Universidade de São Paulo
Olívia Alves da Costa Sousa Neta

Efeito cognitivo da atividade física voluntária após exposição crônica intermitente ao etanol e alterações no BDNF e CREB

São Paulo
2020

Olívia Alves da Costa Sousa Neta

Efeito cognitivo da atividade física voluntária após exposição crônica intermitente ao etanol e alterações no BDNF e CREB

Versão Corrigida

(A versão original encontra-se na unidade em que aloja o Programa de Pós Graduação)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profª. Drª. Rosana Camarini
Coorientador: Prof. Dr. Fábio Cruz

São Paulo
2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Alves da Costa Sousa Neta , Olivia
Efeito cognitivo da atividade física voluntária após exposição crônica intermitente ao etanol e alterações no BDNF e CREB / Olivia Alves da Costa Sousa Neta ; orientadora Rosana Camarini; coorientador Fábio Cruz . -- São Paulo, 2020.
84 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. álcool. 2. atividade física. 3. adolescente . 4. memória . I. Camarini, Rosana , orientador. II. Cruz , Fábio , coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Olívia Alves da Costa Sousa Neta

Titulo da Dissertação: Efeito cognitivo da atividade física voluntária após exposição crônica intermitente ao etanol e alterações no BDNF e CREB

Orientadora: Rosana Camarini

Coorientador: Fabio Cruz

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Alterações hipocampais de metabolismo de glicose, CREB e BDNF em animais expostos a múltiplos binges de etanol: proteção pelo exercício físico voluntário***", registrado sob o protocolo nº ***133/2017***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***07/11/2017*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Rosana Camarini***
- Departamento: *Farmacologia*
- Membros da Equipe: *Olivia Alves da Costa Sousa Neta (Pós-graduando), Bruno Henrique do Amaral (Pós-graduando), Sonia Maria Rodrigues Leite (Técnico de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico ww2.icb.usp.br/icb/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Hippocampal alterations of glucose metabolism, CREB and BDNF in animals exposed to multiple ethanol binges: protection by voluntary physical exercise.***", protocol nº ***133/2017***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***11/7/2017*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Rosana Camarini***
- Team members: *Olivia Alves da Costa Sousa Neta (Graduate Student), Bruno Henrique do Amaral (Graduate Student), Sonia Maria Rodrigues Leite (Laboratory Technician)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*C57BL/6*	*Macho/male*	*30 dias/days*	*180*

São Paulo, 18 de dezembro de 2017.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Alterações hipocampais de metabolismo de glicose, CREB e BDNF em animais expostos a múltiplos binges de etanol: proteção pelo exercício físico voluntário.", protocolada sob o CEUA nº 4122080618, sob a responsabilidade de **Olivia Alves da Costa Sousa Neta** *e equipe; Fabio Cardoso Cruz* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 13/09/2018.

We certify that the proposal " Hippocampal alterations of glucose metabolism, CREB and BDNF in animals exposed to multiple ethanol binges: protection by voluntary physical exercise.", utilizing Isogenics mice, protocol number CEUA 4122080618, under the responsibility of **Olivia Alves da Costa Sousa Neta** *and team; Fabio Cardoso Cruz* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 09/13/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 09/2018 a 12/2019 Área: Farmacologia/farmacologia

Origem: Espécie: Linhagem:	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME Camundongos isogênicos C57BL/6 adolescentes	sexo: Machos idade: 28 a 40 dias Peso: 15 a 20 g	N: ---
Origem: Espécie: Linhagem:	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME Camundongos isogênicos C57BL/6 adultos	sexo: Machos idade: 65 a 75 dias Peso: 25 a 35 g	N: ---

Local do experimento: Biotério de manutenção Leal Prado, EPM, UNIFESP

São Paulo, 16 de outubro de 2018

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética
no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética
no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

À maior incentivadora e apoiadora do meu trabalho, Dona Graça, mainha.

AGRADECIMENTOS

A mim, por não ter desistido e ter resistido a quase três anos de luta, choro, solidão e perrengues. À minha querida e exemplar mainha, por todas as ligações, apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida profissional. Ao meu marido, Mateus, por ter encarado comigo meus problemas, por todo amor, cuidado e paciência dedicados a mim, tornando-se minha luz.

À professora Rosana Camarini e ao professor Fábio Cruz, por terem aberto as portas de seus laboratórios e confiado no meu esforço para a realização deste trabalho.

À banca avaliadora, por atender ao convite de contribuir com suas avaliações a este trabalho.

Aos colegas de laboratório pela companhia e conversas, em especial, Mariana, Sheila, Marcos, Bruno e Nívea pela orientação, disponibilidade e ajuda de perto ou de longe. Sem vocês com certeza a trajetória teria sido bem mais desesperadora.

Aos meus amigos, em especial Klebson, Palloma, Elizanete, Geisi, Arauana, “Igu”, Hyago, Bruna, Jonathan, Clei e Guilherme que prestaram apoio incondicional e por vezes foram meu refúgio em momentos críticos. Vocês transformam o ambiente acadêmico e o mundo num lugar mais esperançoso em razão da empatia, compreensão e amizade sincera.

À Karina, o presente que São Paulo me deu. Pela companhia e companheirismo, pelo compartilhamento de traumas e inseguranças, pelo crescimento, pelos socorros emocionais e físicos, pela amizade e amor me faltam palavras, mas sobra gratidão.

À professora Carolina Demarchi, por ceder gentilmente o espaço de seu laboratório e alguns materiais utilizados na finalização deste trabalho. Ao pessoal da secretaria, da portaria, da biblioteca e de outros setores administrativos, pelo serviço prestado sempre de maneira alegre e eficiente. Ao Anderson, pelas conversas, apoio, carinho e, principalmente, por ter me ajudado na entrega da versão.

À CAPES, pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Muito Obrigada!

“O sertanejo é, antes de tudo, um forte.”

Euclides da Cunha

RESUMO

O consumo excessivo de álcool, principalmente quando iniciado precocemente, na adolescência, é um dos principais motivos que podem levar a danos mais graves e possíveis consequências duradouras, tais como o déficit de memória e problemas cognitivos. Evidências demonstram a participação do hipocampo e de vias de sinalização, como a via da AMPc/PKA, resultando na ativação de CREB e liberação do BDNF para a promoção de mecanismos mnemônicos. Enquanto o álcool pode interferir de maneira negativa nessas moléculas, a atividade física, por sua vez, apresenta-se, majoritariamente, como um importante fator favorável à memória. O presente estudo avaliou os efeitos da atividade física voluntária sobre os possíveis danos no processo de formação de memória acarretados pelo etanol na adolescência, focando no CREB e em um de seus genes-alvo, o BDNF. Camundongos C57BL6 adolescentes foram expostos de maneira intermitente (16hON/8hOFF) à câmara de vapor de etanol seguidos de 72h de abstinência, durante dois ciclos. Entre um ciclo e outro, os animais foram submetidos ao consumo de livre escolha entre duas garrafas no paradigma "*Drinking in the Dark" ("Beber no escuro").* Após a etapa de intoxicação, os animais foram separados e alojados em gaiolas com ou sem roda de corrida, na qual permaneceram por 14 dias. Os animais foram testados no teste de reconhecimento de objeto, com contexto espacial, como índice de memória de reconhecimento (curto e longo prazo). Com três dias de corrida, houve efeito positivo na exploração do objeto novo, em relação ao familiar, na memória de curta duração nos grupos controle e intoxicado. Com oito dias, esse mesmo efeito foi visto na memória de longa duração do grupo com consumo voluntário do etanol, sem intoxicação, e com catorze dias, na memória de curta duração no grupo intoxicado. Não foi observado nenhum déficit de memória. No entanto, após catorze dias de corrida, houve diminuição nos níveis de BDNF em todos os grupos com atividade física e no intoxicado sedentário, e nos níveis de CREB no grupo intoxicado sem e com atividade física.

Palavras chave: álcool, atividade física, adolescente, memória

ABSTRACT

Excessive alcohol consumption, especially when started early in adolescence, is one of the main reasons that can lead to more serious damage and possible lasting consequences, such as memory deficit and cognitive problems. Evidence demonstrates the involvement of the hippocampus and signaling pathways, such as the cAMP / PKA pathway, resulting in CREB activation and BDNF release for the promotion of mnemonic mechanisms. While alcohol can negatively interfere with these molecules, physical activity, in turn, is mostly an important factor favoring memory. The present study evaluated the effects of voluntary exercise on the possible damage to the memory formation process caused by ethanol in adolescence, focusing on CREB and one of its target genes, BDNF. Adolescent C57BL6 mice were intermittently exposed (16hON / 8hOFF) to the ethanol vapor chamber followed by abstinence 72h for two cycles. Between one cycle and another, the animals were subjected to the free choice between two bottles in the "Drinking in the Dark" paradigm. After the intoxication stage, the animals were separated and housed in cages with or without running wheel, where they remained for 14 days. The animals were tested in the novel object recognition test, with spatial context, as recognition memory index (short and long term). After three days of running, there was a positive effect on the exploration of the new object, in relation to the familiar one, on short-term memory in the control and intoxicated groups. At eight days, this same effect was seen in the long-term memory of the group with voluntary ethanol consumption, without intoxication, and at fourteen days, in the short-term memory in the intoxicated group. No memory deficit was observed. However, after fourteen days of running, there was a decrease in BDNF levels in all groups with physical activity and sedentary intoxication, and in CREB levels in the group without and with physical activity.

Key words: alcohol, physical activity, adolescent, memory

Lista de Ilustrações

Figura 1- Classificação dos diferentes tipos de memória. 20

Figura 2 - Representação do aparato e das fases do Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) 33

Figura 3 - Protocolo Experimental 35

Figura 4 – Consumo diário de etanol 20% durante 2h 41

Figura 5 - Preferência por etanol no protocolo de livre escolha entre duas garrafas durante 2h 42

Figura 6 - Consumo diário de etanol 20% durante 4h 43

Figura 7 - Preferência por etanol no protocolo de livre escolha entre duas garrafas durante 4h 44

Figura 8 - Distância percorrida no campo aberto em cinco minutos..... 45

Figura 9 - Comportamento tipo ansioso no campo aberto 46

Figura 10 – Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) após 3 dias de atividade física 48

Figura 11 - Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) após 8 dias de atividade física 50

Figura 12 - Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) após 14 dias de atividade física 53

Figura 13 – *Western Blotting* BDNF hipocampal 54

Figura 14 – *Western Blotting* CREB hipocampal 56

Lista de Abreviaturas e Siglas

BD – *Binge Drinking*

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo (*Brain-derived neurotrophic factor*)

CA – *Cornu Ammonis*

CPF – Córtex Pré Frontal

CRE – Elemento responsivo ao AMPc (cAMP responsive element)

CREB – Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (cAMP response-element binding protein)

DG – Giro Denteado

DID – *Drinking in the Dark*

EC – Córtex Entorrinal (entorhinal cortex)

i.p – Intraperitoneal

LC – *Locus Ceruleus*

LTD – *Long Term Depression*

LTP – *Long Term Potentiation*

NAc – Núcleo accumbens

NMDA – N-metil-D-aspartato

OMS – Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

PND – Post Natal Days

pCREB - Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc fosforilada

RD – Razão de Discriminação

SNC – Sistema Nervoso Central

TRO – Teste de Reconhecimento de Objeto

VTA – Área Tegmental Ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 OBJETIVOS 27

3 MATERIAL E MÉTODOS 28

3.1 Animais 28

3.2 Soluções utilizadas 28

3.2.1 Etanol 20% para o consumo voluntário no modelo de escolha entre duas garrafas (“Two Bottle Choice”) 28

3.2.2 Soluções injetadas previamente à intoxicação pela câmara de vapor – Etanol 8% / Salina 0,9% + Pirazole (Sigma Aldrich) 28

3.3 Consumo oral de álcool por livre escolha entre duas garrafas (“two bottle choice”) 29

3.3.1 Cálculo da quantidade de etanol consumido e da preferência por etanol 30

3.4 Exposição à câmara de vapor 30

3.5 Coleta sanguínea para dosagem de etanol 31

3.6 Atividade física pela roda de exercício - “Voluntary wheel running” 31

3.7 Análise comportamental 32

3.7.1 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) 32

3.8 Protocolo experimental 34

3.9 Análise dos níveis proteicos de BDNF e CREB no hipocampo pela técnica Western Blotting 36

3.9.1 Extração proteica 36

3.9.2 Eletroforese e Transferência 36

3.9.3 Imunodetecção 37

3.10 Análise estatística 38

4 RESULTADOS 40

4.1 Consumo diário de etanol e preferência da droga em relação à água nos camundongos C57BL/6 adolescentes durante 2h 40

4.2 Consumo diário de etanol e preferência da droga em relação à água nos camundongos C57BL/6 adolescentes durante 4h 42

4.3 Análises Comportamentais 44

4.3.1 Registro da atividade locomotora no campo aberto e do comportamento tipo ansioso 44

4.3.2 Avaliação da memória espacial pelo Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) 46

4.4 Análises Bioquímicas dos níveis proteicos de BDNF e CREB pela técnica de *Western Blotting* 54

4.4.1 *Western Blotting* BDNF no hipocampo 54

4.4.2 *Western Blotting* CREB total no hipocampo 55

5 DISCUSSÃO 59

6 CONCLUSÕES 70

REFERENCIAS..... 71

1 INTRODUÇÃO

O álcool é uma das drogas mais consumidas em todo o mundo e faz-se presente em diversas ocasiões. De acordo com o relatório *World Health Statistics*, 2018, divulgado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a média global de consumo dessa droga em 2016 era de 6,4L *per capta*/ano em pessoas a partir dos 15 anos, variando entre regiões. Neste mesmo documento, o Brasil ocupou a 49ª posição com um consumo de 8,9L *per capta* e a Lituânia, o 1º lugar com 18,2L. No entanto, embora grande aceitação social, também é considerada como um dos maiores problemas de Saúde Pública e, consequentemente, socioeconômicos.

Conforme o guia *Lexicon of alcohol and drug terms* (OMS, 1994) e a *American Psychiatric Association* (1994), o alcoolismo é uma dependência química caracterizada pela ingestão compulsiva e progressiva do etanol e perda de controle sobre sua administração, com um estado de emergência de uso na ausência da droga. Antigamente, até a década de 1940, o termo se referia principalmente às consequências físicas do consumo excessivo de álcool em longo prazo e só mais tarde passou a ser considerado como quadro de doença, englobando todo e qualquer tipo de dano acarretado, seja ele físico, psicológico ou social; individual ou coletivo. Segundo dados divulgados no *Global status report on alcohol and health* (OMS, 2018), mais de 5% de todas as mortes no mundo foram relacionadas ao uso abusivo do álcool, no ano de 2016, o que equivale a mais de três milhões de mortes e representa uma proporção de 1 em 20.

Apesar de tudo isso, por ser de fácil acesso e legalmente distribuído em diversos estabelecimentos, essa droga é uma das primeiras substâncias psicoativas escolhidas entre os adolescentes. O famoso "*Heavy Drinking*", caracterizado por episódios de alto consumo, tem aumentado conforme os anos, passando de 4,6% para 13% em mulheres e de 17,9% para 29,4% em homens em todo o continente americano, principalmente entre os jovens de 15 a 19 anos, perdendo apenas para a Europa (DAWSON et al., 2008; PAHO, 2015).

A adolescência é um estágio crítico de maturação física, sexual e neural, que compreende o período dos 12 aos 18 anos em humanos, e em roedores, considera-se o *Post Natal Day* (PND) 28 a 42, de acordo com Spear (2000). É considerada como a transição da infância para a fase adulta e desempenha um papel muito

importante por envolver as principais alterações fisiológicas, estruturais e neurais. O encéfalo, por exemplo, passa por remodulações consideráveis como fortalecimento de circuitos neurais, aumento na densidade de massa branca e cinzenta e mudanças em áreas corticais, principalmente no córtex pré-frontal (CPF), e também em áreas límbicas (SPEAR, 2000).

Apesar de essas alterações serem essenciais para o desenvolvimento natural do indivíduo, as neuromodulações inerentes à maturação encefálica podem ser consideradas como certo fator de risco para a dependência a drogas de abuso. Neste período nota-se um aumento da busca pela novidade e impulsividade na tomada de decisões, o que podem fornecer a oportunidade de explorar novas experiências, incluindo o uso e abuso de drogas, tais como maconha, cigarro e álcool (ARNET, 1992; SPEAR, 2000).

O etanol, por sua vez, é uma substância capaz de agir em diferentes receptores, ativando e/ou desativando diversos circuitos neurais importantes. Em geral, doses altas promovem uma depressão no sistema nervoso central (SNC), resultado do aumento da condutância dos canais de cloreto acoplados ao receptor $GABA_A$ pela ligação alostérica da droga ao sitio. Além disso, interfere ainda no sistema glutamatérgico, reduzindo seus efeitos excitatórios por meio de uma ação antagonista no receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) (HOFFMAN et al., 1989). Segundo Allgaier (2002), os receptores desta classe, formados pelas subunidades NR1/NR2A ou NR1/NR2B, apresentam maior sensibilidade às ações do álcool que aqueles compostos de NR1/NR2C ou NR1/NR2D.

Comumente, os adolescentes costumam beber num padrão “*Binge drinking*”, que, segundo a OMS (2014), equivale à ingestão intensa de 60g ou mais de álcool puro pelo menos uma vez por mês. Nessas ocasiões, é muito frequente o relato de “blackouts”, por exemplo. Esses blackouts representam deficiências mais leves de memória induzidas pelo álcool, durante os quais os sujeitos são capazes de participar, mas que, posteriormente, não conseguem se lembrar dos fatos ocorridos durante o consumo da substância (JELLINEK, 1952; GOODWIN, 1995; WHITE, 2003). Contudo, o consumo contínuo pode levar a problemas mais graves. Efeitos do álcool na memória, assim como em outras vertentes, são apresentados numa

proporção dose-dependente, ou seja, de acordo com a dose ingerida o indivíduo tem respostas mais brandas ou mais severas.

O padrão de consumo denominado, em inglês, “binge drinking” (BD, ou intoxicação aguda) tem aumentado na população jovem. O *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) define o termo BD como um padrão de consumo que atinge concentrações equivalentes a 0,8 g/L de álcool no sangue em um curto período de tempo, aproximadamente 2 horas. A concentração de álcool no sangue pode chegar a 60 ou 70 g de álcool puro em mulheres e homens, respectivamente.

Em roedores ainda não se tem critérios definidos para esse termo, no entanto, a intoxicação por vapor de etanol é considerada como um modelo forçado de BD comumente usado para indução e estudo da dependência em animais.

Em 1973, Wise descreveu um procedimento de escalonamento de consumo, usando concentrações altas de etanol (20%), em que a solução alcoólica era oferecida aos animais em dias alternados (WISE, 1973), criando um modelo animal de consumo elevado de etanol. Mais recentemente, tem se observado que durante sessões curtas de acesso (15 a 30 minutos) a soluções de 20% de etanol, usando o modelo de auto-administração operante, os animais atingem concentrações altas de etanol (por volta de 0,6 g/L), o que poderia mimetizar um padrão BD em animais de laboratório (CARNICELLA et al., 2014; JEANBLANC et al., 2018). Estudos anteriores desenvolvidos por Becker e Lopez (2004), Lopez e Becker (2005) e Carrara-Nascimento e colaboradores (2013) demonstraram que o modelo de intoxicação por vapor de etanol seguido de um período de abstinência é capaz de aumentar o padrão de consumo voluntário da droga em animais C57BL/6 adultos. Outrossim, O’Dell et al. (2004) evidenciaram o aumento da autoadministração de álcool em ratos Wistar após a exposição intermitente de vapor de etanol, em comparação à exposição contínua. Dessa maneira, este modelo de intoxicação, além de promover um estado de dependência, também visa à avaliação do comportamento do consumo da droga nos animais.

De acordo com a literatura, a combinação da elevada ingestão precoce do álcool na adolescência contribui para danos mais graves e possíveis consequências duradouras (HANSON et al., 2011), como déficits de memória e problemas

cognitivos (BATES, BOWDEN, BARRY, 2002; CREGO, et al., 2009) e redução do volume do hipocampo (NAGEL, 2005; WELCH et al., 2013), além de maior suscetibilidade de desenvolver o alcoolismo (SQUEGLIA; JACOBUS; TAPERT, 2014). Ensaios com ratos adolescentes mostram maior sensibilidade à neurotoxicidade causada pelo álcool (MARKWIESE et al., 1998) e relatam que os déficits cognitivos podem ser iniciados em dois dias, decorrentes de alta interferência em mecanismos relacionados à consolidação e formação de memória, logo depois de duas doses de *binge* de etanol (de FERRON et al., 2015). Isso mostra o alto impacto de algumas intoxicações alcóolicas.

Pontualmente, o processo de formação de memória possui maquinaria adaptável e tem o hipocampo como estrutura chave para o armazenamento (MOSER, 2011), o qual é constituído por três camadas corticais, chamadas de *Cornu Ammonis* (CA) – CA1, CA2 e CA3 (de NO, R. F., 1934) e está presente na formação hipocampal (CA, giro denteado (GD), complexo subicular e córtex entorrinal (EC)) (SCHULTZ; ENGELHARDT, 2014).

A memória decorre de uma ação complexa, categórica e dependente de vários estágios, podendo ser classificada em dois grandes grupos quanto ao seu curso temporal de armazenamento: a memória de curto prazo e a memória de longo prazo. Dentro desta, pode-se ainda encontrar subdivisões que a classificam como explícita (declarativa) ou implícita (não declarativa/ procedural) (GRAF; SCHACTER, 1985).

As memórias explícitas referem-se àquelas em que a evocação é feita de maneira “consciente”, já as memórias implícitas são frequentemente evocadas de maneira “inconsciente” ou automática e podem ser produzidas de acordo com as experiências, como o *priming* (evocada por meio de pistas), por meio de condicionamentos (memória associativa ou não associativa) e de procedimentos, que se refere às habilidades (GRAF; SCHACTER, 1985). Além desta classificação apresentada, em 1987, Squire propôs um modelo em que essas memórias distinguem entre si de acordo com os diferentes aprendizados, como ideias, informações, linguagem e habilidades. Três anos depois, Tulving (1990) elucidou esses conceitos tipificando a memória declarativa em episódica, a qual contém

informações sobre experiências pessoais, e semântica, a qual se refere a fatos/eventos e conceitos.

Figura 1- Classificação dos diferentes tipos de memória.

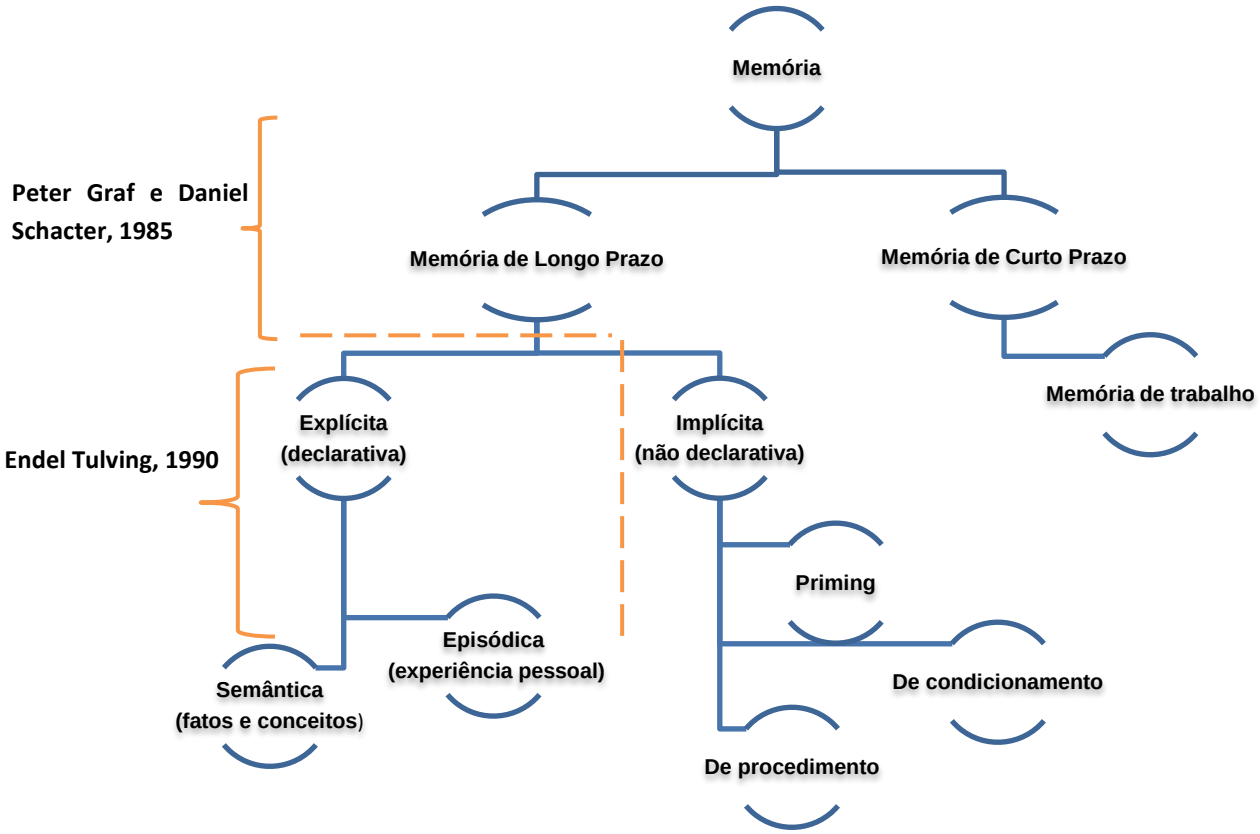


Diagrama esquematizando os diferentes tipos de memória. A classificação se dá de acordo com a natureza da informação. Fonte: Autora (2019)

Quanto aos mecanismos responsáveis por essa maquinaria de armazenamento, temos a plasticidade sináptica que, apesar de não estar relacionada somente à memória, exerce um papel crucial nesse processo. Essa propriedade corresponde à capacidade cerebral de alterar seus domínios morfofuncionais, aumentando ou diminuindo a força sináptica frente a uma estimulação anterior (HEBB, 1949).

Podendo ser dividida em plasticidade de curta ou de longa duração, a de curta duração ocorre quando a mudança na transmissão sináptica se mantém de milissegundos a rápidos minutos, modulando a resposta pós-sináptica, enquanto a

de longa duração se mantém por horas/dias e, por sua vez, é subdividida em *Long Term Potentiation* (LTP) e *Long Term Depression* (LTD), de acordo com o fortalecimento ou enfraquecimento das sinapses, respectivamente. De modo geral, quanto mais intenso esse estímulo, maior a capacidade de retenção de uma memória no encéfalo (CITRI; MALENKA, 2008).

Dessa maneira, a ativação persistente desses sinais de longa duração em uma sinapse pode transformar a memória de curta duração em memória de longa duração em um processo chamado de consolidação, induzindo transcrição gênica de algumas vias, como a da AMPc/PKA. (KANDEL et al., 2014). Dentre algumas ações resultantes dessa via, destaca-se a fosforilação no resíduo de serina133 da proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB), deixando-a na sua forma fosforilada (pCREB) e, assim, ativando o fator de transcrição CREB-1. Por sua vez, estando ativo, o CREB é capaz de induzir a expressão do gene do Fator neurotrófico derivado do encéfalo – *Brain derived neurotrofic factor* – (BDNF) (BRUNELLI; CASTELLUCCI; KANDEL, 1976; KANDEL, 2001; KANDEL, 2012; KANDEL et al., 2014).

O BDNF é o principal representante da classe das neurotrofinas e foi descrito por Barde e colaboradores em 1982 (FALKENBERG et al, 1992; MA, Y. L. et al, 1998). Ao grupo das neurotrofinas atribui-se função importante para o crescimento e manutenção neuronal, como proliferação celular, e plasticidade (PARK; POO, 2013). Ao BDNF atribuem-se esses papéis, bem como a promoção da LTP, fundamental no processo de formação de memórias de longo prazo (KORTE et al., 1995; PATTERSON et al., 1996). A saber, em experimentos realizados com fatias do hipocampo provindas de camundongos Knockout de BDNF foi demonstrado deficiência na LTP (KORTE et. al., 1995). Alonso e colaboradores (2002) demonstraram a participação do BDNF na formação de memória de curto e longo prazo em ratos: infusões bilaterais de um anticorpo Anti-BDNF no CA1 hipocampal prejudicaram a retenção de memória de curto prazo e longo prazo em testes de esquiva passiva, enquanto infusões bilaterais de BDNF melhoraram esses parâmetros.

No entanto, além da participação efetiva nos mecanismos de formação de memória, essas moléculas demonstram a capacidade de agir em outros tipos de

processos. Experimentos envolvendo infusão de BDNF no Núcleo Accumbens (NAc) de ratos, por exemplo, evidenciaram um aumento da atividade locomotora da cocaína nesses animais e da resposta induzida pela droga a um reforço condicionado a ela (HORGER et al., 1999). Complementarmente, outros estudos com superexpressão da atividade de CREB no NAc em ratos demonstraram o aumento da autoadministração de cocaína e, também, a correlação com o aumento do BDNF (LARSON et al., 2011). Dessa maneira, essas moléculas estariam relacionadas também com a dependência, atuando por meio dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico.

O desenvolvimento de transtornos por uso de substâncias depende não só de fatores genéticos, como também do ambiente e da interação entre eles. Além da capacidade de as drogas representarem um reforço positivo, decorrente da ativação dopaminérgica mesolímbica, envolvendo neurônios da área tegmental ventral (VTA) e do NAc (PIAZZA; LE MOAL, 1996; VOLKOW et al., 2004; NESTLER, 2005), estudos indicam, ainda, que a passagem do consumo moderado para a dependência pode estar relacionada a fatores cognitivos, já que as drogas perturbam os mecanismos neuronais envolvidos nas funções de aprendizado e memória (WHITE, 1996; HYMAN e MALENKA, 2001). Assim, podemos destacar a teoria de que o aprendizado associativo pode ser um mecanismo subjacente para a dependência (HYMAN E MALENKA, 2001).

Embora essa teoria não explique completamente esse transtorno, uma gama de estudos apresenta o CREB como responsivo à ação de diferentes classes de drogas de abuso, de maneira aguda e/ou crônica, como é o caso de psicoestimulantes, como a metanfetamina na área tegmental ventral (VTA) (SHAW-LUTCHMAN et. al, 2003) e opióides, como a morfina, no *Locus Ceruleus* (LC) e no NAc (GUITART et al., 1992; WIDNELL et al., 1994; WIDNELL et al., 1996; SHAW-LUTCHMAN et al., 2002) e etanol no córtex pré-frontal (CPF) (SOARES-SIMI et al, 2013), causando alterações de seus níveis e/ou de sua função, variando de acordo com a área cerebral examinada.

As exposições crônica e aguda de etanol provocam alterações nos níveis de CREB em diferentes regiões encefálicas. Em exposição crônica de etanol, os níveis de pCREB são reduzidos no cerebelo e no estriado de ratos (YANG et al., 1998 a,b),

entretanto, com a exposição aguda, nota-se um aumento dos níveis basais de AMPc, prolongado aumento na fosforilação do CREB e expressão de genes mediada pelo elemento responsivo ao AMPc (CRE) tanto em linhagem celular (NG108-15) (CONSTANTINESCU; DIAMOND; GORDON, 1999; ASHER et al., 2002) quanto em encéfalos isolados (YANG et al., 1996).

Soares-Simi e colaboradores (2013), por sua vez, investigaram as alterações na ativação de CREB no CPF e no hipocampo em camundongos adolescentes e adultos tratados com etanol de maneira aguda e crônica e constataram respostas diferentes, dependentes da idade. Enquanto a maior supressão da atividade de CREB no CPF foi observada em adolescentes tratados cronicamente com etanol, nos animais adultos essa mesma supressão apresentou-se maior no hipocampo em ambos os tratamentos. Além disso, esses resultados também confirmaram uma maior vulnerabilidade aos efeitos moleculares do etanol em adolescentes quando comparados aos adultos.

Em relação à região do hipocampo, também se observou interferência nas concentrações de pCREB após etanol. No tratamento crônico, esses níveis se mostram reduzidos, enquanto que com 72 horas de abstinência ocorre um aumento significativo no giro denteado (DG) (BISON; CREWS, 2003). Além disso, o álcool tem alto impacto na integridade física dessa estrutura. Há uma redução significativa do volume hipocampal em casos de pacientes alcoólicos adultos (SULLIVAN et al., 1995) e adolescentes (NAGEL, 2005; WELCH et al., 2013), bem como a perda neuronal na região do *Cornu Ammonis* e no giro denteado no hipocampo humano e de rato adolescente (BENGOECHEA; GONZALO, 1990 a/b), no entanto, essas ações parecem ter maiores consequências quando o consumo dessa droga começa de forma precoce na adolescência (WHITE; SWARTZWELDER, 2004).

Paralelamente, sobre o BDNF, pesquisas apontam relação entre a dose da droga e as concentrações dessa proteína, colocando-a, também, como um fator importante para a regulação do controle da passagem do consumo moderado e compulsivo dessa droga, podendo agir como modulador negativo. (LOGRIP, 2009). Tratamento agudo com álcool aumentaram significativamente os níveis de RNAm de BDNF no hipocampo e no estriado dorsal, mas não no córtex pré-frontal de camundongos (McGOUGH et al., 2004). Por outro lado, exposições consideradas

como tratamento crônico diminuíram esses níveis em regiões corticais de camundongos (LOGRIP, 2009) e a expressão gênica de BDNF no hipocampo de ratos (MacLENNAN, 1995). Similarmente em humanos, foi verificada a redução da concentração plasmática de BDNF em indivíduos dependentes e com histórico familiar de alcoolismo (JOE, 2007).

Estudos, ainda, confirmam interferência na execução de diferentes testes de memória nos animais que tiveram contato com o álcool durante o período de adolescência (SCHULTEIS et al., 2008; CIPPITELLI et al., 2010; RISHER et al., 2013). No labirinto aquático de Morris, Schulteis e colaboradores (2008), por exemplo, viram um desempenho prejudicado da memória de trabalho de ratos adultos jovens, os quais tiveram uma exposição intermitente e crônica de etanol na sua adolescência, em comparação aos controles. Os pesquisadores observaram que os animais que passaram pela exposição à droga apresentavam um esquecimento mais rápido das informações espaciais, no intervalo de duas e quatro horas entre as sessões do teste.

Sabendo disso, é razoável sugerir que tratamentos cuja ação produz alterações positivas sobre esses alvos mencionados em áreas cerebrais cruciais, como o hipocampo, amenizem a vulnerabilidade da autoadministração e os efeitos negativos adquiridos com o uso crônico dessa droga, além da melhoria na recuperação. Um exemplo de que tal hipótese possui sentido é a resposta da diminuição do consumo após infusões de BDNF no estriado dorso-lateral (JEANBLANC et al., 2009).

Seguindo esse raciocínio, a atividade física surge como uma intervenção não invasiva e terapêutica com potencial de reversão de alguns danos relacionados ao etanol. Evidências indicam a capacidade da corrida voluntária em aumentar a expressão gênica de BDNF em regiões cerebrais específicas, como observado, principalmente, no CA1 e CA4 do hipocampo de ratos com acesso livre à roda durante 2, 4 e 7 noites, além de uma relação positiva entre a distância percorrida e o RNAm de BDNF nessa estrutura (NEEPER et al., 1995; OLIFF et al., 1998). Exercício forçado de baixa (15m/min durante 30min) e moderada (25m/min durante 30min) intensidade também foi capaz de aumentar a expressão de BDNF no hipocampo (SOYA et al., 2007). Em humanos, foi possível ver o aumento do volume

hipocampal nos dois hemisférios (esquerdo e direito) em indivíduos adultos, entre 55 e 85 anos, com atividade aeróbica moderada, sendo capaz de reverter a perda do volume hipocampal natural adquirida com o passar dos anos (ERICKSON et al., 2011). Os efeitos dessa alternativa sobre o CREB também são evidentes. Em ratos submetidos à atividade física, notou-se concentrações aumentadas dessa proteína na sua forma fosforilada (pCREB) no hipocampo após uma única noite de corrida em roda e permaneceram elevados com 3 e 7 dias após (SHEN et al., 2001), além de relatar forte reparo neuronal com BDNF em cultura celular, associado com estimulação de CREB e altos níveis de pCREB em áreas corticais e hipocampais (YANG et al., 2013).

Somado a esses dados, pesquisas apresentam efeitos benéficos da atividade física no tratamento da dependência química (KEYWORTH et al., 2018). Em estudos de abstinência com humanos, por exemplo, foi relatada redução do estado negativo, da busca compulsiva pelo cigarro e dos sintomas de abstinência, como irritabilidade, em mulheres fumantes em tratamento com exercício físico aeróbico (BOCK et al., 1999; DANIEL; CROPLEY; FIFE-SCHAW, 2006; WILLIAMS et al., 2011). Em modelos animais, rodas de corrida reduziram o comportamento ansioso de ratos tratados com morfina e abstinentes a ela (MILADI-GORJI; RASHID-POUR; FATHOLLAHI, 2012), semelhantemente ao que acontece em humanos, nos quais o exercício diminui a ansiedade (SALMON, 2001).

Em casos de ratos tratados com álcool, essa medida resultou em uma diminuição na procura da droga, servindo como medida protetora na abstinência (SOMKUWAR et al., 2016), bem como uma diminuição do consumo, em hamsters macho (HAMMER et al., 2010). Em outro estudo analisando o efeito do exercício físico em camundongos adolescentes C57BL/6, observou-se a diminuição no consumo voluntário da droga, na preferência por ela, bem como um aumento significativo na expressão de BDNF e de mRNA BDNF no hipocampo (GALLEGO et al., 2015).

Dessa forma, este trabalho propõe o estudo dos efeitos da atividade física, a partir da corrida voluntária, sobre prejuízos da memória induzidos pelo etanol, avaliando os mecanismos moleculares relacionados ao CREB e um de seus genes-alvo, o BDNF. Para tanto, foi usado o modelo de intoxicação por vapor de álcool,

seguido de consumo voluntário, como modelo de “*binge drinking*”. Assim, a atividade física surgiria como uma medida terapêutica natural capaz de atenuar ou reverter possíveis alterações de memória promovidas pelo consumo excessivo, elevando as concentrações dessas 2 moléculas-alvo.

2 OBJETIVOS

Este trabalho visa avaliar os efeitos da atividade física na memória e em marcadores neuroquímicos relacionados à memória, em camundongos C57BL6 submetidos a um modelo de consumo excessivo de etanol (“binge drinking”) na adolescência.

Desse modo, de maneira especifica, foram analisados os seguintes parâmetros:

- Memória de reconhecimento com contexto espacial de curto e longo prazo
- Expressão proteica de BDNF e CREB no hipocampo por Western Blotting

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 adolescentes, com PND=28 dias, fornecidos pelo Biotério CEDEME, do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram levados para o biotério de manutenção Leal Prado uma semana antes do inicio das sessões de consumo para adaptação e mantidos individualmente em gaiolas de policarbonato cristal (30x20x13cm), com alimento e água *ad libitum* e temperatura controlada em 23 °C em ciclo claro/escuro invertido (sendo as luzes apagadas às 8h) durante toda a duração do protocolo. Luzes vermelhas foram utilizadas para lidar com os animais durante a fase escura dentro da sala. Todos os procedimentos de cuidados, manutenção e tratamento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo e da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob números registrados de protocolos 133/2017 e 4122080618, respectivamente.

3.2 Soluções utilizadas

3.2.1 Etanol 20% para o consumo voluntário no modelo de escolha entre duas garrafas (“Two Bottle Choice”)

A solução disponível para consumo de etanol foi preparada a 20% (v/v), com água filtrada, a partir de etanol a 95% (Labsynth®).

3.2.2 Soluções injetadas previamente à intoxicação pela câmara de vapor – Etanol 8% / Salina 0,9% + Pirazole (Sigma Aldrich)

Antes dos animais serem colocados nas câmaras de vapor de álcool, a intoxicação era iniciada pela administração intraperitoneal de etanol (1,6 g/Kg; 8% v/v em salina) juntamente com o pirazole (1mmol/Kg), que é um inibidor da enzima álcool desidrogenase, para estabilizar a concentração sanguínea de álcool. As duas drogas eram injetadas em um volume de 0,2 mL/g de peso corpóreo. Os animais do grupo que não passaram pela intoxicação com vapor de etanol receberam injeções isovolumétricas de solução salina 0,9% e pirazole no mesmo horário em que os animais do grupo de intoxicação de etanol.

3.3 Consumo oral de álcool por livre escolha entre duas garrafas (“two bottle choice”)

A fim de atingir um maior consumo voluntário de etanol, o experimento foi realizado conforme o padrão “*Drinking in the Dark*” (DID) (RHODES et al., 2005) e durante a fase escura do ciclo circadiano, período em que os animais apresentam maior atividade (GIL et al., 1986).

De acordo com Rhodes et. al. (2005), camundongos C57BL/6 apresentam uma ingestão voluntaria de álcool maior durante a fase escura do ciclo, com um pico de consumo após 3h do inicio do período escuro. Além disso, esse protocolo é capaz de elevar farmacologicamente as concentrações sanguíneas de etanol para mais de 100mg/dL em apenas 2h de consumo. Esses valores foram observados associados com privação de água, entretanto, caíram 40% com a presença da mesma (RHODES et. al., 2007). Já em relação à disponibilidade de comida, Lyons et. al. (2008) demonstraram que a concentração sanguínea de álcool não varia de acordo com a presença ou ausência de comida, não sendo, portanto, um fator crítico para alterá-la.

No presente trabalho, os animais tiveram acesso livre à água e comida durante todo o período de contato da droga, dessa maneira, excluindo a sede como viés de estimulação do consumo. Durante o período de consumo, os animais foram expostos a duas garrafas de 30ml cada, uma contendo etanol 20% e a outra contendo água filtrada, 3h após o inicio da fase escura. As soluções foram trocadas diariamente e as posições das garrafas, alternadas ao longo do experimento, evitando o viés de preferência por lado. Após 2h e 4h de consumo, as garrafas eram retiradas. Todas elas foram pesadas antes e depois das sessões de consumo.

Em todos os testes foi colocada uma gaiola com duas garrafas controle para estimar o derramamento liquido devido à manipulação ou evaporação. Um maior vazamento foi evitado utilizando um bico com duas esferas e deixando apenas 2cm do bico para fora da rolha, impossibilitando, assim, que os animais conseguissem subir nos bicos.

3.3.1 Cálculo da quantidade de etanol consumido e da preferência por etanol

As diferenças nos pesos das garrafas (antes e imediatamente depois do consumo) foram convertidas em volumes ingeridos através das densidades da solução de etanol e de água. O volume de etanol ingerido foi então convertido em gramas de etanol/Kg de peso do animal, calculado pela fórmula abaixo. A densidade e a concentração da solução de etanol foram aplicadas para o coeficiente 0,16.

$C_{EtOH} = (V_{EtOH} \times 0,16) / p \times 1000$, onde:

C_{EtOH} é o consumo de etanol em g/Kg do animal

V_{EtOH} é o volume de etanol consumido em mL

P é o peso do animal em gramas. Os animais foram pesados todos os dias em que estavam sob o modelo de *Two Bottle Choice*.

A preferência (P) foi calculada pela proporção de ingestão do álcool e da ingestão total de fluidos, baseada na formula abaixo:

$P= V_{EtOH} / (V_{EtOH} + V_{H2O})$, onde:

V_{EtOH} é o volume de etanol consumido em mL

V_{H2O} é o volume de água consumido em mL

3.4 Exposição à câmara de vapor

Neste trabalho, o modelo usado foi semelhante ao de Becker e Lopez (2004, 2005) e Carrara-Nascimento et al. (2013). Os animais adolescentes foram subdivididos em grupos de Controle (CT), Vapor ar (VA) e Vapor etanol (VE), de acordo com a exposição à droga. Os grupos controle tiveram contato apenas com a água durante todo o protocolo, enquanto os grupos do vapor ar mantiveram o contato com o etanol apenas nos períodos de exposição ao consumo voluntário entre duas garrafas. Aqueles que passaram pelo vapor de etanol (VE) receberam dois ciclos de intoxicação, os quais cada um era composto de quatro dias de exposição ao vapor na proporção de 16h ON e 8h OFF (conforme Figura 3). Antes dos animais passarem pelas câmaras, recebiam injeções tal como citado na seção

3.2.2, mas aqueles do grupo controle não tiveram nenhuma manipulação ou tratamento.

O sistema de vaporização era composto de caixas viveiro padrão vedadas com acessórios para entrada e saída de ar, nas mesmas condições do biotério, ou seja, individualizados e com acesso livre à água e comida. O etanol 92,5% do sistema da câmara era volatilizado e misturado com o ar fresco. O oxigênio era ejetado por um compressor para o fundo do frasco a uma taxa de 6L/min para misturar-se com o etanol.

O vapor de etanol era produzido pelo gotejamento de etanol em um frasco térmico (Erlenmeyer) de 2L, mantido a 508ºC em uma manta de aquecimento diariamente. A exposição ao vapor de etanol era controlada utilizando válvulas de fluxo de ar para manter a concentração sanguínea de etanol constante e capaz de induzir a dependência sem colocar em risco a vida e saúde dos animais e as concentrações da substância variaram entre 22mg/L a 27mg/L dentro da câmara.

3.5 Coleta sanguínea para dosagem de etanol

As amostras de sangue (aproximadamente 250 µl) foram obtidas do grupo dos animais submetidos ao vapor de etanol no último dia de exposição à câmara, tanto na primeira, quanto na segunda semana. Imediatamente após a remoção dos animais das câmaras de inalação, o sangue era coletado pela veia submandibular para determinação da concentração sanguínea de etanol.

3.6 Atividade física pela roda de exercício - “Voluntary wheel running”

Vinte e quatro horas após o último consumo, os camundongos foram alocados em gaiolas individuais e subdivididos em grupos distintos. Metade dos animais de cada grupo (CT, VA e VE) permaneceu em gaiolas que continham uma roda de exercício, enquanto a outra metade de cada grupo não foi exposta à roda. Esse procedimento teve a duração de 14 dias, com acesso livre à água e comida.

O modelo e o tempo de atividade física voluntária foram escolhidos baseados em dados que apontam que a indução forçada e/ou prolongada do exercício físico pode ser considerada como um fator estressante, o que poderia induzir um decréscimo da expressão dos níveis de BDNF (MURAKAMI et al., 2005).

3.7 Análise comportamental

Todas as análises comportamentais foram feitas na fase escura do ciclo circadiano dos animais (das 8 às 20h).

3.7.1 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)

A memória episódica se refere àquela em que relaciona a evocação consciente e experiências pessoais atribuídas a ela (TULVING, 1990). Estudos sobre ela vêm sendo desenvolvidos em modelos animais, a fim de investigar interações morfofarmacológicas e comprometimento cognitivo, por exemplo.

O teste de reconhecimento de objetos foi desenvolvido primariamente por Ennaceur e Delacour, em 1988, e parte da capacidade exploratória intrínseca dos roedores e preferência pela novidade, ou seja, o princípio deste teste está relacionado com a preferência natural dos roedores em explorar objetos novos em vez de objetos familiares. Aqueles animais que passam mais tempo explorando os objetos novos indicam o reconhecimento do objeto familiar, consequentemente, uma modificação nesse padrão aponta desvio no comportamento natural e possíveis déficits de memória.

Neste trabalho, o modelo utilizado foi adaptado do original, proporcionando uma avaliação da memória de reconhecimento espacial, no qual foi realizado em três fases descritas abaixo:

- Fase de habituação: Os animais, um por vez, são colocados em um campo aberto (40 cm x 60 cm), permitindo que eles explorem o aparato na ausência de objetos durante 10 minutos por hora, durante 3 horas.

- Fase de exposição ou familiarização: os animais, um por vez, são colocados no campo aberto com dois objetos idênticos (A e A), sob iluminação fraca (40 lux), separados por uma distância padrão e filmados por 10 min, depois retirado e devolvidos as suas respectivas gaiolas.

- Fase teste: Um objeto A é mantido no teste, e o outro já conhecido (A) é trocado por um novo (K e L), com alteração do lugar, 1 hora e 24 horas após o treino, respectivamente, e filmados por 5 min. O teste de 1h após a familiarização avalia a resposta da memória de curto prazo, já o teste de 24h avalia a resposta da memória

de longo prazo. O teste de memória de curta duração foi realizado após 2, 7 e 13 dias de atividade física a qual os animais foram submetidos, e o de longa duração foi feito após 3, 8 e 14 dias de atividade física. Entre um animal e outro, todo o aparato foi limpo com álcool 70% a fim de evitar possíveis pistas olfatórias, mantendo as mesmas arenas entre os três testes de reconhecimento. Vale salientar ainda que para cada teste realizado foram repetidas as três fases (Habituação, Familiarização e Teste), no entanto, os objetos para cada teste foram diferentes, totalizando 6 objetos familiares (A e A/ B e B/ C e C) e 6 objetos novos (K e L/ X e Y/ Z e W).

A atividade exploratória é definida como o tempo que o animal passa cheirando, tocando o objeto com o focinho ou patas dianteiras ou quando o animal volta o focinho ao objeto a um raio menor ou igual a 2 cm. Foi analisado o tempo que o animal passou interagindo com os objetos e o resultado foi apresentado usando a razão de discriminação, em que:

Razão de Discriminação (RD) = tempo de exploração de objeto novo / (tempo de exploração do objeto novo + familiar).

Figura 2 - Representação do aparato e das fases do Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)

Fonte: Autora (2019)

A RD igual a 0,5 ou 50%, indica que o animal explorou os objetos novo e familiar de maneira igual e, portanto, que não houve preferência de objeto. Resultados dessa razão acima de 0,5 significam maior exploração do objeto novo e podem ser indicativos de uma boa memória, no entanto, valores abaixo de 0,5 significam maior exploração do objeto familiar e podem indicar déficit de memória.

3.7.1.1 Atividade Locomotora e avaliação do comportamento tipo ansioso no campo aberto

A partir do Teste de Reconhecimento de Objetos, o qual foi realizado em um campo aberto (40 cm x 60 cm), pôde-se avaliar a atividade locomotora e o comportamento tipo ansioso dos animais na primeira sessão da fase de habituação ao aparato. Cada animal foi colocado individualmente, tal como citado acima, e analisados os cinco primeiros minutos de gravação.

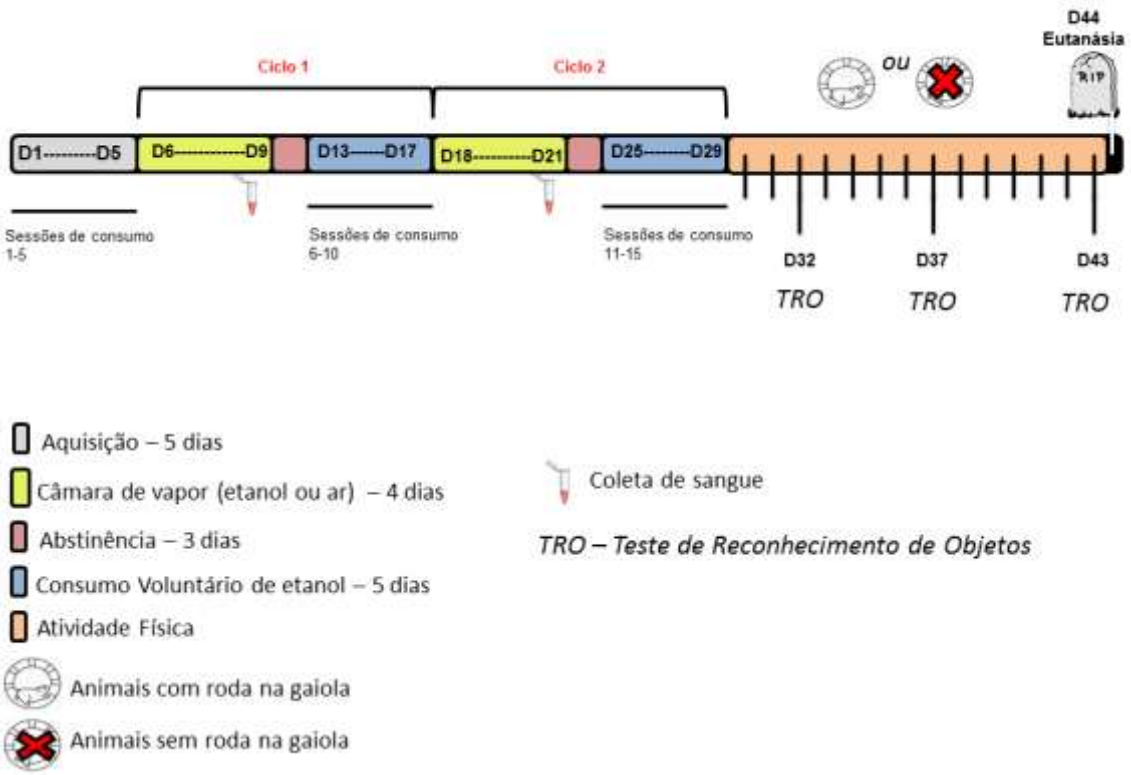
A distância percorrida total foi quantificada em centímetros pelo software *Ethovision* (Noldus, Wageningen, Holanda) e utilizada como indicativo da atividade locomotora, já o tempo gasto pelos animais nas arenas e nos centros foram quantificados em segundos pelo mesmo software e utilizadas como indicativo de comportamento tipo ansioso. A relação para este último comportamento foi feita a partir da porcentagem em que o animal ficou no centro em relação à periferia. Estes testes foram executados a fim de verificar quaisquer alterações comportamentais frente aos diferentes tratamentos utilizados, sendo importante para entender possíveis diferenças entre os grupos nos testes de memória espacial.

3.8 Protocolo experimental

Após o período de habituação durante sete dias na sala de experimentação, uma parte dos camundongos foi exposta ao protocolo de consumo voluntário de álcool entre duas garrafas ou TBC, conforme o padrão *Drinking in the dark* (“beber no escuro”), por 5 dias (D1-D5), a fim de estabelecer a linha de base do consumo voluntário inicial (aquisição, sessões de consumo 1 a 5), enquanto a outra permaneceu sem contato com a droga. Ao final dessa etapa, os animais foram divididos em grupos para, assim, serem expostos à câmara de vapor de etanol ou ar durante 4 dias (D6-D9), seguidos de 3 dias de abstinência (D10-D12), resultando nos grupos vapor etanol (VE) e vapor ar (VA), respectivamente. Após esse período, os dois grupos foram expostos a outro TBC (D13-D17, sessões de consumo 6-10), encerrando um ciclo. O protocolo foi repetido por mais um ciclo (D18-D29). No dia seguinte a última sessão de TBC (D30), alguns animais foram submetidos às gaiolas de atividade física com roda acoplada enquanto outros permaneceram em gaiolas padrão, sem roda, na qual permaneceram durante 14 dias (D30-D43). Concomitante à presença da roda na caixa, foi realizado o teste de reconhecimento de objeto final

(D32/D37/D43), conforme descrito anteriormente, a fim de analisar a memória de curto e longo prazo após três, oito e catorze dias de atividade física, respectivamente. No dia seguinte ao último TRO (D44), os animais foram eutanasiados por decapitação, sendo previamente anestesiados com Isoflurano, e os encéfalos, armazenados no freezer -80ºc para posteriores análises bioquímicas. Ao final do protocolo, foi gerado um total de seis grupos: CTSE – controle sedentário; CTAF – controle + atividade física; VASE – vapor de ar sedentário; VAAF – vapor de ar + atividade física; VESE – vapor de etanol sedentário; VEAF – vapor de etanol + atividade física. Vale ressaltar que antes de cada exposição à câmara de vapor, os animais eram pré-tratados com injeções intraperitoneais de salina+pirazole ou etanol+pirazole a depender do grupo experimental (vide seção 3.4) e que foram coletadas amostras de sangue pela veia submandibular dos animais nos dias D9 e D21 com o propósito de determinar a concentração sanguínea de etanol.

Figura 3 - Protocolo Experimental



Fonte: Autora (2019)

3.9 Análise dos níveis proteicos de BDNF e CREB no hipocampo pela técnica Western Blotting

3.9.1 Extração proteica

Os encéfalos foram descongelados e os hipocampos, dissecados. Após isso, as estruturas foram sonicadas (50% amplitude ± 5s) em um tampão de lise (TRIS HCl 1M pH 7,5; SDS 10%; Glicerol; NaCl 3M; NaF 500mM; β glicerolfosfato 500mM; inibidor de protease; DTT 0,1M; água Mili-Q) na proporção 1µg de tecido : 20µ de tampão e incubadas em gelo durante 20min. A seguir, as amostras foram centrifugadas (13.000g, 4ºC, 20min). O sobrenadante (extrato proteico) foi coletado para avaliação dos níveis proteicos de BDNF e CREB e armazenados em freezer -80ºC até o momento de uso. A determinação da concentração proteica foi feita em duplicata pelo método de Bradford (1976), utilizando a albumina de soro bovino (Sigma-Alderich, Brasil) para a curva padrão.

3.9.2 Eletroforese e Transferência

As amostras (30µg de proteína) foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris base 60mM; SDS 2%; Glicerol 25%; Azul de Bromofenol 0,1%) e fervidas à 94ºC por 5min. A seguir, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS em mini cubas verticais. Em cada um dos géis havia sempre duas amostras de cada grupo e o primeiro poço era sempre destinado ao marcador de peso molecular Kaleidoscope (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A migração foi iniciada em um gel de empilhamento 5% (acrilamida mix 30%; TRIS 1M pH 6,8; SDS 10%; persulfato de amônia 10%; TEMED; água mili-Q) e prosseguiu em gel de separação 12% (acrilamida mix 30%; TRIS 1,5M H 8,8; SDS 10%; persulfato de amônia 10%; TEMED; água mili-Q) sob voltagem constante de 100V(1h) para CREB e 100V (1h 50min) para BDNF. A eletroforese foi conduzida em tampão de corrida (TRIS-base 250mM; SDS 1%; Glicina 960mM).

O CREB foi transferido para membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,45µm (BioRad) e o BDNF para membrana de PVDF com porosidade de 0,22µm (Milipore), ambos por corrente elétrica gerada sob voltagem constante de 100 V por 1h. Todas as transferências foram realizadas na presença de tampão de transferência gelado (TRIS-base; Glicina; Metanol; água milii-Q).

3.9.3 Imunodetecção

3.9.3.1 BDNF

As membranas foram incubadas *overnight* em solução TTBS (Tris 1M pH 8,0; NaCl 150mM; Tween 20 0,1%; água mili-Q) acrescida de leite desnatado Molico (Nestle Brasil ltda., Araçatuba, SP, BRA) 5% sob agitação constante, à 4ºC, para bloqueio de ligações inespecíficas do anticorpo. Em seguida, as membranas foram, então, incubadas com o anticorpo primário policlonal *rabbit* anti-BDNF (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) em solução de TTBS com leite desnatado Molico (Nestlé) 5%, nas mesmas condições do bloqueio inicial.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas duas vezes em TTBS, durante 10min cada, e incubadas com o anticorpo secundário anti *rabbit* (1:50.000 Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) em solução de Molico 5%, diluído em TTBS, sob agitação em temperatura ambiente, por 1h. Em sequência, as membranas foram lavadas três vezes em TTBS e uma vez em TBS (Tris 1M pH 8,0; NaCl 150mM; água mili-Q) durante 10min cada. As bandas imunorreativas foram visualizadas com a solução de detecção *Immobilon Forte Western HRP Substrate* (Millipore Corp., USA) e reveladas pelo aparelho de detecção ChemiDoc Imaging system (BioRad).

Após a revelação, as membranas foram lavadas em solução de ácido acético 5% (uma vez) e em TTBS (duas vezes) para remoção dos anticorpos e, posteriormente, incubadas com o anticorpo primário anti-β-actin (1:40.000 Santa Cruz Biotechnology, em Molico 3%+TTBS) durante 1h sob agitação, em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas duas vezes com TTBS e incubadas por 45min com o anticorpo secundário anti *mouse* (1:100.000 em Molico 3%+TTBS), sob agitação constante em temperatura ambiente. Para a revelação da proteína controle (β-actin) as membranas passaram pelos mesmos procedimentos já descritos anteriormente.

As membranas reveladas foram salvas no computador e as densidades das bandas, quantificadas por meio do programa ImageJ. Os resultados foram expressos como porcentagem a partir das amostras controle da mesma membrana.

3.9.3.2 CREB

As membranas foram incubadas durante 1h em solução TTBS (Tris 1M pH 8,0; NaCl 150mM; Tween 20 0,1%; água mili-Q) acrescida de leite desnatado Molico (Nestle Brasil ltda., Araçatuba, SP, BRA) 5% sob agitação constante em temperatura ambiente, para bloqueio de ligações inespecíficas do anticorpo. Em seguida, as membranas foram, então, incubadas com o anticorpo primário policlonal *rabbit* anti-CREB (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) em solução de TTBS com leite desnatado Molico (Nestlé) 3% *overnight* à 4ºC.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas duas vezes em TTBS, durante 10min cada, e incubadas com o anticorpo secundário anti *rabbit* (1:50.000 Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) em solução de Molico 3%, diluído em TTBS, sob agitação em temperatura ambiente, por 1h. Em sequência, as membranas foram lavadas três vezes em TTBS e uma vez em TBS durante 10min cada. As bandas imunorreativas foram visualizadas com a solução de detecção *Immobilon Forte Western HRP Substrate* (Millipore Corp., USA) e reveladas pelo aparelho de detecção ChemiDoc Imaging system (BioRad).

Após a revelação, as membranas foram lavadas em solução de ácido acético 5% (uma vez) e em TTBS (duas vezes) para remoção dos anticorpos e, posteriormente, incubadas com o anticorpo primário *mouse* anti-GAPDH (1:40.000 Santa Cruz Biotechnology, em Molico 3%+TTBS) durante 1h sob agitação, em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas 2x com TTBS e incubadas por 45min com o anticorpo secundário anti *mouse* (1:100.000 em Molico 3%+TTBS), sob agitação constante em temperatura ambiente. Para a revelação da proteína controle (β-actin) as membranas passaram pelos mesmos procedimentos já descritos anteriormente.

As membranas reveladas foram salvas no computador e as densidades das bandas, quantificadas por meio do programa ImageJ. Os resultados foram expressos como porcentagem a partir das amostras controle da mesma membrana.

3.10 Análise estatística

Foram aplicadas análises paramétricas de ANOVA uma via e ANOVA duas vias para medidas repetidas e aplicado *post hoc* de Bonferroni, quando encontradas

diferenças significantes. Os gráficos plotados e as análises estatísticas foram desenvolvidos no GraphPad Prism 6 e no IBM SPSS Statistics 21, respectivamente. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da media (E.P.M), sendo considerada estatisticamente significativa qualquer diferença com $p<0,05$.

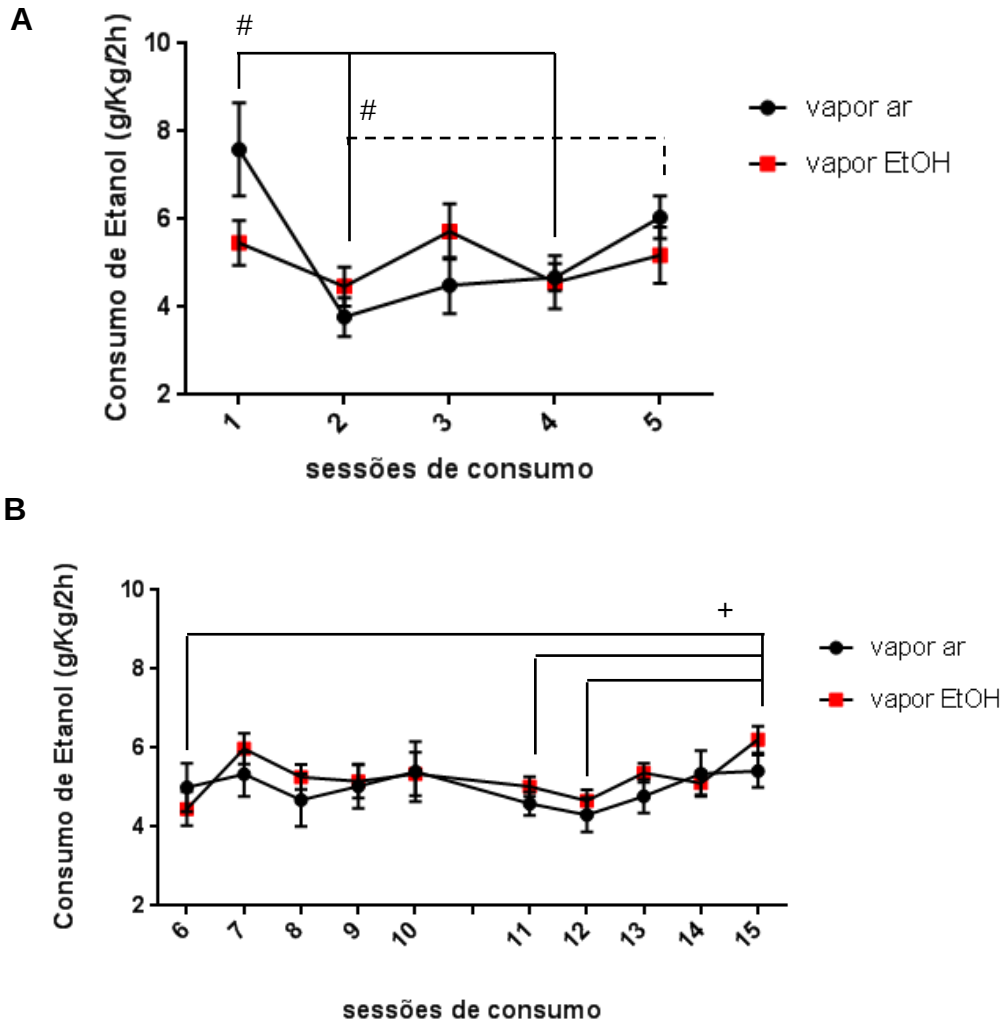
4 RESULTADOS

4.1 Consumo diário de etanol e preferência da droga em relação à água nos camundongos C57BL/6 adolescentes durante 2h

Os resultados da Figura 4A referem-se à fase de aquisição. Apesar da denominação vapor ar e vapor EtOH para distinguir os dois grupos, nessa fase os animais ainda não haviam sido expostos ao vapor de etanol e são semelhantes entre si, em relação ao consumo de etanol, conforme análise estatística. Para os valores do consumo de etanol durante 2h foi realizada ANOVA 2 vias de medidas repetidas. Conforme o consumo de etanol nas sessões diárias, durante a fase de aquisição (Fig.4A) houve efeito do fator tempo ($F_{(4, 120)} = 6.079$; $p < 0,001$) e do fator interação grupo x tempo ($F_{(4, 120)} = 3.090$; $p = 0,018$). A análise de *post hoc* de Bonferroni apontou diferenças no grupo vapor ar, quando comparado a ele mesmo, nas sessões de consumo 1-2 ($p<0,001$), 1-4 ($p = 0,010$) e 2-5 ($p = 0,003$), sem apresentar quaisquer diferenças nos animais do grupo vapor EtOH. Além disso, os resultados mostraram, ainda, que as três últimas sessões não variaram entre si e que não houve diferença na ingestão da droga entre os dois grupos ($F_{(1, 30)} = 0.196$; $p = 0,66$). Em conjunto, tais dados expressam uma estabilização do consumo.

Nas duas semanas referentes ao protocolo de livre escolha entre duas garrafas após múltiplas intoxicações com vapor de etanol, seguidas de abstinência (Fig.4B), observou-se efeito do tempo ($F_{(9, 270)} = 2.650$; $p = 0,0059$), mas sem diferença entre os grupos, sugerindo, portanto, que o tratamento não interferiu de maneira significativa no consumo livre em 2h ($F_{(1, 30)} = 0.364$; $p = 0,550$). Análises de post hoc de Bonferroni indicaram diferença na sessão 15 em relação às sessões 6 ($p=,005$), 11 ($p=0,016$) e 12 ($p=0,043$) para os animais do grupo vapor EtOH. Provavelmente o efeito observado do fator tempo foi decorrente das exposições intermitentes a duas garrafas (álcool e água). Em relação à interação entre esses dois fatores, também não houve efeito no consumo ($F_{(9, 270)} = 0.745$; $p =0,066$).

Figura 4 – Consumo diário de etanol 20% durante 2h

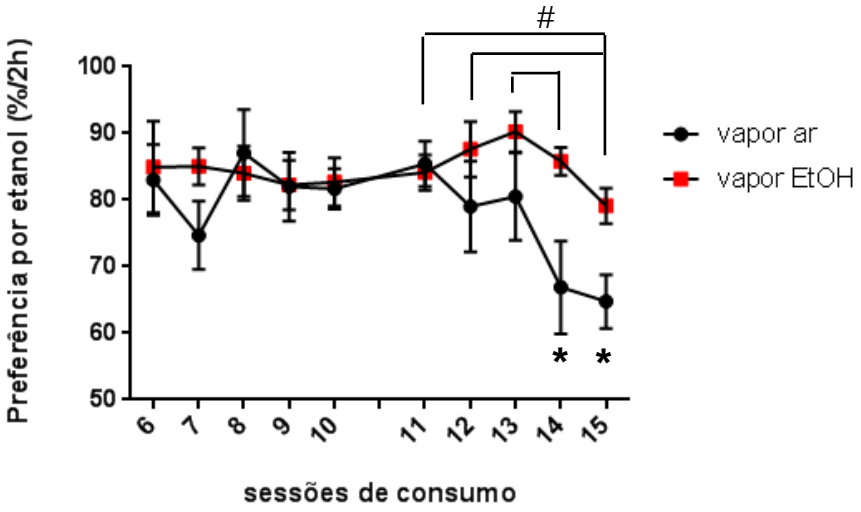


Consumo de etanol 20% em g/Kg/2h no protocolo de livre escolha entre duas garrafas em camundongos adolescentes (n=16/grupo) (A) antes e (B) após múltiplas intoxicações com vapor de etanol (vapor EtOH) ou nenhuma intoxicação (vapor ar). A) Consumo basal (fase de aquisição). B) Consumo após a exposição à câmara de com vapor de etanol ou ar. Dados analisados por ANOVA duas vias, seguidos de *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos como média ± E.P.M com $p<0,05$. #$p<0,05$ vapor ar comparado a ele mesmo nas sessões 1-2, 1-4 e 2-5, +$p<0,05$ vapor EtOH comparado a ele mesmo nas sessões 15-6, 15-11 e 15-12.

Quanto à preferência dos animais pela droga em relação à água, foi analisado esse parâmetro nas sessões de consumo livre por 2h subsequentes ao tratamento com vapor de etanol ou vapor de ar (Figura 5). A ANOVA-2 vias de medidas repetidas indicou efeito do fator tempo ($F_{(9, 270)} = 2.626$; $p = 0,006$) e grupo ($F_{(1, 30)} = 4,656$; $p = 0,039$), sem efeito da interação entre eles ($F_{(9, 270)} = 2,224$; $p = 0,070$). Análises posteriores indicaram diminuição da preferência no grupo vapor ar quando comparado a ele mesmo nas sessões 11-15 ($p<0,001$), 12-15 ($p=0,039$), 13-14

(p=0,047) e 13-15 (p=0,003) e diferença entre os dois grupos nas sessões 14 (p=0,014) e 15 (0,005). Portanto, os resultados sugerem que, apesar de não haver diferença entre os grupos em relação ao consumo, os animais expostos ao vapor de etanol tiveram maior preferência pela solução de etanol que os expostos ao vapor de ar nas primeiras 2 horas de consumo voluntário.

Figura 5 - Preferência por etanol no protocolo de livre escolha entre duas garrafas durante 2h



Preferência por etanol 20% em relação à agua no protocolo de livre escolha entre duas garrafas em camundongos adolescentes C57BL/6 (n=16/grupo) após múltiplas intoxicações com vapor de etanol (vapor EtOH) ou nenhuma intoxicação (vapor ar). Dados analisados por ANOVA duas vias, seguidos de *post hoc* de Bonferroni e resultados expressos em porcentagem por 2h. Valores expressos como média ± E.P.M com p<0,05. *p<0,05 entre os grupos e #p<0,05 grupo vapor ar em relação a ele mesmo

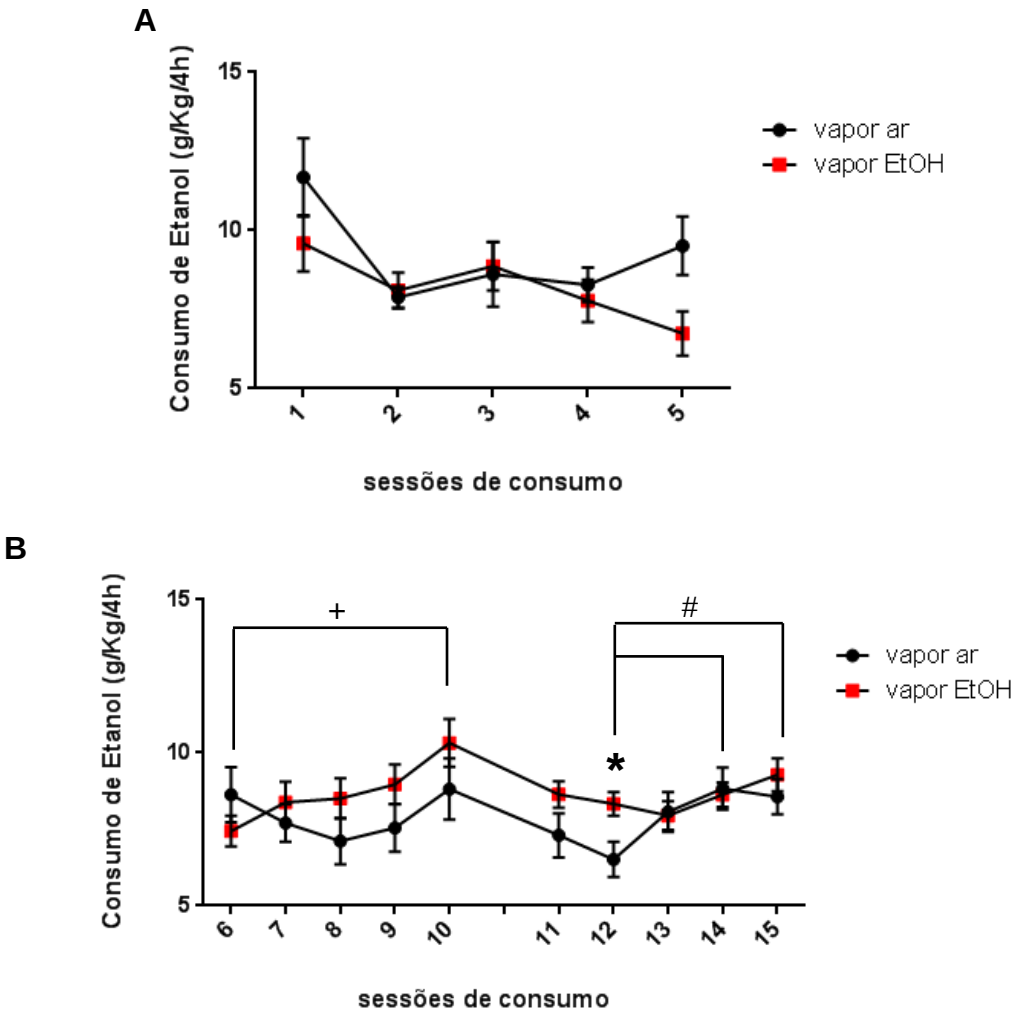
4.2 Consumo diário de etanol e preferência da droga em relação à água nos camundongos C57BL/6 adolescentes durante 4h

Para os valores do consumo de etanol durante 4h foi realizada ANOVA 2 vias de medidas repetidas. Conforme o consumo de etanol nas sessões diárias, durante a fase de aquisição (Fig.6A) houve efeito do fator tempo ($F_{(4, 120)} = 5.431$; $p < 0,001$), sem efeito da interação grupo x tempo ($F_{(4, 120)} = 2.066$; $p = 0,089$) ou do fator grupo ($F_{(1, 30)} = 1.712$; $p = 0,200$). Esses dados indicam uma estabilização do consumo.

Analisando o consumo da droga nas semanas subsequentes às múltiplas intoxicações com vapor de etanol, seguidas de abstinência, no período de 4h (Fig.6B), pôde-se notar efeito do tempo ($F_{(9, 270)} = 3.381$; $p < 0,001$) e ausência do

efeito do fator grupo ($F_{(1, 30)}$ = 1.220; p = 0,278). No entanto, no consumo de 4h, diferentemente do de 2h, houve efeito da interação entre os fatores ($F_{(9, 270)}$ = 1,999; p= 0,0396), a qual, após análises de *post hoc* de Bonferroni, indicou diferenças entre os dois grupos no dia 12 (p = 0,014); o grupo vapor ar apresentou diferenças, quando comparado a ele mesmo, entre os dias 12–14 (p = 0,003) e 12–15 (p = 0,024) e o grupo vapor EtOH apresentou diferença, quando comparado a ele mesmo, entre os dias 6 e 10 (p = 0,032). Ou seja, o escalonamento de consumo de etanol ocorreu de forma mais precoce entre aqueles expostos ao vapor de etanol.

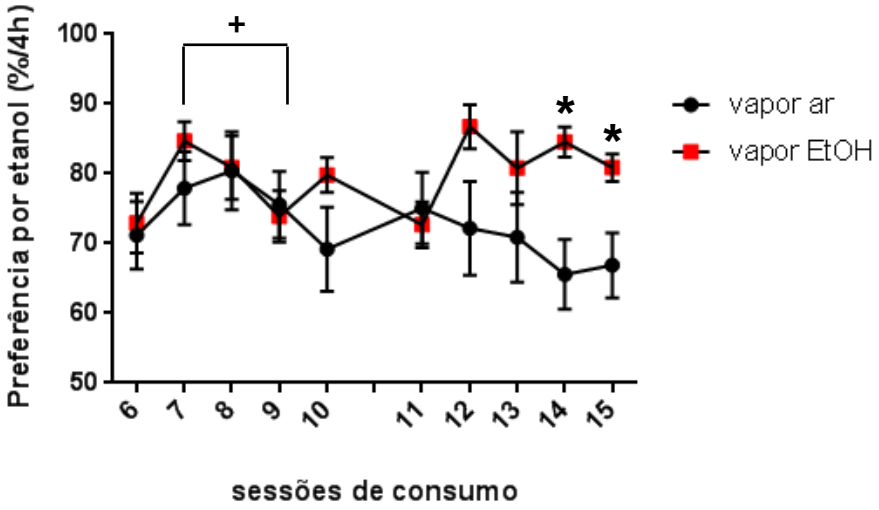
Figura 6 - Consumo diário de etanol 20% durante 4h



Consumo de etanol 20% em g/Kg/4h no protocolo de livre escolha entre duas garrafas em camundongos adolescentes (n=16/grupo) (A) antes e (B) após múltiplas intoxicações com vapor de etanol (vapor EtOH) ou nenhuma intoxicação (vapor ar). A) Consumo basal (fase de aquisição). B) Consumo após a exposição à câmara de com vapor de etanol ou ar. Dados analisados por ANOVA duas vias, seguidos de *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos como média ± E.P.M com p<0,05. *p=0,014 entre os grupos; #p<0,005 grupo vapor ar em relação a ele mesmo; +p=0,032 grupo vapor EtOH em relação a ele mesmo.

Quanto à preferência dos animais pela droga em relação à agua, foi analisado esse parâmetro nas sessões de consumo livre por 4h subsequentes ao tratamento com vapor de etanol ou vapor de ar (Figura 7). Como resultados, observaram-se efeitos da interação grupo x tempo ($F_{(9, 270)} = 2.677$; $p = 0,005$) e do fator tempo ($F_{(9, 270)} = 1,931$; $p = 0,04$), sem efeito do fator grupo $F_{(1, 30)} = 2,270$; $p = 0,1424$). A análise de *post hoc* de Bonferroni indicou diferenças entre os dois grupos nos dias 14 ($p = 0,002$) e 15 ($p = 0,009$) e apenas o grupo vapor EtOH expressou diferença, quando comparado a ele mesmo (dias 7 e 9 ($p = 0,002$)). Portanto, a exposição ao vapor de etanol mostrou-se eficaz no que diz respeito a alterações na preferência pela droga.

Figura 7 - Preferência por etanol no protocolo de livre escolha entre duas garrafas durante 4h



Preferência por etanol 20% em relação à agua no protocolo de livre escolha entre duas garrafas em camundongos adolescentes C57BL/6 (n=16/grupo) após múltiplas intoxicações com vapor de etanol (vapor EtOH) ou nenhuma intoxicação (vapor ar). Dados analisados por ANOVA duas vias, seguidos de *post hoc* de Bonferroni e resultados expressos em porcentagem por 4h. Valores expressos como média ± E.P.M com $p<0,05$.*$p<0,01$ entre os grupos; +$p=0,002$ grupo vapor EtOH quando comparado a ele mesmo.

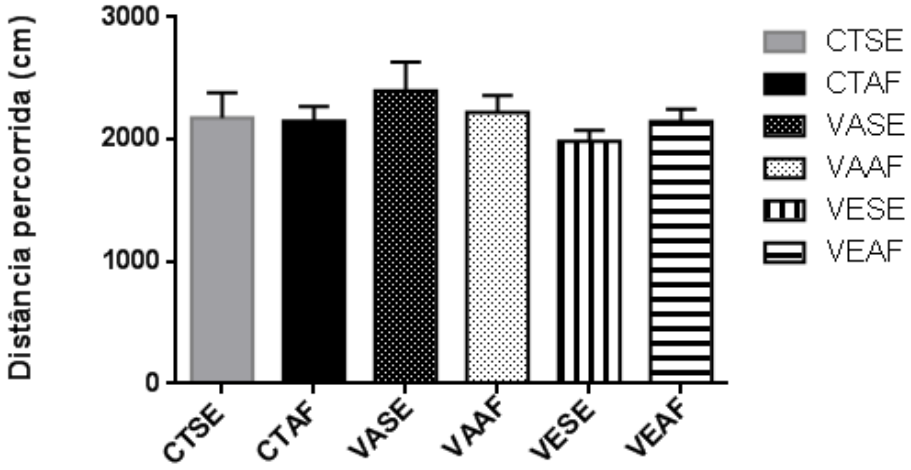
4.3 Análises Comportamentais

4.3.1 Registro da atividade locomotora no campo aberto e do comportamento tipo ansioso

Os animais foram avaliados durante a primeira habituação do Teste de Reconhecimento de Objetos durante cinco minutos. Para a análise da atividade

locomotora foi realizada ANOVA de uma via. Os resultados demonstraram que o tratamento não alterou a distância percorrida (cm) nos diferentes grupos experimentais ($F_{(5,\ 33)}$ = 0,7567; p = 0,587). Esse resultado sugere que qualquer alteração observada no teste de memória não se deve a diferenças motoras entre os grupos.

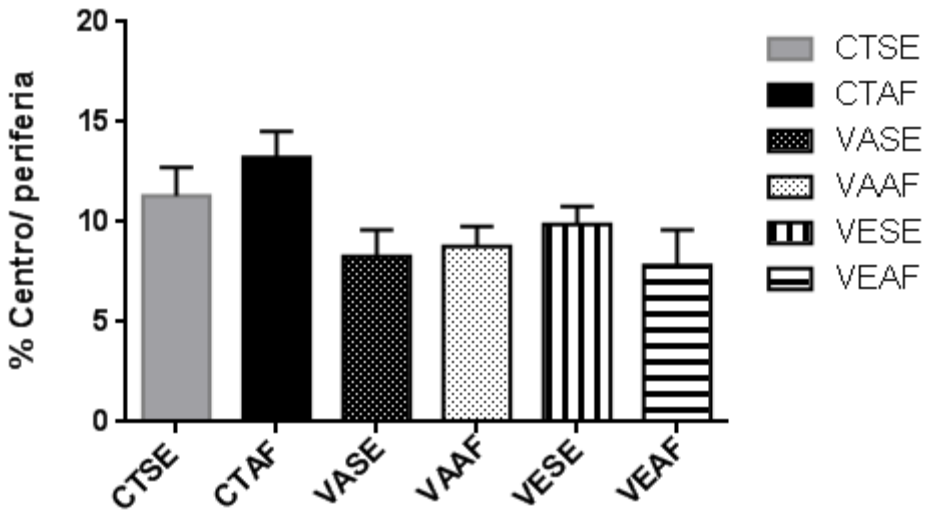
Figura 8 - Distância percorrida no campo aberto em cinco minutos



Distância percorrida (cm) nos diferentes grupos experimentais - controle sedentário (CTSE) (n=6), controle + atividade física (CTAF) (n=7), vapor ar sedentário (VASE) (n=7), vapor ar + atividade física (VAAF) (n=5), vapor etanol sedentário (VESE) (n=7) e vapor etanol + atividade física (VEAF) (n=7). Dados analisados por ANOVA uma via, seguidos de *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos como média ± E.P.M com p<0,05.

Em relação ao comportamento tipo ansioso foi realizado o teste de variância ANOVA uma via e observado que o tratamento também não promoveu diferenças nesse aspecto (F(5, 28) = 2,435; p = 0,0594). Sendo assim, a “ansiedade” dos animais estava em níveis semelhantes nos diferentes grupos.

Figura 9 - Comportamento tipo ansioso no campo aberto



Grupos experimentais - controle sedentário (CTSE) (n=5), controle + atividade física (CTAF) (n=6), vapor ar sedentário (VASE) (n=6), vapor ar + atividade física (VAAF) (n=5), vapor etanol sedentário (VESE) (n=6) e vapor etanol + atividade física (VEAF) (n=6). Dados analisados por ANOVA uma via. Valores expressos como média ± E.P.M com $p<0,05$.

4.3.2 Avaliação da memória espacial pelo Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)

Os resultados para o teste de reconhecimento de objetos estão representados nas Figuras 10, 11 e 12, onde foram analisados os parâmetros de Razão de Discriminação (RD) e, para facilitar a compreensão desse valor, o tempo de exploração (s) entre os objetos na memória de curto (1h) e longo prazo (24h). Para todos os parâmetros foram aplicados testes de ANOVA duas vias.

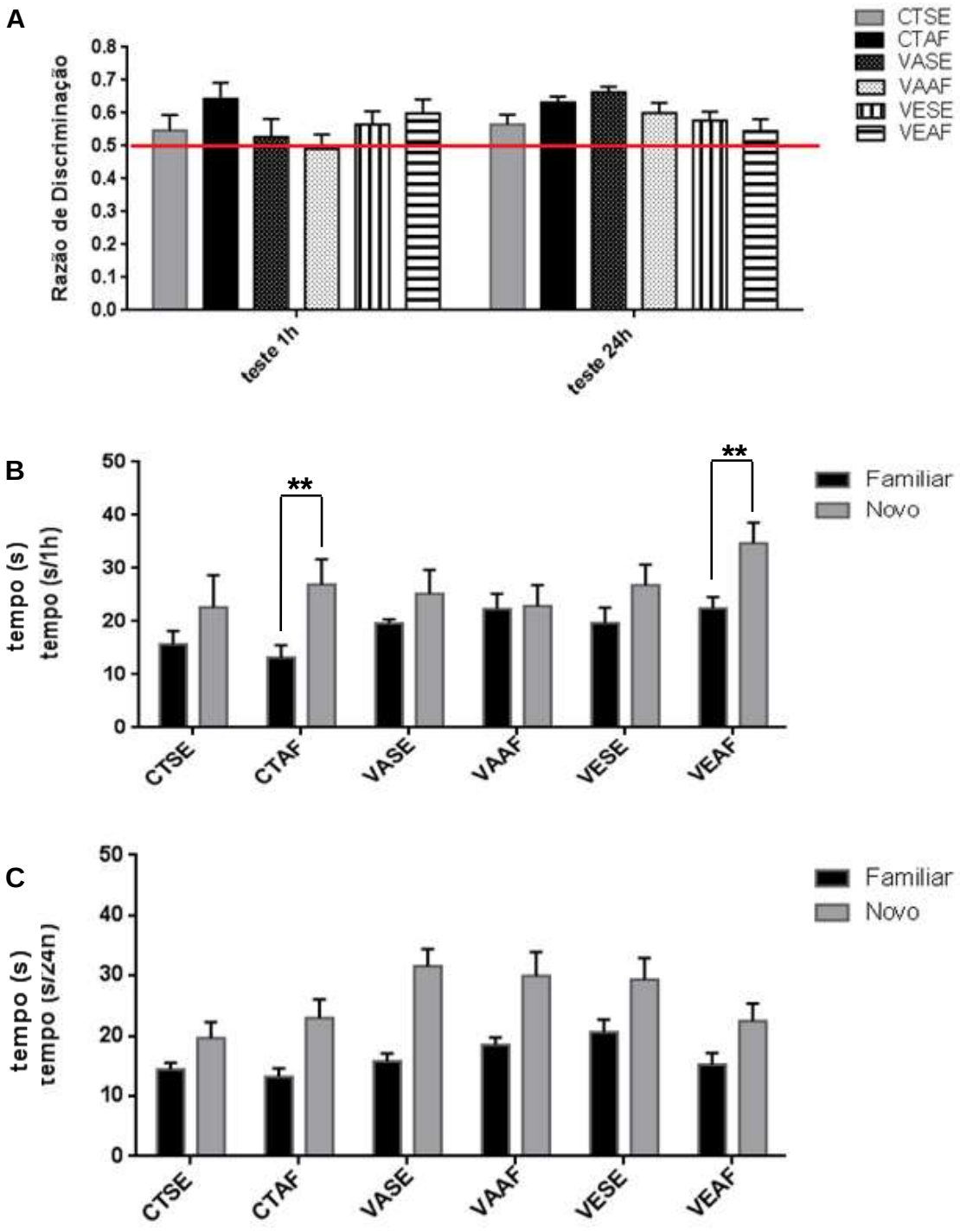
4.3.2.1 Razão de Discriminação e tempo de exploração entre os objetos familiar e novo após três dias de atividade física

Na RD (Fig.10A) os diferentes grupos discriminaram os objetos familiar e novo de maneira semelhante, tanto na memória de curta (teste1h), como na de longa duração (teste24h), indicando que o tratamento não interferiu nesse parâmetro ($F_{(5, 42)} = 1,696$; $p = 0,1568$) nem o teste realizado ($F_{(1, 42)} = 2,296$; $p = 0,137$) após três dias de atividade física. Além disso, não houve efeito da interação entre esses fatores ($F_{(5, 42)} = 1,691$; $p = 0,158$).

Na memória de curta duração (Fig.10B) observou-se apenas efeito de exploração de objetos ($F_{(1, 42)}$ = 17,25; p = 0,0002), sem efeito do tratamento ($F_{(5, 42)}$ = 1,346; p = 0,2646) ou da interação entre os dois fatores ($F_{(5, 42)}$ = 1,110; p=0,3695), sugerindo que todos os grupos discriminaram melhor o objeto novo. No entanto, a partir de análises posteriores com múltiplas comparações de Teste t, foram constatadas diferenças entre os dois objetos nos grupos CTAF (p = 0,004) e VEAF (p = 0,010). Os animais controles expostos à atividade física exploraram o objeto novo por mais tempo do que o objeto familiar, efeito não observado naqueles que apenas consumiram etanol e foram também expostos à atividade física. De forma interessante, a atividade física induziu um efeito semelhante ao observado nos animais controles, em animais expostos à câmara de vapor.

Na memória de longa duração (Fig.10C) observou-se efeito do objeto ($F_{(1, 42)}$ = 99,38; p<0,0001) e do tratamento ($F_{(5, 42)}$ = 2,539; p = 0,042), sem interação entre ambos ($F_{(5, 42)}$ = 2,339; p = 0,058). Nas análises posteriores de múltiplas comparações foi observado que todos os grupos discriminaram bem o objeto novo e que o fator tratamento foi observado apenas quando comparados o objeto familiar dos grupos CTAF e VESE (p=0,021).

Figura 10 – Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) após 3 dias de atividade física



Grupos experimentais: controle sedentário (CTSE), controle + atividade física (CTAF), vapor ar sedentário (VASE), vapor ar + atividade física (VAAF), vapor etanol sedentário (VESE) e vapor etanol + atividade física (VEAF) (n=8/grupo). Foram analisados os seguintes parâmetros: a razão de discriminação em testes de memória de curto (1h) e longo prazo (24h) (A) e o tempo (s) de exploração dos objetos familiar e novo na memória de curto (1h) (B) e longo prazo (24h) (C). Dados analisados por ANOVA duas vias, seguidos de múltiplas comparações de teste t. Valores expressos em média ± E.P.M com $p<0,05$. **$p<0,01$ quando comparado à exploração dos objetos no grupo e +$p<0,05$ quando comparado o objeto familiar entre o grupo VESE e CTAF.

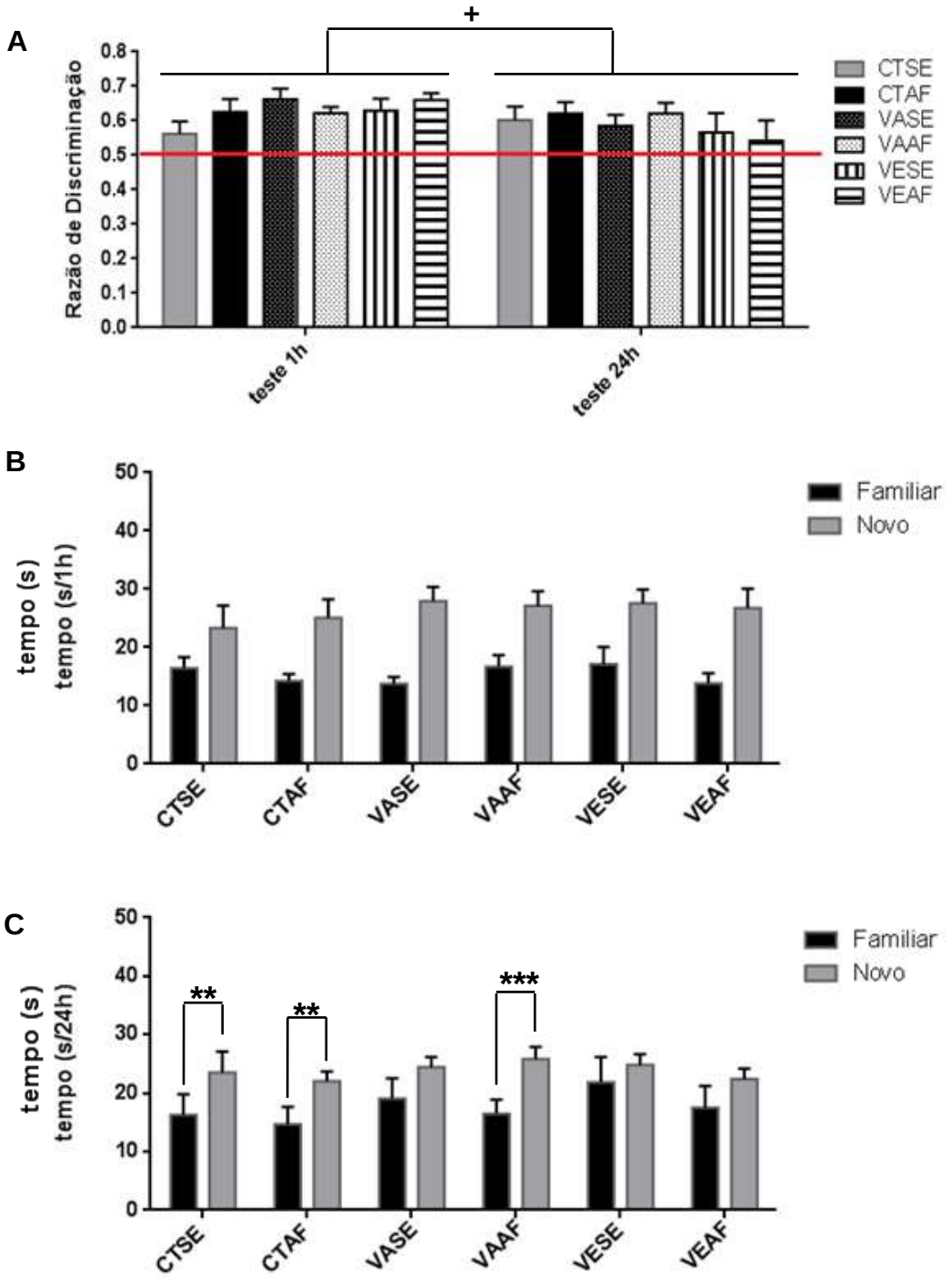
4.3.2.2 Razão de Discriminação e tempo de exploração entre os objetos familiar e novo após oito dias de atividade física

Nos resultados da RD (Fig.11A) os diferentes grupos discriminaram melhor os objetos na memória de curta duração (teste1h) quando comparados com a memória de longa duração (teste24h). No entanto, não foram encontradas diferenças entre os grupos nesse parâmetro. Esses dados indicam que há efeito no tipo de memória a qual os animais são testados ($F_{(1, 42)} = 4,482$; $p = 0,040$), sem efeito do tratamento ($F_{(5, 42)} = 0,316$; $p = 0,9001$) ou da interação entre os dois fatores ($F_{(5, 42)} = 1,842$; $p = 0,1254$) após oito dias de atividade física.

Na memória de curta duração (Fig.11B) observou-se efeito de exploração de objeto ($F_{(1, 42)} = 94,19$; $p<0,0001$), sem efeito do tratamento ($F_{(5, 42)} = 0,2791$; $p = 0,922$) ou da interação ($F_{(5, 42)} = 0,8279$; $p = 0,5371$), indicando que todos os grupos discriminaram melhor o objeto novo e que, portanto, exploraram-no por mais tempo em relação ao objeto familiar de maneira similar entre eles.

Em relação à memória de longa duração (Fig.11C) observou-se efeito de exploração de objeto ($F_{(1, 42)} = 26,01$; $p<0,0001$), sem efeito do tratamento ($F_{(5, 42)} = 0,4813$; $p = 0,7882$) ou interação entre ambos ($F_{(5, 42)} = 0,5785$; $p = 0,7182$). A partir de análises posteriores com múltiplas comparações de Teste t, foram constatadas diferenças entre os dois objetos nos grupos CTSE ($p=0,01$), CTAF ($p=0,017$) e VAAF ($p=0,002$). Nos demais grupos, a exploração entre os dois objetos foi semelhante. Os resultados sugerem que a atividade física "*per se*" não promoveu um aumento no tempo de exploração do objeto novo, quando comparado com o grupo controle sedentário. Entretanto, a atividade física exerceu um efeito benéfico em relação à memória dos animais que consumiram álcool voluntariamente e foram expostos às rodas de exercício (VAAF), uma vez que esses exibiram um comportamento exploratório ao objeto novo semelhante ao controle CTAF e maior do que o grupo VASE. No mais, esse efeito protetor não foi atingido quando os animais foram expostos à câmara de vapor.

Figura 11 - Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) após 8 dias de atividade física



Grupos experimentais: controle sedentário (CTSE), controle + atividade física (CTAF), vapor ar sedentário (VASE), vapor ar + atividade física (VAAF), vapor etanol sedentário (VESE) e vapor etanol + atividade física (VEAF) (n=8/grupo). Foram analisados os seguintes parâmetros: a razão de discriminação em testes de memória de curto (1h) e longo prazo (24h) (A) e o tempo (s) de exploração dos objetos familiar e novo na memória de curto (1h) (B) e longo prazo (24h) (C). Dados analisados por ANOVA duas vias seguido de múltiplas comparações de teste t. Valores expressos em média ± E.P.M com $p<0,05$. +$p<0,05$ entre os dois testes, **$p<0,010$ e ***$p=0,002$ entre os objetos do mesmo grupo.

4.3.2.3 Razão de Discriminação e tempo de exploração entre os objetos familiar e novo após catorze dias de atividade física

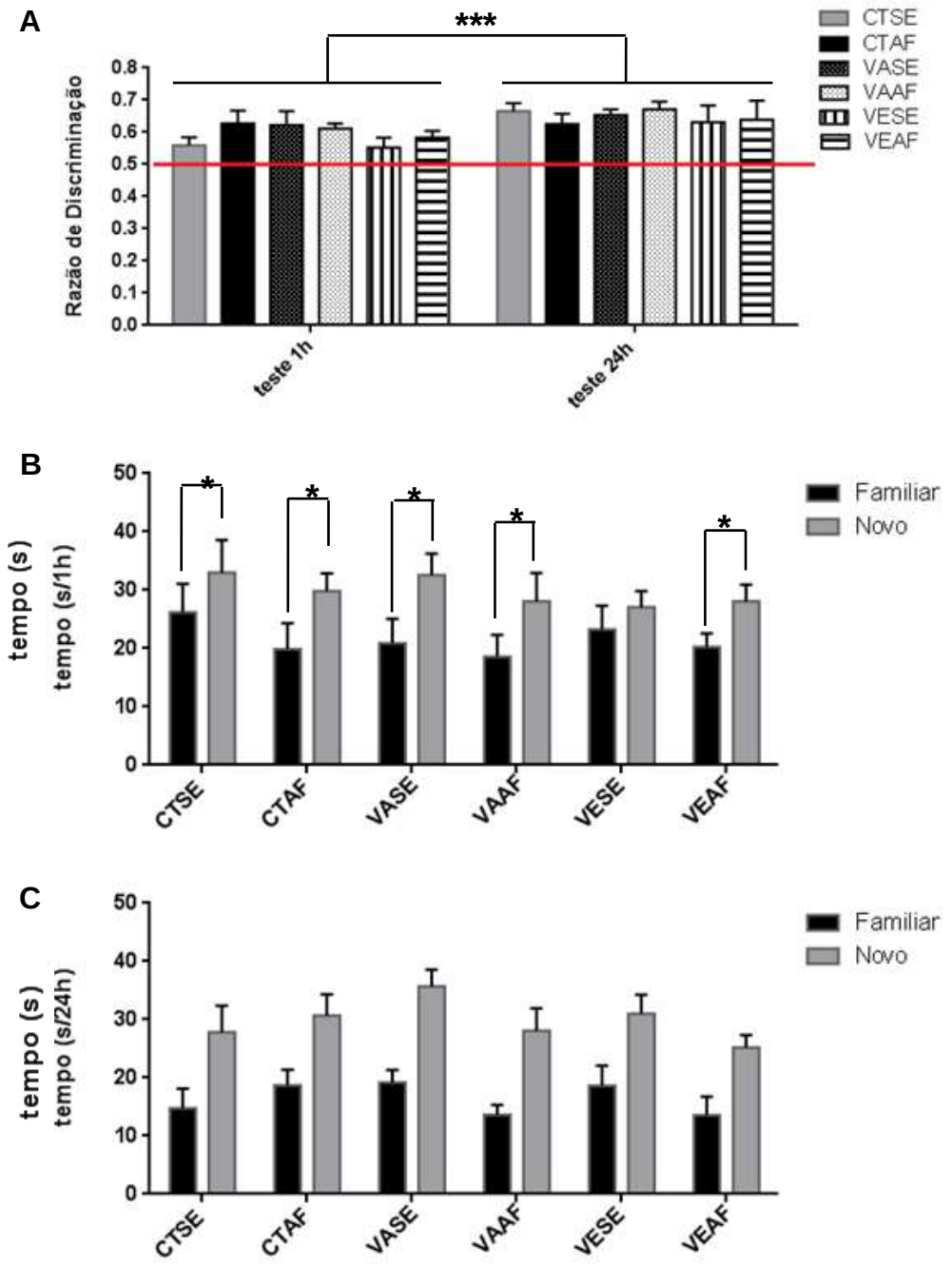
Nos resultados da RD (Fig.12A) os diferentes grupos discriminaram melhor os objetos na memória de longa duração (teste24h) quando comparados com a memória de longa duração (teste1h). No entanto, não foram encontradas diferenças entre os grupos nesse parâmetro. Esses dados indicam que há efeito no tipo de memória a qual os animais são testados ($F_{(1, 42)}$ = 13,13; p = 0,0006), no entanto, sem efeito do tratamento ($F_{(5, 42)}$ = 0,407; p = 0,8426) ou da interação entre os dois fatores ($F_{(5, 42)}$ = 1,033; p = 0,4111) após catorze dias de atividade física. Ou seja, a atividade física prolongada exerceu um efeito de melhora de memória de longa duração, comparada com a de curta duração.

Na memória de curta duração (Fig.12B) observou-se apenas efeito do objeto ($F_{(1, 42)}$ = 40,22; p<0,0001), sem efeito do tratamento ($F_{(5, 42)}$ = 0,3785; p = 0,806) ou da interação ($F_{(5, 42)}$ = 0,7576; p = 0,5854). Após análises posteriores com múltiplas comparações por teste t-Student, foram encontradas diferenças entre o tempo gasto explorando o objeto novo *versus* o familiar em todos os grupos (p < 0.05), exceto no grupo VESE. Esses resultados mostram que a atividade física não alterou significativamente o tempo de exploração entre os objetos entre os grupos sedentários e ativos, exceto no grupo exposto à câmara de vapor ao etanol, quando comparado ao respectivo grupo sedentário. Todos os grupos conseguiram discriminar o objeto novo, exceto aquele exposto às intoxicações ao etanol na câmara de vapor, efeito este, revertido pela atividade física. A ausência de diferença entre os demais grupos e seus respectivos controles sugere que a atividade física não é capaz de exacerbar o desempenho mnemônico de discriminação de objetos, mas pode proteger contra eventuais déficits decorrentes de exposição intoxicante ao etanol. Entretanto, apesar de não haver diferenças na razão de discriminação entre os grupos VEAF e VESE, os animais do grupo VEAF gastaram mais tempo explorando o objeto novo relativo ao familiar, o que não foi encontrado no grupo VESE, sugerindo um efeito protetor da atividade física na memória de curto prazo.

Já em relação à memória de longa duração (Fig.12C) também se observou efeito do objeto ($F_{(1, 42)}$ = 101,9; p<0,0001), sem efeito do tratamento ($F_{(5, 42)}$ = 1,288; p = 0,2873) ou interação entre ambos ($F_{(5, 42)}$ = 0,3255; p = 0,8946). Após analises

de *post hoc* de Bonferroni foram vistas diferenças em todos os grupos ($p<0,05$) na memória de longa duração (Fig.12C).

Figura 12 - Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) após 14 dias de atividade física



Grupos experimentais controle sedentário (CTSE), controle + atividade física (CTAF), vapor ar sedentário (VASE), vapor ar + atividade física (VAAF), vapor etanol sedentário (VESE) e vapor etanol + atividade física (VEAF) (n=8/grupo). Foram analisados os seguintes parâmetros: a razão de discriminação em testes de memória de curto (1h) e longo prazo (24h) (A) e o tempo (s) de exploração dos objetos familiar e novo na memória de curto (1h) (B) e longo prazo (24h) (C). Dados analisados por ANOVA duas vias. Valores expressos em média ± E.P.M com $p<0,05$. *$p<0,05$ e ***$p<0,001$

4.4 Análises Bioquímicas dos níveis proteicos de BDNF e CREB pela técnica de *Western Blotting*

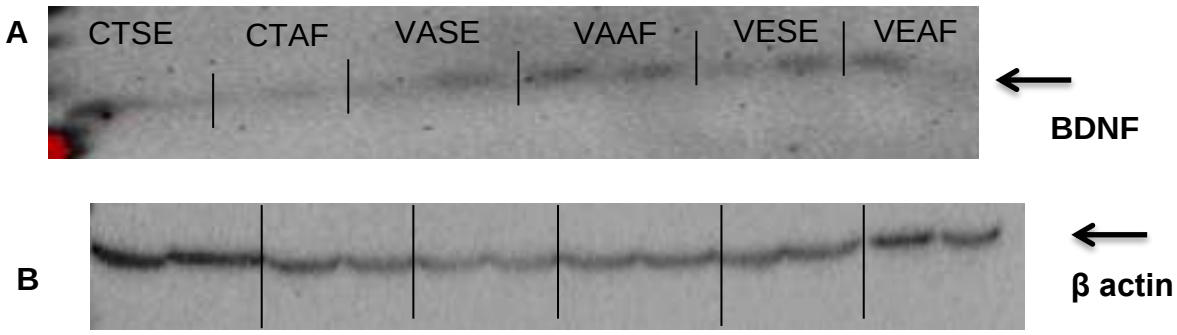
Os níveis proteicos de cada grupo foram comparados com o grupo controle sedentário (CTSE) e expresso na forma de porcentagem. Os dados representam uma medida relativa e foram analisados pelo teste de variância (ANOVA) uma via para o BDNF e para o CREB. Vale salientar que o tecido hipocampal foi obtido ao final do protocolo experimental, sendo assim, os resultados obtidos correspondem a análises feitas após catorze dias de atividade física e 24h após o último teste de reconhecimento de objeto.

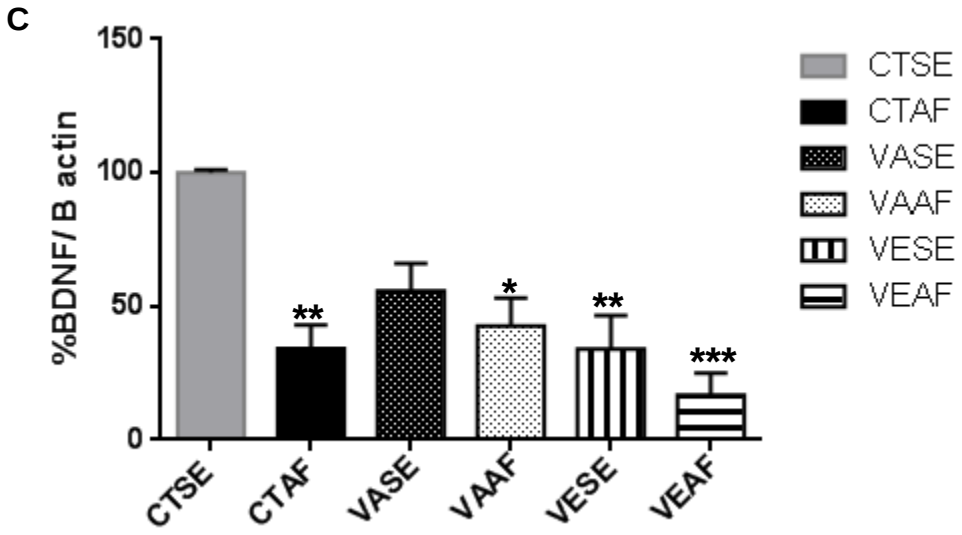
A banda do BDNF foi visualizada em aproximadamente 14KDa e a banda do CREB em aproximadamente 47KDa. As bandas das proteínas controle (β-actina e GAPDH) foram visualizadas em 42KDa e 35KDa, respectivamente.

4.4.1 *Western Blotting* BDNF no hipocampo

As Figuras 15 A e B mostram géis representativos dos níveis proteicos do BDNF e da proteína controle (β actin), respectivamente no tecido hipocampal, já a Figura 15C revela os resultados obtidos, comparando os grupos experimentais com o controle (CTSE). Foi realizado o teste de variância ANOVA uma via para os níveis proteicos do BDNF, o qual revelou efeito do tratamento nesse parâmetro ($F_{(5, 28)}$ = 3,733; p = 0,013). Análises posteriores com *post hoc* Bonferroni indicaram que houve diminuição nos níveis proteicos em mais de 50% entre os grupos CTAF (p = 0,013), VAAF (p = 0,036), VESE (p = 0,013) e VEAF (p = 0,002) em relação ao grupo CTSE.

Figura 13 – *Western Blotting* BDNF hipocampal



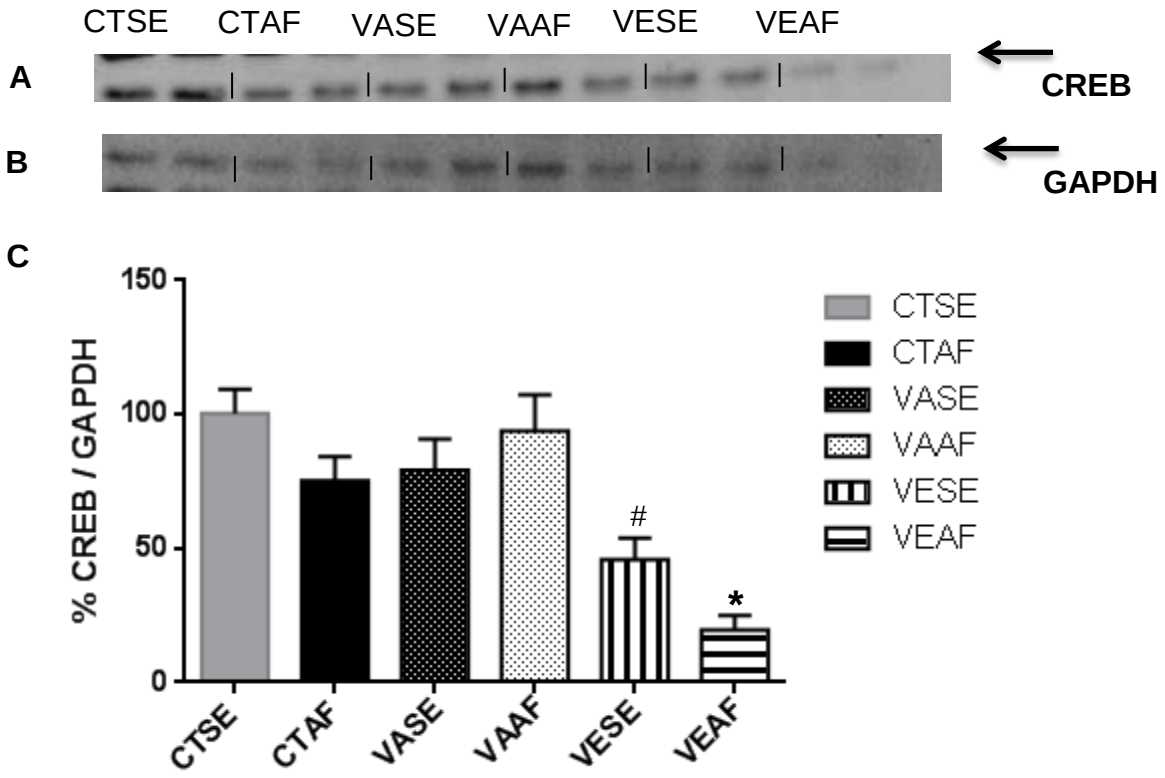


Western Blotting BDNF após catorze dias de atividade física nos diferentes grupos experimentais controle sedentário (CTSE) (n=5), controle + atividade física (CTAF) (n=6), vapor ar sedentário (VASE) (n=6), vapor ar + atividade física (VAAF) (n=6), vapor etanol sedentário (VESE) (n=6) e vapor etanol + atividade física (VEAF) (n=5). A) Gel representativo para os níveis de BDNF. B) Gel representativo para os níveis de β actin. C) Nível proteico de BDNF em tecido hipocampal. Dados analisados por ANOVA uma via seguido de *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos em média ± E.P.M com $p<0,05$. *$p<0,05$ e **$p = 0,01$ e ***$p = 0,002$ quando comparados ao grupo controle sedentário (CTSE).

4.4.2 *Western Blotting* CREB total no hipocampo

As Figuras 16 A e B mostram géis representativos dos níveis proteicos do CREB e da proteína controle (GAPDH), respectivamente no tecido hipocampal, já a Figura 16C revela os resultados obtidos, comparando-se os grupos experimentais com o controle (CTSE). Foi realizado o teste de variância ANOVA uma via para os níveis proteicos do CREB, o qual revelou efeito do tratamento nesse parâmetro ($F_{(5, 24)} = 7,169$; $p = 0,003$). Análises de *post hoc* de Bonferroni indicaram menores níveis de CREB no grupo VESE e VEAF quando comparado ao CTSE ($p=0,045$ e $p=0,01$, respectivamente) e no grupo VEAF quando comparado ao CTAF (0,013), VASE (0,009), VAAF (0,001), ou seja, a exposição ao etanol pelo vapor foi capaz de alterar significativamente a expressão proteica de CREB hipocampal, mas não aquela decorrente do consumo voluntário. Entretanto, foi observada uma maior diminuição na expressão proteica do CREB no hipocampo de animais que receberam a combinação das intoxicações ao vapor de etanol mais exercício físico.

Figura 14 – *Western Blotting* CREB hipocampal



Western Blotting CREB após catorze dias de atividade física nos diferentes grupos experimentais controle sedentário (CTSE) (n=4), controle + atividade física (CTAF) (n=7), vapor ar sedentário (VASE) (n=6), vapor ar + atividade física (VAAF) (n=5), vapor etanol sedentário (VESE) (n=4) e vapor etanol + atividade física (VEAF) (n=4). A) Gel representativo para os níveis de CREB. B) Gel representativo para os níveis da GAPDH. C) Nível proteico de CREB em tecido hipocampal. Dados analisados por ANOVA uma via, seguidos de post hoc de Bonferroni. Valores expressos em média ± E.P.M com $p<0,05$. *$p<0,05$ comparado a todos os grupos, exceto VESE e #$p<0,05$ comparado com CTSE.

De maneira mais simplificada e como forma de relembrar os principais resultados, foi elaborada uma tabela que resume os efeitos mais importantes de acordo com cada tópico avaliado e tratamento aplicado.

Tabela 1 – Resumo dos efeitos mais importantes do trabalho

Tópico avaliado	Efeitos observados
Consumo de etanol em 2h	O grupo vapor de etanol teve escalonamento do consumo, não havendo diferença estatística entre este e o grupo vapor de ar;
Preferência por etanol em 2h	Animais expostos à intoxicação tiveram maior preferência pela droga nas primeiras 2h do consumo voluntário;
Consumo de etanol em 4h	Ambos os grupos (vapor de ar e vapor de etanol) mostraram escalonamento com diferença estatística entre os grupos em sessões específicas; O escalonamento do grupo vapor de etanol aconteceu de forma mais precoce;
Preferência de etanol em 4h	Diferenças entre os dois grupos em sessões específicas; O grupo vapor de etanol expressou diferença nesse quesito entre as sessões, mas não o grupo vapor de ar.
Teste de Reconhecimento de Objetos (3 dias)	Razão de Discriminação – todos os grupos tiveram desempenho similar na memória de curta e longa duração; Tempo de exploração de objetos na memória de curta duração – Análises posteriores mostraram maior exploração do objeto novo em relação ao familiar nos grupos controle e intoxicado com atividade física. Tempo de exploração de objetos na memória de longa duração – Análises

Teste de Reconhecimento de Objetos (8 dias)	posteriores mostraram maior exploração do objeto novo em relação ao familiar em todos os grupos, independente do tratamento. Razão de Discriminação – todos os grupos tiveram um desempenho melhor na memória de curta duração em comparação a de longa; Tempo de exploração de objetos na memória de curta duração – Análises posteriores mostraram maior exploração do objeto novo em relação ao familiar em todos os grupos, independente do tratamento; Tempo de exploração de objetos na memória de longa duração – Análises posteriores mostraram maior exploração do objeto novo em relação ao familiar nos grupos controle sedentário e com atividade física e no grupo vapor ar com atividade física.
Teste de Reconhecimento de Objetos (14 dias)	Razão de Discriminação – todos os grupos tiveram desempenho melhor na memória de longa duração em comparação a de curta; Tempo de exploração de objetos na memória de curta duração – Análises posteriores mostraram maior exploração do objeto novo em relação ao familiar em todos os grupos, exceto no grupo intoxicado com atividade física; Tempo de exploração de objetos na memória de longa duração – Análises posteriores mostraram maior exploração do objeto novo em relação ao familiar em todos os grupos, independente do tratamento.
***Western Blotting* – BDNF**	Todos os grupos com atividade física (CTAF, VAAF e VEAF) reduziram os

	níveis de BDNF; Somente a intoxicação com vapor de etanol (VESE) já foi capaz de reduzir os níveis de BDNF; A atividade física somada ao tratamento de intoxicação com vapor de etanol (VEAF) reduziu de maneira mais acentuada os níveis de BDNF;
***Western Blotting* – CREB**	Apenas os grupos com o tratamento com vapor de etanol (VESE e VEAF) mostrou queda dos níveis de CREB; O grupo vapor de etanol sedentário (VESE) reduziu os níveis em comparação ao grupo controle (CTSE); O grupo vapor de etanol com atividade física (VEAF) reduziu os níveis de CREB em comparação a todos os grupos, exceto o seu sedentário (VESE).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a relação da atividade física como tentativa de amenizar os possíveis efeitos danosos na memória de camundongos C57BL/6 intoxicados com vapor de etanol na adolescência. Para tal, foram investigadas alterações comportamentais e neuroquímicas, como o desempenho dos animais no teste de reconhecimento e avaliação nos níveis de BDNF e CREB. Resumidamente, os resultados sugerem que a atividade física pode servir como meio para evitar potenciais prejuízos de memória induzidos pela exposição ao etanol.

Três dias de atividade física foram capazes de melhorar o desempenho da memória de curto prazo nos controles e nos animais intoxicados na câmara de vapor de etanol. Não foram verificadas alterações significativas na memória de longo prazo após 3 dias de corrida, assim como 3 dias após a última exposição ao etanol, não foram encontrados déficits significativos na memória de longo prazo dos animais

expostos ao etanol. Oito dias após a última exposição ao etanol, ou oito dias de atividade física, também não alteram o desempenho dos animais no teste de discriminação de objetos. Entretanto, na memória de longo prazo, observa-se um desempenho prejudicado dos animais expostos ao etanol, seja por consumo voluntário, seja pelas exposições aos ciclos repetidos de intoxicações ao etanol. A atividade física foi capaz de diminuir esse prejuízo somente nos animais expostos ao consumo voluntário, mas não nos animais expostos às câmaras de vapor de etanol. Após 14 dias da última exposição aos ciclos intoxicantes de etanol seguidos de consumo, a memória de curto prazo mostrou-se prejudicada, efeito este não observado entre aqueles que se beneficiaram da atividade física. A memória de longo prazo, no entanto, não se mostrou alterada, sendo que todos apresentaram um desempenho semelhante. No que diz respeito ao BDNF, os animais expostos a alguma manipulação ambiental, seja por atividade física, seja pela exposição ao vapor de etanol, mostraram menores concentrações de BDNF hipocampal. A intoxicação ao etanol e a associação dela com a atividade física também diminuiu a expressão proteica de CREB hipocampal. A seguir, discutiremos os resultados encontrados.

A fim de verificar se o tratamento seria capaz de alterar o comportamento de consumo e a preferência pela droga entre os grupos, o presente estudo avaliou esses parâmetros entre os animais intoxicados com vapor de etanol, seguidos de um período de abstinência, e os não intoxicados. Os resultados mostraram que no consumo limitado de 2h, independentemente do tratamento aplicado, houve um escalonamento progressivo no consumo de etanol com as exposições repetidas às duas garrafas. Em relação à preferência pela droga, houve uma gradativa diminuição na preferência pelo etanol com as exposições, evidenciando a diferença entre os grupos. No consumo limitado de 4h existe uma variação no consumo entre os grupos, bem como na sua preferência pela droga, a depender da sessão. Os animais expostos ao primeiro ciclo de intoxicação na câmara de vapor de etanol apresentou um escalonamento no consumo, não demonstrado no respectivo grupo controle (vapor de ar). O aumento no consumo no grupo vapor de ar surgiu após o segundo ciclo, o que corrobora estudos anteriores que mostram que exposições repetidas ao etanol seguidas por privações podem induzir um escalonamento no

consumo e representar um modelo de recaída, conforme sugerido por Wise (1973), Sinclair et al. (1973) e Vengeliene et al. (2014).

Estudos mostram que exposições repetidas de etanol e subsequentes retiradas da droga conseguem promover um efeito adicional sobre sua ingestão. Sinclair e colaboradores (1973) descreveram que apenas dois dias de abstinência são capazes de causar tal efeito em ratos. Becker e Lopez (2004) relataram o maior consumo em camundongos submetidos a múltiplas intoxicações de etanol, seguidas de abstinências, reafirmando o que foi dito anteriormente.

Neste trabalho, os animais do grupo vapor ar, os quais não passaram pela intoxicação com a droga, apresentaram aumento do consumo de etanol, tanto no período de acesso por 2h quanto no de 4h, no segundo ciclo do protocolo. Esses animais permaneceram abstinentes nas ocasiões em que o outro grupo era exposto às intoxicações pela câmara de vapor e, portanto, esse aumento demonstra que as propriedades reforçadoras do álcool, decorrentes da experiência voluntária, e a abstinência induzida pela retirada da droga, por si só, conseguem promover esse resultado.

Em relação ao grupo do vapor etanol, os animais também aumentaram a sua ingestão da droga nos diferentes períodos de acesso a ela (2h e 4h), corroborando com trabalhos anteriores cujo modelo de intoxicação é similar ao nosso (BECKER; LOPEZ, 2004; LOPEZ; BECKER, 2005; CARRARA-NASCIMENTO et al., 2013). No entanto, apenas nas quatro horas em que estiveram livres para escolher entre água e etanol, pode-se verificar que, dependendo do dia, esses animais beberam mais que os do outro grupo e aumentaram o próprio consumo quando comparados dias diferentes. Apesar de o grupo vapor etanol não ter diferido no consumo com o grupo vapor ar, apresentou maior preferência à droga ao final das reexposições, tanto em 2 quanto em 4h de consumo voluntário. Além disso, o escalonamento ao etanol ocorreu de forma mais precoce (Fig 6B).

Pesquisas anteriores afirmam que o comportamento de consumo dos animais que passaram pela intoxicação de vapor de etanol aumenta significativamente em relação aos que não sofrem tal processo (BECKER e LOPEZ, 2004; LOPEZ e BECKER, 2005; LeDEPOY et al., 2013; CARRARA-NASCIMENTO et al., 2013). Apesar de os resultados do presente estudo não serem tão evidentes, essa falta de

concordância parece ser justificada por diferenças protocolares, onde trabalhos anteriores lidam com um consumo de acesso ilimitado (24h) ou com animais adultos.

Em Carrara-Nascimento e colaboradores (2013), por exemplo, foi evidenciado esse aumento clássico da ingestão de etanol dos animais intoxicados em relação aos seus respectivos controles e utilizado um protocolo bastante parecido com o nosso, no entanto, diferindo quanto ao paradigma de acesso, cujo modelo é ilimitado (24h). O nosso protocolo baseia-se no acesso limitado de 2 e 4h, seguindo o protocolo de *drinking in the dark*. Dessa forma, podemos supor que os animais apresentaram um consumo mais elevado do que o esperado nesse curto período de acesso, sobretudo por se tratar de camundongos adolescentes, que já exibem um consumo mais elevado do que adultos (MOORE et al., 2010). Seguindo este raciocínio, essas peculiaridades podem ter interferido na resposta observada.

No estudo de Moore e colaboradores (2010), os pesquisadores constataram que animais adolescentes da linhagem C57BL/6 consomem altas doses da droga quando comparados aos mesmos animais na fase adulta em um período limitado de acesso (2h) e que isso não acontece em animais da linhagem DBA/2J, por exemplo, indicando que há uma diferença natural no padrão de ingestão de acordo com a linhagem e a idade. Ainda com relação a essas observações, Fabio e colaboradores (2014) observaram também que ratos adolescentes consomem mais etanol que os adultos em um período de 24h depois de serem expostos previamente à droga e a um período de privação. Em contemplação a esses resultados, um possível efeito “teto” nos animais pode ter acontecido, levantando a necessidade de um tempo maior de consumo para constatar tal diferença. Ainda assim, os animais expostos ao paradigma de exposição crônica intermitente à câmera de vapor de etanol mostraram maior preferência pela droga do que os não expostos, mesmo ao final do protocolo de reexposições ao consumo voluntário (Fig. 5). Faltam ainda pesquisas que busquem elucidar melhor esses aspectos, entretanto, a partir disso, podemos sugerir que o efeito de privação ao etanol (conhecido como *alcohol deprivation effect,* em inglês) foi suficiente para equiparar a quantidade de etanol ingerida (em g/kg) entre os dois grupos ao final das reexposições.

O teste de reconhecimento de objetos (TRO) tem sido amplamente utilizado para investigação de alterações de memória, de forma bastante simples. Pode ser

usado tanto para medida de memória de trabalho, quanto também pode ser usado para avaliar aspectos comportamentais relacionados à atenção, ansiedade e preferência por novidade, conforme os estudos de GOULART et al., (2010) e SILVERS et al. (2007). Os resultados podem ser calculados por meio de índices (razão ou índice de discriminação, índice de preferência) ou pela comparação entre o tempo gasto explorando o objeto novo *versus* o familiar (ENNACEUR e DELACOUR, 1988; GASKIN et al., 2010; ANTUNES e BIALA, 2012). Algumas das vantagens desse teste é que não requer a apresentação de uma recompensa e é executado em um intervalo curto de tempo. Como previsto pelo teste, quando um animal é exposto a dois objetos, um familiar e um novo, espera-se que este gaste mais tempo explorando o objeto novo do que o familiar (ENNACEUR, 2010). Essa preferencia pela novidade é inata. Portanto, aqueles que não gastam mais tempo explorando o objeto novo, não apresentam habilidade de reconhecer um estímulo anteriormente apresentado. A capacidade de reconhecimento de um objeto familiar constitui o cerne do modelo animal de amnésia em humanos (BAXTER, 2010). Deve-se levar em consideração também que a apresentação ao animal de um estímulo novo pode provocar estresse e eliciar uma resposta de aproximação, com aumento de corticosterona plasmática (ANTUNES e BIALA, 2012).

Quanto ao tratamento com a roda de corrida, verificamos que os animais apresentaram, curiosamente, uma dissociação entre a resposta comportamental e a resposta bioquímica. Geralmente, a variação dos níveis de BDNF e CREB hipocampal é relacionada de maneira diretamente proporcional com a melhora ou piora da aprendizagem e da memória (KORTE et al., 1995; PATTERSON et al., 1996), porém, no presente estudo observamos alguns efeitos positivos da atividade física no teste comportamental, apesar dos níveis de BDNF e CREB reduzidos no hipocampo.

Com três dias de corrida, houve efeito positivo na exploração do objeto novo, em relação ao familiar, na memória de curta duração nos grupos controle e intoxicado, enquanto que com oito dias esse mesmo efeito foi visto na memória de longa duração somente no grupo com consumo voluntário do etanol, sem intoxicação, e com catorze dias, na memória de curta duração no grupo intoxicado. Vale salientar que não foi observado nenhum déficit de memória, mas que, após catorze dias de corrida, os níveis de BDNF apresentaram-se diminuídos em todos os

grupos com atividade física e no intoxicado sedentário, da mesma forma que o CREB, no grupo intoxicado sem e com atividade física.

Apesar de não intuitivos, esses resultados podem ser sustentados quando relacionados com a possível necessidade de interação de outros locais do encéfalo com o hipocampo, bem como o efeito da roda de corrida servindo como estressor e interagindo com os diferentes tratamentos, justificando, assim, o desempenho no teste comportamental e a redução dos marcadores neuroquímicos, respectivamente. Esses achados levantam considerações únicas para a literatura e trazem novas discussões acerca dos mecanismos envolvidos na memória frente a diferentes estímulos e análises.

As alterações de BDNF e CREB foram encontradas no hipocampo, no entanto, mesmo este sendo a principal estrutura responsável pelo funcionamento de processos mnemônicos, não atua de maneira única ou exclusiva, assim, a depender do tipo de memória e da avaliação a qual ela é submetida, a interação com locais extras pode influenciar na resposta. No nosso trabalho, utilizamos uma memória de reconhecimento, com princípio de familiaridade, acrescida de um contexto espacial.

Pesquisas com humanos, macacos e ratos atestam que a resposta à memória espacial é dependente da contribuição de estruturas do Lobo Temporal Medial (LTM) (RIEDEL et al.,1999; EICHENBAUM; YONELINAS; RANGANATH, 2007), bem como a não espacial (ROSS; EICHENBAUM, 2006), já Cohen e colaboradores (2013) constataram que a memória de reconhecimento simples, por exemplo, está diretamente ligada com a integridade do hipocampo em camundongos C57BL/6 e que o córtex perirrinal sozinho não suporta essa tarefa, porém, não verificou a importância dessas ou outras estruturas em um contexto espacial. Em outros testes avaliando o hipocampo e os córtices pré frontal e perirrinal no reconhecimento de objetos em diferentes contextos, foi visto que para esta tarefa com o objeto em nova posição (*object-in-place*) é necessária a interação entre as estruturas citadas (Barker e Warburton (2011). De modo consistente a isso, foi relatado também instabilidade de células de local do hipocampo de roedores após lesões no córtex perirrinal (MUIR; BILKEY, 2001).

Não restam dúvidas de que memórias relacionadas com a localização são dependentes do hipocampo, mas estudos sobre memórias que utilizam mais de uma

variável ainda não estão bem estabelecidos. A destacar, o córtex perirrinal parece ser extremamente importante, podendo agir como uma região compensatória a danos hipocampais.

Adicionalmente a essas informações, é possível que a corrida voluntária utilizada neste estudo e que promoveu alterações positivas na memória de reconhecimento de objetos, tenha induzido alterações em outras regiões que não no hipocampo, como no córtex perirrinal, melhorando o reconhecimento de objetos. Estudos apontam que a atividade física tanto pela esteira (GRIFFIN et al., 2009) quanto pela roda (HOPKINS; BUCCI, 2010; HOPKINS; NITECKI; BUCCI, 2011; JACOTTE-SIMANCAS et al., 2015) é capaz de elevar as concentrações de BDNF e aumentar a neurogênese no córtex perirrinal e que esses efeitos estão relacionados com o bom desempenho dos animais em testes de reconhecimento de objetos.

Ainda neste aspecto, Brockett e colaboradores (2015) verificaram que 12 dias de corrida voluntária aumentaram a expressão de marcadores de plasticidade sináptica em algumas regiões, incluindo o córtex perirrinal. Hopkins e Bucci (2010) analisaram o córtex perirrinal de ratos submetidos a quatro semanas de corrida voluntária (dias alternados) e verificaram aumento do BDNF, associando-o com a melhora do reconhecimento de objetos. Em 2015, Jacotte-Simancas e colaboradores verificaram aumento da neurogênese no córtex perirrinal e uma reversão de déficits de memória causados por uma injúria cerebral após 20 dias de corrida. Sendo assim, possivelmente, o bom desempenho encontrado aqui, apesar dos níveis de BDNF e CREB reduzidos, seja decorrente dessas interações hipocampo-córtices, as quais, infelizmente, não foram analisadas.

Outra questão no nosso trabalho está nos resultados observados sobre o tipo de memória, os quais atestaram que o tratamento com a roda de corrida (com 3, 8 e 14 dias) promoveu respostas específicas para as duas memórias avaliadas nos grupos, de acordo com o tempo de atividade física.

Todos os grupos apresentaram problemas com a memória de curto prazo, mas três dias de corrida foram capazes de melhorar os grupos controle e intoxicado (vapor etanol). Aparentemente, quaisquer problemas na memória de curto prazo desapareceram em todos os grupos após 8 dias de corrida (com ou sem ela), mas se mostraram presentes na memória de longo prazo dos grupos vapor ar e vapor

etanol, na qual a corrida reverteu os problemas do primeiro grupo. Com 14 dias de corrida, apenas o grupo intoxicado apresentou problemas quanto ao desempenho da memória de curto prazo, e nenhum grupo quanto à memória de longo prazo, no entanto, a atividade física se mostrou eficaz para sua reversão. Esses resultados sugerem distintos efeitos da atividade física sobre as memórias de curto e longo prazo, a depender do tempo de corrida.

Embora não fosse esperado, a redução dos níveis de BDNF nos grupos com atividade física pode ter sido notória pelas condições em que os animais se encontravam. Durante todo o protocolo, os camundongos permaneceram sem contato social. Sabe-se que a corrida também é considerada um estímulo capaz de ativar o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (DROSTE et al., 2003, 2007; GIRARD; GARLAND, 2002; FEDIUC; CAMPBELL; RIDDELL, 2006) e um estudo realizado em ratos com condições de alojamento individual, em comparação aos de alojamento coletivo, por exemplo, mostrou concentrações de corticosterona elevadas e também um bloqueio da neurogênese adulta no hipocampo, após 12 dias de corrida, atrasando os efeitos positivos dela (STRANAHAM; KHALIL; GOULD, 2006). Apesar de modelos com corrida voluntária indicarem aumento de BDNF e outros efeitos positivos, pode-se verificar também efeito negativo.

Em relação ao grupo controle, somado ao isolamento, esses animais não passaram por manipulações. Pesquisas demonstram que o próprio contato com o pesquisador e sessões de stress leve a moderado podem preparar o animal para situações adversas e proporcionar resiliência (SUO et al., 2013; SANTARELLI et al., 2017; NEELY et al., 2018), no entanto, o grupo em questão não experimentou essas intervenções. Uma vez demonstrado que diferentes tipos de estresse podem levar à queda de BDNF no hipocampo (MURAKAMI et al., 2005; BATH; SCHILIT; LEE, 2013; FILHO et al., 2015), talvez os animais CTAF, quando apresentados à roda, não estando preparados para a novidade, encararam o objeto como stress severo, podendo ter causado a queda da neurotrofina.

O gene Bdnf contém 8 exons não-codificantes e 1 exon codificante para a proteína madura do BDNF .Os exons não codificantes combinam com o exon codificante IX, através de splicing alternativos (AID et al., 2007). Zajac e cols. (2010) encontraram aumento na expressão dos exons I, II, III e V, mas não no IV, no

hipocampo de camundongos que foram expostos a rodas de atividade por 8 semanas. Em roedores, uma única exposição à esteira (exercício “agudo”) aumentou a expressão do RNAm do Bdnf total e do transcrito IV do Bdnf em animais sedentários, Entretanto, em animais previamente expostos a rodas de exercício voluntário por 1 mês, somente a expressão do RNAm do Bdnf total aumentou, mas não do transcrito IV. Sendo assim, a exposição crônica a rodas de exercício atenuou a capacidade do exercício agudo em aumento o RNAm do Bdnf IV. Em outro estudo, verificou-se que o exercício aumentou a expressão deste transcrito, por meio de regulação epigenética (INTLEKOFER et al., 2013). Existe, assim, uma dinâmica da atividade do transcrito IV do Bdnf induzido por exercício que depende de experiências prévias com atividade física (VENEZIA et al., 2017). A transcrição do promotor do exon IV é particularmente sensível à atividade neuronal (MARTINOWICH et al., 2003) e rapidamente transcrito em resposta ao estresse (MARMIGÈRE et al., 2003).

Em geral, os estudos mostram aumento de RNAm do Bdnf hipocampal após 1 mês de atividade voluntária nas rodas de atividade (VOSS et al., 2013). Este talvez tenha sido também um limitante do presente estudo. Entretanto, o prolongamento do período entre a última exposição ao etanol e o teste de memória (ou seja, a abstinência), poderia, por si só, ser capaz de reverter possíveis efeitos comportamentais induzidos pela exposição crônica intermitente ao etanol.

No que se refere aos animais que tiveram contato com o etanol, nosso trabalho atestou, pela primeira vez, que a intoxicação pelo vapor (VESE) na adolescência, por si só, foi capaz de reduzir significativamente o BDNF hipocampal adulto após 14 dias de abstinência. Apenas o consumo voluntário dessa droga (VASE), todavia, não reduziu os níveis de BDNF.

A associação da exposição crônica intermitente ao vapor de etanol com a atividade física evidenciou a redução na expressão proteica de BDNF. Tais resultados contrariam aqueles que mencionam a atividade física como indutora (GALLEGO et al, 2015) e o consumo de álcool como redutor de BDNF (BRIONES; WOODS, 2013). Por sua vez, grandes quantidades, como no paradigma do vapor, tendem a ser mais prejudiciais nas mesmas condições.

Possíveis explicações para essas diferenças podem estar relacionadas com o animal e a idade do cérebro analisado, o momento de apresentação da roda aos roedores e o momento da medição durante o período de abstinência. Apesar de utilizarmos do mesmo paradigma de consumo ao álcool, no nosso estudo fizemos análises em hipocampos de camundongos adultos com 14 dias após a última sessão de consumo, enquanto Briones e Woods (2013) examinaram o hipocampo de ratos adolescentes com 7 dias do último consumo. Em relação à roda, utilizamos o objeto no final do protocolo, enquanto Gallego e colaboradores (2015) apresentaram-na desde o início.

Ciente de que o álcool possui capacidade de alterar o BDNF (LOGRIP, 2009; JOE, 2007), que sua abstinência mexe com o eixo HPA (BECKER, 2000; STEPHENS; WAND, 2012) e que concentrações elevadas de corticosterona podem interferir na expressão do BDNF (SCHAAF; de KLOET; VREUGDENHIL, 2000; LAKSHMINARASIMHAN; CHATTARJI, 2012), faz sentido sugerir que todos esses fatores obtenham uma carga ainda maior sobre a proteína quando somados à corrida, podendo justificar nossos achados.

Com relação ao CREB, sabe-se que o BDNF é produto desse fator de transcrição (FINKBEINER et al., 1997) e, dessa forma, variações entre eles tendem a se correlacionar. Uma de nossas hipóteses era de que a possível alteração do BDNF estaria associada na mesma proporção com a do CREB. Esse achado só se confirmou no grupo VEAF.

Para o CREB, a corrida voluntária não teve o mesmo efeito daquele observado no BDNF. Enquanto a expressão proteica do BDNF mostrou-se reduzida em todos os grupos com atividade física e no intoxicado sedentário, a diminuição da expressão do CREB aconteceu apenas nos grupos com intoxicação de etanol, seja ele sem ou com atividade física. Mais uma vez, os resultados sugerem um efeito aditivo da atividade física sobre a diminuição da expressão do CREB após exposição crônica intermitente ao vapor ao etanol.

Essa falta de correlação entre o fator de transcrição e seu produto pode estar ligada ao fato do BDNF também ser modulado por outros fatores, como o NF-κB (MARINI et al., 2004; ZHENG et al., 2012; CAVIEDES et al., 2017) e, portanto, não dependeria exclusivamente do CREB. Dessa maneira, o consumo voluntário ao

etanol não foi capaz de alterar a expressão do fator do CREB e do BDNF (como nos grupos controle e vapor ar. Além disso, vale salientar ainda que a fração ativa do CREB equivale a sua versão fosforilada (pCREB), e, portanto, precisaríamos medir os níveis de pCREB e BDNF para atestar melhor a correlação entre a atividade de CREB e a expressão do BDNF.

Apesar de termos encontrado que ambos BDNF e CREB mostraram alterações em sua expressão proteica na mesma direção após exposição crônica intermitente ao vapor ao etanol e atividade física voluntária, faz-se necessário avaliar a atividade do CREB para sugerir uma relação entre eles.

Existem evidências de aprimoramento cognitivo após exercício voluntário mediado e dependente da ação de BDNF e CREB hipocampal. O bloqueio da ação do BDNF, por meio de infusão de uma quimera imunoadesina que mimetiza o receptor de BDNF, impediu o aumento induzido pelo exercício na expressão de RNAm do CREB (VAYNMAN et al., 2004). Sessões curtas de exercício de intensidade leve mostraram-se eficazes na melhora cognitiva, e foram associadas à ativação da proteina cinase serina/treonina (AKT), do CREB e do BDNF em hipocampo de ratos idosos (AGUIAR et al., 2011). As discrepâncias encontradas na literatura e no presente estudo podem estar relacionadas a vários fatores, mas principalmente ao tipo e tempo de exercício. Entretanto, vale ressaltar que, apesar dos resultados conflitantes, a atividade física voluntária promoveu algum benefício em relação à memória dos animais expostos cronicamente ao vapor de etanol, apesar de revelar uma relação negativa com a expressão proteica de BDNF e CREB.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do nosso estudo revelaram que a atividade física foi capaz de reverter problemas de memória de curto e longo prazo em diferentes tratamentos, a depender da quantidade de dias de corrida, e que, portanto, pode influenciar positivamente o desempenho no teste de memória, todavia, essa resposta comportamental observada não foi condizente com a bioquímica.

Em relação ao BDNF, a intoxicação pelo álcool sozinha foi prejudicial a essa neurotrofina, assim como a atividade física em todos os grupos. Quanto ao CREB, a redução desse fator foi notória no tratamento com vapor de etanol e na associação dele à corrida. Possíveis explicações podem estar associadas com interações do hipocampo com outras estruturas e com um efeito estressor da corrida, tipo e tempo de exposição à atividade física.

Diante disso, as novas perspectivas são de que a corrida voluntária passa a ser um alvo interessante para novos estudos, levantando questionamentos e informações para a literatura acerca da funcionalidade de sua prática.

REFERENCIAS

AID, T.; KAZANTSEVA, A.; PIIRSOO, M.; PALM, K.; TIMMUSK, T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. **Journal Neuroscience**. 2007

AGUIAR, A. S.; CASTRO, A. A.; MOREIRA, E. L.; GLASER, V.; SANTOS, A. R. S.; TASCA, C. I.; LATINI, A.; PREDIGER, R. D. S. Short bouts of mild intensity ohysical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. **Mech ageing Dev**. 2011

ALLGAIER, C. Ethanol sensitivity of NMDA receptors. **Neurochemistry International**. v.41, 2002

ALONSO, M.; VIANNA, M. R. M.; DEPINO, A. M.; SOUZA, T. M.; PEREIRA, P.; SZAPIRO, G.; VIOLA, H.; PITOSSI, F.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. BDNF-Triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. **Hippocampus**. v. 12, 2002

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure and its modifications. **Cogn Process**. 2012

ARNETT, J. Reckless behavior in adolescence: A developmental perspective. **Developmental Review**, v.12, n.4, 1992

ASHER, O.; CUNNINGHAM, T. D.; YAO, L.; GORDON, A. S.; DIAMOND, I. Ethanol Stimulates cAMPC-Responsive Element (CRE)-Mediated Transcription via CRE-Binding Protein and cAMP-Dependet Protein Kinase. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.301. n.1. 2002

BARDE, Y. A; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **EMBO Journal** . v. 1, n.5 , 1982

BARKER, G. R. I.; WARBURTON, E. C. When is the hippocampus involved in recognition memory? **Journal of neuroscience**. 2011.

BATES, M. E.; BOWDEN, S. C.; BARRY, D. Neurocognitive impairment associated with alcohol use disorders: implications for treatment. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**. v.10, n.3, 2002

BATH, K. G.; SCHILIT, A.; LEE, F. S. Stress effects on BDNF expression: effects of age, sex and form of stress. **Neuroscience**. 2013

BAXTER, M. G. “I’ve seen it all before”: explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burk et al. (2010). **Behav. Neurosci**. 2010

BECKER, H. C. Animal models of alcohol withdrawal. **Alcohol Research and Health**. 2000

BECKER, H. C.; LOPEZ, M. F. Increased ethanol drinking after repeated chronic ethanol exposure and withdrawal experience in C57BL/6 mice. **Alcohol Clinical and Experimental Research**. v.28, 2004

BEITER, R.M. PETERSON, A.B.; ABEL, J.; LYNCH, W.J. Exercise during early, but not late abstinence, attenuates subsequent relapse vulnerability in a rat model. **Translational Psychiatry**. 2016

BELKE, T. W. Running and responding reinforced by the opportunity to run: Effect of reinforce duration. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**. 1997

BELKE, T. W.; WAGNER, J. P. Th reinforcing property and the rewarding aftereffect of wheel running in rats: a combination of two paradigms. **Behavioural Processes**. 2005

BENGOECHEA, O.; GONZALO, L. M. Effect of chronic alcoholism on the human hippocampus. **Histol. Histopathol**. 1990a

BENGOECHEA, O.; GONZALO, L. M. Effects of alcoholization on the rat hippocampus.. **Neuroscience Letters**. 1990b

BISON, S.; CREWS, F. Alcohol withdrawal increases neuropepitede Y immunoreactivity in rat brain. **Alcoholism: Clin. Exp. Res**. v.27. n.7. 2003

BOCK, B. C.; MARCUS, B. H.; KING, T. K.; BORRELLI, B.; ROBERTS, M. R. Exercise effects on withdrawal and mood among women attempting smoking cessation. **Addictive Behaviors**. v.24. n.3 1999

BRIONES, T. L.; WOODS, J. Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis. **Neuroscience**. 2013

BROCKETT, A. T.; LaMARCA, E. A.; GOULD, E. Physical exercise enhances cognitive flexibility as well as astrocytic and synaptic markers in the medial prefrontal cortex. **PLoS One.** 2015

BRUNELLI, M.; CASTELLUCCI, V.; KANDEL, E. R., Snaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: Possible role of serotonina and ciclic AMP. **Science**. 1976

CAJAL, S. R. Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres SWANSON, N.; SWANSON, L. W. (trans.) Oxford University Press, 1911.

CARLEZON, W. A.; THOME, J.; OLSON, V. G.; LANE-LADD, S. B.; BRODKIN, E. D.; HIROI, N.; DUMAN, R. S.; NEVE, R. L.; NESTLER, E. R. Regulation of cocaine reward by CREB. **Science**. v.282. 1998.

CARLEZON, W. A.; DUMAN, R. S.; NESTLER, E. R. The many faces of CREB. **Trends in neuroscience**. v. 28, n.8, 2005

CARNICELLA, S.; RON, D.; BARAK, S. Intermittent ethanol acess schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. **Alcoho**l. v, 48. 2014

CARRARA,-NASCIMENTO, P. F.; LOPEZ, M. F.; BECKER, H. C.; OLIVE F.; CAMARINI, R. Similar Ethanol Drinking in Adolescent and Adult C57BL/6 Mice After Chronic Ethanol Exposure and Withdrawal. **Alcohoslism: Clin. And Exp. Research**. v.37. n.6. 2013

CAVIEDES, A.; LAFOURCADE, C.; SOTO, C.; WYNEKEN, U. BDNF/NF-κB Signaling in the neurobiology of depression. **Curr Pharm Des**. 2017

CIPITELLI, A.; ZOOK, M.; BELL, L.; DAMADZIC, R.; ESKAY, R. L.; SCHWANDT, M.; HEILIG, M. Reversibilit of object recognition but not spatial memory impairment following binge-lie alcohol exposure in rats. **Neurobiol. Learn. Mem.** 2010

CITRI, A.; MALENKA, R. C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions and mechanisms. **Neuropsycopharmacology**, 2008

COHEN, S.J.; MUNCHOW, A. H.; RIOS, L. M.; ZHANG, G.; ASGEIRSDOTTIR, H. N.; STACKMAN, RW Jr. The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. **Curr Biol**. 2013

CONSTANTINESCU, A.; DIAMOND, I.; GORDON, A. S. Ethanol-induced Translocation of cAMP-dependent Protein Kinase to the Nucleus. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274. n.38. 1999

CREGO, A; HOLGUIN, S. R.; PARADA, M.; MOTA, N.; CORRAL, M.; CADAVEIRA, F. Binge drinking affects attentional and visual working memory processing in Young university students. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v.33, n.11, 2009

DANIEL, J. Z.; CROPLEY, M.; FIFE-SCHAW, C. The effect of exercise in reducing desire to smoke and cigarette withdrawal symptoms is not caused by distraction. **Research Report**. 2006

DAWSON, D. A.; GOLDSTEIN, R. B.; CHOU, S. P.; JUNE RUAN, W.; GRANT, B. F. Age at first drink and the first incidence of adult-onset DSM-IV alcohol use disorders. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v.32, n.12, 2008

de FERRON, B. S.; BENNOUAR, K.; KERVERN, M.; ALAUX-CANTIN, S.; ROBERT, A. RABIANT, K.; ANTOL, J.; NASSILA, M.; PIERREFICHE, O. Two binges of ethanol a day keep the memory away in adolescent rats: key role for GLUN2B subunit. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, 2015

de NO, R. F. Studies on the sctructure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. **J. Psychol. Neurol**. 1934

DROSTE, S. K.; GESING A.; ULBRICHT, S.; MULLER, M. B.; LINTHORST, A. C. E.; REUL, J. M. H. M. Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocrinology**. 2003

DROSTE, S. K.; CHANDRAMOHAN, Y.; HILL, L. E.; LINTHORST, A. C.; REUL, J. M. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level. **Neuroendrocrinology**. 2007

DUBREUCQ, S.; MARSICANO, G.; CHAOULOFF, F. Emotional Consequences of wheel running in mice: Wich is the appropriate control? **Hippocampus**. 2011

EHRINGER, M. A.; HOFT, N. R.; ZUNHAMMER, M. Reduced alcohol consumption in mice with acess to a runnin wheel. **Alcohol**. v.43. 2009

EICHENBAUM, H.; ONELINAS, A. R.; RANGANATH, C. The medial temporal lobe and recognition memory. **Annu Rev Neurosci**. 2007

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**. v.31. 1988

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behav. Brain. Res.** 2010

ERICKSON, K. I.; VOSS, M. W.; PRAKASH, R. S.; BASAK, C.; SZABO, A.; CHADDOCK, L.; KIM, J. S.; HEO, S.; ALVES, H.; WHITE, S. M.; WOJCICKI, T. R.; MAILE, E. VIEIRA, V. J.; MARTIN, S. A.; PENCE, B. D.; WOODS, J. A.; McAULEY, E.; KRAMER, A. F. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **PNAS**, v.108. n.7. 2011

FABIO, M. C.; NIZHNIKOV, M. E.; SPEAR, N. E.; PAUTASSI, R. M. Binge etanol intoxication heightens subsequente etanol intake in adolescente, but not adult, rats. **Dev. Psychobiol**., 2014

FAHEY, B.; BARLOW, S.; DAY, J. S.; O'MARA, S. M. Interferon-α-induced déficits in novel object recognition are rescued by chronic exercise. **Physiology and Behavior**. 2008

FALKENBERG, T.; MOHAMMED, A.. K.; HENRIKSSON, B.; PERSSON, H; WINBALD, B; LINDEFORS, N. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. **Neuroscience Letters**. v.138, 1992

FEDIUC, S.; CAMPBELL, J. E.; RIDDELL, M. C. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. **J Appl Physiol**. 2006

FILHO, C. B.; JESSE, C. R. DONATO, F.; GIACOMELI, R.; Del FABBRO, L.; da SILVA ANTUNES, M.; de GOMES, M. G.; GOES, A. T.; BOEIRA, S. P.; PRIGOL, M.; SOUZA, L. C. Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and Na (+), K(+)-ATPase activit in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: antidepressant effect of chrysin. **Neuroscience**. 2015

FINKBEINER, S.; TAVAZOIE, S. F.; MALORATSKY, A.; JACOBS, K. M.; HARRIS, K. M.; GREENBERG, M. E. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. **Neuron**. 1997

GALLEGO, X.; COX, R. J.; FUNK, E.; FOSTER, R. A.; EHRINGER, M. A. Voluntary Exercise Decreases Ethanol Preference and Consumption in C57BL/6 Adolescent Mice: Sex Differences and Hippocampal BDNF Expression. **Physiolgy and Behavior**. 2015

GASKIN, S.; TARDIF, M.; COLE, E.; PITERKIN, P.; KAYELLO, L.; MUMBY, D. G. Object familiarization and novel object preference in rats. **Behav Processes**. 2010

GIL, K.; FRANCE, C.; AMIT, Z. Voluntary etanol consumption in rats: na examination of blood/ brain etanol levels and behavior**. Alcohol Clinical and Experimental Research**., 1986

GIRARD, I.; GARLAND, T. Jr. Plasma Corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. **J. Appl Physiol**. 2002

GOODWIN, D.W. Alcohol amnesia. **Addiction** 90:315–317, 1995

GOULART, B. K.; de LIMA, M. N.; de Farias, C. B.; REOLON, G. K.; ALMEIDA, V. R.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; SCHRODER, N.; ROESLER, R. Ketamine impairs recognition memor consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. **Neuroscience**. 2010

GRAF, P.; SCHACTER, D. L. Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. **Journal of Experimental Psychology: learning, memory and cognition**. v.11, n.3, 1985

GRIFFIN, E. W.; BECHARA, R. G.; BIRCH, A. M.; KELL, A. M. Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism. **Hippocampus.** 2009

GUITART, X.; THOMPSON, M. A.; MIRANTE, C K.; GREENBERG, M. E.; NESTLER, E. J. Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. **Journal of Neurochemistry** , 1992.

HAMMER, S. B.; RUBY, C. L.; BRAGER, A. J.; PROSSER, R. A.; GLASS, J. D. Environmental Modulation of Alcohol Intake in Hamsters: Effetcs of Wheel Running and Constant Light Exposure. **Alcoholism: Clin. Exp. Research**. v.34. n.9. 2010.

HANSON, K. L.; MEDINA, K. L.; PADULA, C. B.; TAPERT, S. F.; BROWN, S. A. Impact of adolescent alcohol and drug use on neuropsychological functioning in young adulthood: 10 year outcomes. **Journal of Child and adolescent substance abuse**, 2011

HEBB, D. O. The organization of behavior, 1949

HEBERLEIN, A.; DURSTELER-MacFARLAND, K. M.; LENZ, B.; FRIELING, H.; GROSCH, M.; BONSCH, D. KORNHUBER, J.; WIESBECK, G. A.; BLEICH, S.; HILLEMACHER, T. Serum levels of BDNF are associated with craving in opiate-dependent patients. **Journal of Pscychopharmacology**. 2011

HOFFMAN, P. L.; RABE, C. S.; MOSES, F.; TABAKOFF, B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. **Journal of Neurochemistry**, 1989

HORGER, B. A.; IYASERE, C. A.; BERHOW, M. T.; MESSER, C. J.; NESTLER, E. R.; TAYLOR, J. R. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. **The journal of Neuroscience**. 1999.

HOPKINS, M. E.; BUCCI, D. J. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**. 2010

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. **Nature Reviews**. v. 2, 2001

INTLEKOFER, K. A.; BERCHTOLD, N. C.; MALVAEZ, M.; CARLOS, A. J.; McQUOWN, S. C.; CUNNINGHAM, M. J.; WOOD, M. A.; COTMAN, C. W. Exercise and sodium butyrate transform a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. **Neuropsychopharmacology.** 2013

IVERSEN, I. H. Techniques for establishing schedules with wheel running as reinforcement in rats. **Journal of the experimental analysis of behavior**. 1993

JACOTTE-SIMANCAS, A.; COSTA-MISERACHS, D.; COLL-ANDREU, M.; TORRAS-GARCIA, M.; BORLONGAN C. V.; PORTELL-CORTES, I. Effects of voluntary physical exercise, citicoline and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis and neuroprotection after traumatic brain injury in rats. **J Neurotrauma**. 2015

JEANBLANC, J.; HE, D.; CARNICELLA, S.; KHARAZIA, V.; JANAK, P. H.; RON, D. Endogenous BDNF in the dorsolateral striatum gates alcohol drinking. **The Journal of Neuroscience**. 2009

JEANBLANC, J.; SAUTON, P.; JEANBLANC, V.; LEGASTELOIS, R.; ECHEVERRY-ALZATE, V.; LEBOURGEOIS, S.; del GONZALES-MARIN, M.; NASSILA, M. **Addiction Biology**. 2018

JELLINEK, E. M. Phases of Alcohol Addiction. **Journal of Studies on Alcohol**. v.13, 1952

JOE, K.; KIM, Y.; KIM, T.; ROH, S.; CHOI, S.; KIM, Y.; LEE, H.; KIM, D. Decreased plasma Brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. **Alcoholism: Clin. Exp. Res**. v.31. n.11. 2007

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**. v.294, n.5544, 2001

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2 and CPEB. **Molecular Brain**, 2012

KANDEL, E. R.; SCHWART, J. H.; JESSEL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. Princípios de Neurociências. AMGH Editora, 5ª edição, 2014

KEYWORTH, H.; GEORGIOU, P.; ZANOS, P.; RUEDA, A. V.; CHEN, Y.; KITCHEN, I.; CAMARINI, R.; CROPLEY, M.; BAILEY, A. Wheel running during chronic nicotine exposure is protective against mecamylamine-precipitated withdrawal and up-regulates hippocampal α7 nACh receptors in mice. **British Journal of Pharmacology**. 2018

KORTE, M.; CARROL, P.; WOLF, E.; BREM, G.; THOENEN, H.; BONHOEFFER, T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 92, 1995.

KOTEJA, P.; GARLAND, T.; SAX, J. K.;; SWALLOW, J. G.; CARTER, P. A. Behaviour of house mice artificially selected for high levels of voluntary wheel running. **Animal Behaviour**. 1999

LACAILLE, H.; DUTERTE-BOUCHER, D.; LIOT, D.; VAUDRY, H.; NASSILA, M.; VAUDRY, D. Comparison of the deleterious effects of binge drinking-like alcohol exposure in adolescent and adult mice. **Journal of Neurochemistry**. 2015

LAKSHMINARASIMHAN, H.; CHATTARJI, S. Stress leads to contrasting effects on the levels of brain derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala. **PLoS One**. 2012

LARSON, E. B.; GRAHAM, D. L.; ARZAGA, R. R.; BUZIN, N.; WEBB, J.; GREEN, T. A.; BASS, C. E.; NEVE, R. L.; TERWILLIGER, E. F.; NESTLER, E. J.; SELF, D. W. Overexpression of CREB in the nucleus accumbens shell increases cocaine reinforcement in self-administering rats. **Journal Neuroscience.** 2011

leDEPOY, L.; DAUT, R.; BRIGMAN, J. L.; MacPHERSON, K.; CROWLEY, N.; GUNDUZ-CINAR, O.; PICKENS, C. L.; CINAR, R.; SASKIDA, L. M.; KUNOS, G.; LOVINGER, D. M.; BUSSEY, T. J.; CAMP, M. C.; HOLMES, A. Chronic alcohol produces neuroadaptations to prime dorsal striatal learning. **PNAS**, 2013

LEVY, W. B.; STEWARD, O. Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. **Brain Research**. v.175: 233-245, 1979

LOGRIP, M. L.; JANAK, P. H.; RON, D. Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression. **Journal of Neurochemistry**. 2009

LOGRIP, M. L.; BARAK, S.; WARNAULT, V.; RON, D. Corticostriatal BDNF and alcohol addiction. **Brain Research**. 2015

LOPEZ, M. F.; BECKER, H. C. Effect of pattern and number of chronic ethanol exposures on subsequent voluntary ethanol intake in C57BL/6 mice. **Psycopharmacology**. 2005

LYNCH, W. J.; PETERSON, A. B.; SANCHEZ, V.; ABEL, J.; SMITH, M. A. Exercise as a novel treatment for drug addiction: A neurobiological and stage-dependent hypothesis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 2013

LYONS, A M.; LOWERY, E. G.; SPARTA, D. R.; THIELE, T. E. Effects of food availability and administration of orexigenic and anorectic agents on elevated ethanol drinking associated with drinking in the dark procedures. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, 2008

MacLENNAN, A. J.; LEE, N.; WALKER, D. W. Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurothophic factor gene expression in the rat hippocampus. **Neuroscience Letters**. 1995

MAFORD, M.; SIEGBELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. Synapses and memory storage. **Cold Spring Harb Perspective Biology**. 2012

MARINI, A. M.; JIANG, X.; WU, X.; TIAN, F.; ZHU, D.; OKAGAKI, P.; LIPSKY, R. H. Role of brainderived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticit and survival: From genes to phenotype. **Restor Neurol Neurosci.** 2004

MARKWIESE, B. J.; ACHESON, S. K.; LEVIN, E. D.; WILSON, W. A.; SWARTZWELDER, S. Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats**. Alcoholism Clin. Experim. Res**. v, 22. n.2, 1998

MARMIGERE, F.; GIVALOIS, L.; RAGE, F.; ARANCIBIA, S.; TAPIA-ARANCIBIA, L. Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. **Hippocampus**. 2003

MARTINOWICH, K.; HATTORI, D.; WU, H.; FOUSE, S.; HE, F.; HU, Y.; FAN, G.; SUN, Y. E.; DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. **Science**. 2003

MA, Y. L.; WANG, H. L.; WU, H. C.; WEI, C. L.; LEE, E. H. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. **Neuroscience**. v.82, 1998

McCLUNG, C. A.; NESTLER, E. R. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and ΔFosB. **Nature Neuroscience**. v.6, n.11, 2003

McNAUGHTON, B. L; DOUGLAS, R. M.; GODDARD, G.V. Synaptic enhancement in fascia dentate: cooperativity among coactive afferents. **Brain Research**. v. 157: 277-293, 1978

McGOUCH, N. N. H.; HE, D.; LOGRIP, M. L.; JEANBLANC, J.; PHAMLUONG, K.; LUONG, K.; KHARAZIA, V.; JANAK, P. H.; RON, D. RACK1 and BDNF: A factor

homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. **The Journal of Neuroscience**. 2004

MILADI-GORJI, H.; RASHID-POUR, A.; FATHOLLAHI, Anxiety profile in morphine-dependent and withdrawn rats: effect of voluntary exercise. **Physiology and behavior**. 2012

MOORE, E. M.; MARIANI, J. N.; LINSENBARDT, D. N.; MELON, L. C.; BOEHM, S. L. Adolescent C57BL/6J (but not DDBA/2J) mice consume greater amounts of limited-acess ethanol compared to adults and display continued elevated ethanol intake into adulthood. **Alcohol Clin Exp Res**., 2010

MORA, F.; SEGOVIA, G.; Del ARCO, A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several áreas of the brain. **Brain research reviews**. v.55, n.1, 2007

MOSER, E. I. The multi-laned hippocampus. **Nature Neuroscience**. 2011

MUIR, G. M.; BILKEY, D. K. Instability in the place fiel location of hippocampal place cells after lesions centered on the perirhinal cortex. **Journal of Neuroscience**, 2001

MURAKAMI, S.; IMBE, H.; MORIKAWA, Y.; KUBO, C.; SENBA, E. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. **Neuroscience Research**. v.53, 2005

NAGEL, B. J.; SCHWEINSBURG, A. D.; PHAN, V.; TAPERT, S. F. Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity. **Psychiatry Research**. v.139, n.3, 2005

NEELY, C.; LANE, C.; TORRES, J.; FLINN, J. The effect of gentle handling on depressive-like behavior in adult male mice: considerations for human and rodent interactions in the laboratory. **Behav Neurol**. 2018

NEEPER, S. A.; PINILLA-GOMEZ, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. Exercise and brain neutrophins. **Nature**. 1995

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature Neuroscience**. 2005

O'DELL, L. E.; ROBERTS, A. J.; SMITH, R. T.; KOOB, G. F. Enhanced alcohol self-administration after intermittent versus continuous alcohol vapor exposure. **Alcohol Clinical and Experimental Research**. v. 28, 2004

OLIFF, H. S.; BERCHTOLD, N. C.; ISACKSON, P.; COTMAN, C. W. Exercise-induced regulation of brain-derived neurothophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. **Molecular Brain Research**. 1998

PAHO (2015) Regional Status Report on Alcohol and Health in the Americas

PAN, X.; JIANG, T.; ZHANG, L.; ZHENG, H.; LUO, J.; HU, X. Physical exercise promotes novel object recognition memory in spontaneously hypertensive rats after ischemic stroke by promoting neural plasticity in the entorhinal cortex. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. 2017

PARK, H.; POO, M. Neurothophin regulation of neural circuit development and function. **Nature reviews**. 2013

PATTERSON, S. L.; ABEL, T.; DEUEL, T. A.; MARTIN, K. C.; ROSE, J.C.; KANDEL, E. R. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. **Neuron**.v.16, 1996

PIAZZA, P. V.; le MOAL, M. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids and dopaminergic neurons. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 1996

RHODES, J. S.; BEST, K.; BELKNAP, J. K.; FINN, D. A.; CRABBE, J. C. Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. **Physiolog and Behavior**, 2005

RHODES, J. S.; FORD, M. M.; YU, C. H.; BROWN, L. L.; FINN, D. A.; GARLAND, T., et al. Mouse inbred strain differences in ethanol drinking to intoxication. **Genes, Brain and Behavior**, 2007

RICO-BARRIO, I.; PEÑASCO, S.; PUENTE, N.; RAMOS, A.; FONTAINE, C. J.; REGUERO, L.; GIORDANO, M. E.; BUCETA, I.; TERRADILLOS, I.; LEKUNBERRI, L.; ZUBIAGA-MENDIZABAL, J.; de FONSECA, F. R.; GERRIKAGOITIA, I.; ELEZGARAI, I.; GRANDES, P. Cognitive and neurobehavioral benefits of an enriched environment on young mice after chronic ethanol consumption during adolescence. **Addiction Biology**. 2018

RIEDEL, G.; MICHEAU, J.; LAM, A. G. M.; ROLOFF, E.; MARTIN, S. J.; BRIDGE, H.; de HOZ, L.; POESCHEL, B.; McCULLOCH, J.; MORRIS, R. G. M. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory process. **Nature Neuroscience**. 1999

RISHER, M-L.; FLEMING, R. L.; BOUTROS, N.; SEMENOVA, S.; WILSON, W. A.;LEVIN, E. D.; MARKOU, A.; SWARTZWELDER, H. S.; ACHESON, S. . Long-Term Effects of Chronic Intermittent Ethanol Exposure in Adolescent and Adult Rats: Radial-Arm Maze Performance and Operant Food Reinforced Responding. **PLOS ONE**, 2013

ROSS, R. S.; EICHENBAUM, H. Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory. **Journal Neuroscience**. 2006

RYABININ, A. E.; MILLER, M. N.; DURRANT, S.. Effects of acute alcohol administration on object recognition learning in C57BL/6 mice. **Pharmacology biochemistry and behavior**. v.71, 2002

SALMON, P. Anxiety, depression and sensitivity to stress: A unifying theory. **Clin. Psy. Rev**. v.21. n.1. 2001

SANTARELLI, S.; ZIMMERMANN, C.; KALIDERIS, G.; LESUIS, S. L.; ARLOTH, J.; URIBE, A.; DOURNES, C.; BALSEVICH, G.; HARTMANN, J.; MASANA, M.; BINDER, E. B.; SPENGLER, D.; SCHMIDT, M. V. An adverser early life environment can enhance stress resilience in adulthood. **Psychoneuroendocrinology**. 2017

SCHAAF, M. J.; de KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. **Stress**. 2000

SCHULTZ, C.; ENGELHARDT, M. Anatomy of the Hippocampal Formation. **Front. Neurol Neurosci**. 2014

SCHULTEIS, G.; ARCHER, C.; TAPERT, S. F.; FRANK, L. R. Intermittent Binge Alcohol Exposure during the Periadolescent Period Induces Spatial Woring Memory Deficits in Young Adult. **Alcohol**, 2008

SHAW-LUTCHMAN, T. Z.; IMPEY, S.; STORM, D.; NESTLER, E. J. Regulation of CRE-Mediated Transcription in Mouse Brain by Amphetamine. **Synapse**. 2003

SHAW-LUTCHMAN, T. Z.; BARROT, M.; WALLACE, T.; GILDEN, L.; ZACHARIOU, V.; IMPEY, S.; DUMAN, R. S.; STORM, D.; NESTLER, E. J. Regional and Cellular Mapping of cAMP Response Element-Mediated Transcription during Naltrexone-Precipitated Morphine Withdrawal. **The Journal of Neuroscience**. 2002

SHEN, H.; TONG, L.; BALAZS, R.; COTMAN, W. Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. **Neuroscience**. v.107, n.2, 2001.

SILVERS, J. M.; HARROD, S. B.; MACTUTUS, C. F.; BOOZE, R. M. Automation of the novel object recognition task or use in adolescent rats. **Journal Neuroscience Methods**. 2007

SINCLAIR, J. D.; WALKER, S.; JORDAN, W. Behavioral and physiological changes associated with various durations of alcohol deprivation in rats. **Q. J. Stud. Alcohol**. 1973

SOARES-SIMI, S. L.; PASTRELLO, D. M.; FERREIRA, Z. S.; YONAMINE, M.; MARCOURAKIS, T.; SCAVONE, C.; CAMARINI, R. Changes in CREB activation in the pré-frontal cortex and hippocampus blunt ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent mice. **Front. Integ. Neurosc**. 2013

SOYA, H.; NAKAMURA, T.; DEOCARIS, C. C.; KIMPARA, A.; IIMURA, M.; FUJIKAWA, T.; CHANG, H.; McEWEN, B. S.; NISHIJIMA, T. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2007

SOMKUWAR, S. S.; FANNON-PAVLICH, M. J.; CHOFRANIAN, A.; QUIGLEY, J. A.; DUTTA, R. R.; GALINATO, M. H.; MANDYAM, C. D. Wheel running reduces ethanol seeking by increasing neuronal activation and reducing oligodendrogial/neuroinflammatory factors in the medial prefrontal cortex. **Brain, Behavior and Immunity.** v.58. 2016.

SPEAR, L. Neurobehavorial changes in adolescence. **American Psychological Society**, v.9, n.4, 2000

SQUIRE, L. R. Memory and Brain. New York: Oxford Univ. Press. 1987

SQUEGLIA, L. M; JACOBUS, J; TAPERT, S. F. The effect of alcohol use on human adolescent brain structures and systems. **Handbook of Clinical Neurology**. v.125, 2014

STEPHENS, M. A. C.; WAND, G. Stress and the HPA axis – role of clucocorticoids in alchol dependence. **Alcohol research**. 2012

STRANAHAM, A. M.; KHALIL, D.; GOULD, E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. **Nature Neuroscience.** 2006

SULLIVAN, E. V.; MARSH, L.; MATHALON, D. H.; LIM, K.O.; PFEFFERBAUM, A. Anterior hippocampal volume deficits in nonamnesic, aging chronic alcoholics. **Alcoholism: Clin. Exp. Res**. v.19. n.1. 1995

SUO, L.; ZHAO, L.; SI, J.; LIU, J.; ZHU, W.; CHAI, B.; ZHANG, Y.; FENG, J.; DING, Z.; LUO, Y.; SHI, H.; SHI, J.; LU, L. Predictable chronic mild stress in adolescence increases resilience in adulthood. **Neuropsychopharmacology**. 2013

TULVING, E.; SCHACTER, D. L. Priming and human memory systems. **Science**. 247:301-306, 1990

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Eur Journal Neurosci**. v, 20. 2004

VENEZIA, A. C.; QUINLAN, E.; ROTH, S. M. A single bout of exercise increases hippocampal BDNF: Influence of chronic exercise and noradrenaline. **Genes Brain Behav**. 2017

VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; SPANAGEL, R. The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice. **Alcohol**. 2014.

VOLKOW, N. D. FOWLER, J. S.; WANG, G.; SWANSON, J. M. Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. **Molecular Psychiatry**. 2004

VOSS, M. W.; VIVAR, C.; KRAMER, A. F.; van PRAAG, H. Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. **Trends Cogn Sci**. 2013

WELCH, K. A.; CARSON, A.; LAWRIE, S. M. Brain structure in adolescents and young adults with alcohol problems: systematic review of imaging studies. **Alcohol and Alcoholism.** v..48, n.4, 2013

WHITE, A. M. What Happened? Alcohol, Memory Blackouts, and the Brain. **Alcohol Research & Health***,* v.27, n.2, 186-196, 2003

WHITE, A. M.; SWARTZWELDER, H. S. Hippocampal function during adolescence – a unique target o ethanol effects. **Ann. New York Acad. Sci**., 2004

WHITE, N. M. Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memor systems. **Addiction**. 1996.

WIDNELL, K. L.; RUSSELL, D. S.; NESTLER, E. J. Regulation of expression of cAMP response element-binding protein in the locus coeruleus in vivo and in a locus coeruleus-like cell line in vitro. **Proc. Natl. Acad. Scie**. USA. v.91. 1994

WIDNELL, K. L.; SELF, D. W.; LANE, S. B.; RUSSELL, D. S.; VAIDYA, V. A.; MISERENDINO, M. J. D.; RUBIN, C. S.; DUMAN, R. S. NESTLER, E. J. Regulation of CREB Expression: In Vivo Evidence for a Functional Role in Morphine Action in the Nucleus Accumbens. **The Journal of Pharmacology and Exp. Therapeutics**. v.276. n.1. 1996

WILLIAMS, D. M.; DUNSIGER, S.; WHITELE, J. A.; USSHER, M. H.; CICCOLO, J. T.; ENNINGS, E. G. Acute effects of moderate intensity aerobic exercise on affective withdrawal symptoms and cravings among women smokers. **Addictive Behaviors**. 2011

WISE, R. A. Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. **Psycopharmacologia**. 1973

World Health Organization (WHO). Global status report on alcohol and health. Geneva: World Health Organization. 2018

World Health Organization (WHO). World Health Statistics. 2018

YANG, JL.; LIN, YT.; CHUANG, PC.; BOHR, V. A.; MATTSON, M. P. BDNF and Exercise Enhance Neuronal DNA Repair by Stimulating CREB-Mediated production of Apurinic Apyrimidinic Endonuclease 1. **Neuromolecular Med**. 2013

YANG, X.; DIEHL, M. A.; WAND, G. S. Ethanol Exposure Alters the Phosphorylation of Cyclic AMP Responsive Element Binding Protein and Cyclic AMP Responsive Element Binding Activity in Rat Cerebellum. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.278. n.1. 1996

YANG,X.; HORN, K.; BARABAN, J. M.; WAND, G. S. Chronic Ethanol Administrattion Decreases Phosphorylation of Cyclic AMP Reponse Element Binding Protein in Granule Cells of Rat Cerebellum. **Journal of Neurochemistry**. 1998a

YANG, X.; HORN, K.; WAND, G. S. Chronic Ethanol Exposure Impairs Phosphorlation of CREB and CRE-Binding Activity in Rat Striatum. **Alcoholism: Clin. Exp. Res**. v.22. n.2. 1998b

ZAJAC, M. S.; PANG, T. Y.; WONG, N.; WEINRICH, B.; LEANG, L. S.; CRAIG, J. M.; SAFFERY, R.; HANNAN, A. J. Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. **Hippocampus**. 2010

ZHENG, F.; ZHOU, X.; MOON, C.; WANG, H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. **Int. J. Phsiol. Pathophysiol Pharmacol**. 2012