, certamente o hipocampo não é o único sítio encefálico afetado pelo etanol, sendo mais estudos necessários para elucidar os mecanismos e estruturas encefálicas envolvidas.

No consumo agudo de etanol, especificamente, estudos demonstram um prejuízo na memória espacial, observada no LAM (MATTHEWS *et al.* 2002). Outro estudo da equipe e MATTHEWS (1999) concluiu que a administração aguda de etanol causa prejuízos no desempenho de memória espacial, enquanto facilita o desempenho em tarefas não espaciais.

No consumo crônico de etanol tem sido demonstrado prejuízos no desempenho em muitas tarefas de aprendizagem e memória espacial, mesmo após um longo período de retirada do consumo de etanol antes do teste. No entanto, estes achados não são consenso na literatura (MATTHEWS e MORROW, 2000). Curiosamente, semelhante aos efeitos da administração aguda de etanol, o consumo crônico de etanol entre 14 e 20 semanas pode melhorar o desempenho em tarefas não espacial (Steigerwald e Miller, 1997). Porém não há um consenso na literatura a respeito da existência de um provável período de recuperação sem o uso de etanol (MATTHEWS e MORROW, 2000).

Desta forma, novos estudos são necessários, utilizando protocolos de consumo de etanol mais próximos do padrão de consumo encontrados em humanos. Elucidar os demais sítios encefálicos que podem interferir na memória, além de aprofundar os estudos sobre os possíveis efeitos dose-dependentes do etanol nesta estrutura são de extrema importância para compreendermos os efeitos do uso desta substância no comportamento animal.

XI. CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho permitiu concluir que o etanol influencia de forma diferente a memória espacial e a memória de reconhecimento. Especificamente, nos animais submetidos ao consumo semivoluntário de etanol (agudo ou crônico) pode-se concluir que:

- A abstinência ao etanol após o consumo agudo ou crônico de etanol não foi capaz de alterar a aprendizagem e a memória espacial no LAM, porém prejuízos na memória espacial de longo prazo foram observados nos animais submetidos ao consumo agudo de etanol.
- Não foram observadas alterações na Memória de Reconhecimento na Sessão treino e na Memória de Reconhecimento de Curto prazo, porém a exposição aguda ao etanol foi capaz de gerar prejuízos na memória de Reconhecimento de Longo Prazo.
- Não houve diferenças nos níveis de ansiedade dos animais do estudo, porém novos estudos devem ser conduzidos para melhor compreensão deste resultado.

Já a respeito dos animais submetidos ao consumo Involuntário de etanol, agudo ou crônico, concluímos que:

- A abstinência ao etanol após o consumo agudo foi capaz de gerar um prejuízo na memória espacial de curto prazo.
- O consumo crônico e agudo de etanol não alterou a Memória de Reconhecimento dos animais estudados.
- Animais expostos ao consumo agudo e crônico de etanol, em abstinência ao etanol de 48 horas apresentaram níveis de ansiedade elevados.

XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Fetal alcohol syndrome and alcohol related-neurodevelopmental disorders. **Pediatrics**, v. 106, n. 2, p. 355-361, 2000.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais IV** (DSM-IV), 2000.

BABOR, T. F., HIGGINS-BIDDLE, J. C. Brief intervention for hazardous and harmful drinking. A manual for use in primary care. **World Health Organization**, 2001.

BERMOND, D. M.; TOSE, H. Consumo de bebidas alcoólicas: interações com o benzeno e outras substâncias de uso ocupacional. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 27, n. 2, 2000.

BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J.; RAAIJMAKERS, W. Absence of impairments in spatial and temporal discrimination learning in Lewis rats after chronic ethanol consumption. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 46, p. 27–34, 1993.

BRANDÃO, M.L.; NOBRE, M.J. Aprendizagem e memória. In: BRANDÃO, M.L. **As bases biológicas do comportamento**: Introdução à neurociências. 1 edição, EPU: São Paulo, 2004, cap. 6, p. 97-118.

CABRAL, A.; ISOARDI, N.; SALUM, C.; MACEDO, C. E.; NOBRE, M. J.; MOLINA, V. A.; BRANDÃO, M. L. Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG. **Experimental Neurology**, v. 200. p. 200-208, 2006.

CEBRID. **II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil**, 2005.

CHIN, V. S.; Van Skike, C. E.; Berry, R. B.; Kirk, R. E.; Diaz-Granados, J.; MATTEWS, D. B. Effect of acute ethanol and acute allopregnanolone on spatial memory in adolescent and adult rats. **Alcohol**. v. 45 , n 5, p. 473-83, 2011.

CHRISTIE, K. A.; BURKE, J. D. J.; REGIER, D. A.; RAE D. S.; BOYD J. H.; LOCKE B.Z. Epidemiologic evidence for early onset of mental disorders and higher risk of drug abuse in young adults. **American Journal of Psychiatry**. v. 145, p. 971-5, 1988.

CRUZ, J. G. P.; DELWING, D.; BRUNELLI, A. S.; OLIVEIRA, G. C. Efeitos da administração crônica de etanol sobre a aprendizagem na memória de reconhecimento de objetos em camundongos nadadores. **Dynamis revista técnico-científica**, v. 15, n. 2, p. 26-31, 2009.

CUNHA, P.J.; NOVAES, M.A. Avaliação neurocognitiva no abuso e dependência do álcool: implicações para o tratamento. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.26, n.1, 2004.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense, **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, p. 305-315, 1991.

D'HOOGE, R.; DE DEYN, P.P. Applications of the Morris Water Maze in study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, p. 60-90, 2001.

De MARTINIS, B.S.; MARTIN, C. C. S. Automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens. **Forensic Science International**, v. 128, p. 115-9, 2002.

ESEL, E. neurobiology of alcohol withdrawal: Inhibitory and excitatory neurotransmitters. **Turkish journal of psychiatry**, v. 17, n. 2, p. 1-9, 2006.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioural brain research**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.

FADDA, F.; ZVANI, R. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Progress in neurobiology**, v. 06, n. 04, p. 385-431, 1998.

FILE, S.E.; BALDWIN, H.A.; HITCHCOTT, P.K. Flumazenil but not nitrendipine reverses the increased anxiety during ethanol withdrawal in the rat. **Psychopharmacology**, v. 98, n. 2, p. 262-4, 1989.

GALDURÓZ, J. C. F.; CAETANO, R. Epidemiologia do uso de álcool no Brasil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 1, p. 3-6, 2004.

GALDURÓZ, J. C. F., NOTO, A. R., NAPPO, S. A., CARLINI, E. A. I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas. Parte A: estudo envolvendo as 24 maiores cidades do Estado de São Paulo – 1999. **Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas**, Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina, 2000.

GARCÍA-MORENO, L.M.; CONEJO, N.M.; CAPILLA, A.; SANCHEZ, O.G.; SENDEREJA, K.; ARIAS, J.L. Chronic ethanol intake and object recognition in young and adult rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 831-37, 2002.

GIGLIOTTI, A.; BESSA, M. A. Síndrome de dependência do álcool. Critérios diagnósticos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 1, p. 3-4, 2004.

GOUVEIA, J. L. N; SERIACOPI, M. T. **Curso de Auto-Instrução, Preparação e Resposta para Desastres Envolvendo Produtos Químicos**. Disponível em: <<http://www.cepis.org.pe/tutorial1/p/monimedi/index.html>>. Acesso em: 10 jan.2014.

ROWLAND, N.E.; NASRALLAH, N.; ROBERTSON, K.L. Accurate caloric compensation in rats for electively consumed ethanol-beer or ethanol-polycose mixtures. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 80, p. 109-14, 2005.

JELLINEK, E. M. The disease concept of alcoholism. **New Haven**: Hilhouse Press; 1960.

KOOB, G. F. **Alcoholism, clinical and experimental research**; v. 27, p. 232-243, 2003.

LARANJEIRA, R.; NICASTRI, S. **Abuso e dependência de álcool e drogas**. In: Almeida O, Dractu L, Laranjeira, R. Manual de psiquiatria. Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan, p. 84-9. 1996.

LARANJEIRA, R.; NICASTRI, S.; JERÔNIMO, C. MARQUES, A.C. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA) e o seu tratamento. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v.22, n.2, P. 62-71, 2000.

LIMA, M. N.; PRESTI-TORRES, J.; CALDANA, F.; GRAZZIOTIN, M. M.; SCALCO, F. S.; GUIMARÃES, M. R.; BROMBERG, E.; FRANKE, S. I.; HENRIQUES, J. A.; SCHRÖDER, N. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. **European journal of pharmacology**, v. 570, n. 1-3, p. 111-114, 2007.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, p. 321-340, 1990.

LIVY, D. J.; PARNELL, S. E.; WEST, J. R. Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. **Alcohol**, v. 29, p. 165-171, 2003.

LOPES, C. S.; **Psychiatric risk factors among drug abusers in Rio de Janeiro**. PHD thesis- Institute of psychiatry. University of London, 1994.

MAIER, D. A.; POHORECKY, L. A. Repeated withdrawal from ethanol on radial arm acquisition in rats. **Alcohol**, v. 4, p.433–436, 1987.

MATTHEWS, D.B.; ILGEN, M.; WHITE, A.M.; BEST, P.J. Acute Ethanol Administration Impairs Spatial Performance While Facilitating Nonspatial Performance in Rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 72, n. 169–179, 1999.

MATTHEWS, D.B; MORROW, L. Effects of Acute and Chronic Ethanol Exposure on Spatial Cognitive Processing and Hippocampal Function in the Rat. **Hippocampus**, v. 10, p. 122–130, 2000

MATTEWS, D. B.; MORROW, A. L. Effects of acute and chronic ethanol exposure on special cognitive precessing and hippocampal function in the rats. **Hippocampus**, v. 10, n. 1, p. 122-133, 2000.

McGEER, K. Alcohol-related problems experienced by university students in New Zealand. **Australian and New Zealand journal of public health**, v. 28, n. 4, p. 321-23, 2004.

MORRIS, R.G. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and motivation**, v.12, p. 239-60.

MORRIS, R.G. *et al.* Place navigation impaired in rats with hippocampal lesion. **Nature**, v.297, p. 681-83, 1982.

NOVIER, A.; VAN SKIKE, C.E.; CHIN, V.S.; DIAZ-GRANADOS, J.L.; MATTHEWS DB. Low and moderate doses of acute ethanol do not impair spatial cognition but facilitate accelerating rotarod performance in adolescent and adult rats. **Neuroscience letters**, v. 512, n. 1, p. 38-42, 2012.

O'KEEFE, J. B.; NADEL, R. The hippocampus as a cognitive map. **Oxford University Press**, 1978.

PADOVAN, V. M.; GUIMARÃES, F. S. REstrain-induced hipoactivity in a elevated plus-Maze. **Brazilian Journal of Medical an Biological Research**, v. 33, n. 1, p. 79-83, 2000.

PARSONS, O.A. Neurocognitive deficits in alcoholics and social drinkers: a continuum? **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22; n. 4, p. 954-961, 1998.

PAULA-BARBOSA, M. M., BRANDAO, F., MADEIRA, M. D., CADETE-LEITE, A. Structural changes in the hippocampal formation after long-term alcohol consumption and withdrawal in the rat. **Addiction**, v. 88, p. 237– 247, 1993.

PELLOW, S; CHOPIN, P.: FILE, S. AND BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PILLON, S. C.; CORRADI-WEBTER, C.M. teste de identificação de problemas relacionados ao uso de álcool entre estudantes universitários. **Revista de Enfermagem UERJ**, v. 14, n. 3, p.325-32, 2006.

PORTARI, G.V. **Infusão de glicose e tiamina em ratos tratados com dose aguda de etanol**. Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Dissertação, Programa de Investigação biomédica, 2011.

ROWLAND, N. E.; NASRALLAH, N.; ROBERTSON, K.L. Accurate caloric compensation in rats for electively consumed ethanol-beer or ethanol-polycose mixtures. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 80, p. 109-14, 2005.

SILVERS, J.M.; TOKUNAGA, S.; BERRY, R.B.; WHITE, A.M.; MATTHEWS, D.B. Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone and the hippocampus. **Brain Research Reviews**, v. 43, p. 275-84, 2003.

STEIGERWALD, E.S.; MILLER, M.W. Performance by adult rats in sensory-mediated radial arm maze tasks is not impaired and may be transiently enhanced by chronic exposure to ethanol. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 21, p. 1553–1559, 1997.

SUTTAJIT, S.; KITTIRATTANAPAIBOON, P.; JUNSIRIMONGKOL, B; LIKHITSATHIAN, S.; SRISURAPANONT M. Risks of major depressive disorder and anxiety disorders among Thais with alcohol use disorders and illicit drug use: Findings from the 2008. Thai National Mental Health survey. **Addictive Behaviors**, v. 37, p. 1395-99, 2012.

TOMBAUGH, T. N. Ethanol-metrecal diets: II. Failure to obtain impaired performance on a series of appetitively and aversively motivated tasks. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 15, p. 463–469, 1981.

TORRES, L.U. **Consumo de álcool em ratos e comportamento adjuntivo de correr na roda de atividade**. Universidade de Brasília. Tese, Instituto de Psicologia da Universidade de Brasília, 2011.

VIEIRA, R. M. T.; SERAFIM, A. P.; SAFFI, F. Prejuízos neurocognitivos na dependência alcoólica: Um estudo de caso. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 34, n. 5, p. 246-250, 2007.

XAVIER, G.F. Modularidade da Memória e o Sistema Nervoso. **Psicologia USP**, v. 4, n. 1/2, p. 61-115, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Status Report on Alcohol**. Department of Mental Health and Substance Abuse. Geneva, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neuroscience of Psychoactive Substance Use and Dependence**, 2004.

ZILLY, M.; LANGMANN, P.; LENKER, U.; SATZINGER, V.; SCHIRMER, D.; KLINKER, H. Highly sensitive gas chromatographic determination of ethanol in human urine samples. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life science**, v. 25, n.2, p. 179-86, 2003.