

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

MARTIELO JANUÁRIO DA MATA

**EFEITO DA SEPARAÇÃO MATERNAL SOBRE A IMPULSIVIDADE,
CONSUMO VOLUNTÁRIO DE ETANOL E EXPRESSÃO DE
COMPONENTES DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E
DOPAMINÉRGICO EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO:
INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE ETANOL EM *BINGE* NA
ADOLESCÊNCIA**

VITÓRIA

2016

MARTIELO JANUÁRIO DA MATA

**EFEITO DA SEPARAÇÃO MATERNAL SOBRE A IMPULSIVIDADE,
CONSUMO VOLUNTÁRIO DE ETANOL E EXPRESSÃO DE
COMPONENTES DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E
DOPAMINÉRGICO EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO:
INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE ETANOL EM *BINGE* NA
ADOLESCÊNCIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt.

VITÓRIA

2016

MARTIELO JANUÁRIO DA MATA

**EFEITO DA SEPARAÇÃO MATERNAL SOBRE A IMPULSIVIDADE,
CONSUMO VOLUNTÁRIO DE ETANOL E EXPRESSÃO DE
COMPONENTES DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E
DOPAMINÉRGICO EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO:
INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE ETANOL EM *BINGE* NA
ADOLESCÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em 16/09/2016 por:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Santana de Vasconcelos Bittencourt – Orientadora
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

Prof^a. Dr^a. Carla Dalmaz
Departamento de Bioquímica – UFRGS

Prof^a. Dr^a. Rita Gomes Wanderley Pires
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

VITÓRIA

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Mata, Martielo Januário da, 1991 -

M425e Efeito da separação maternal sobre a impulsividade,
consumo voluntário de etanol e expressão de componentes do
sistema endocanabinóide e dopaminérgico em córtex pré-frontal
e hipocampo: influência do consumo de etanol em binge na
adolescência / Martielo Januário da Mata – 2016.

86 f. : il.

Orientador: Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Ansiedade de Separação. 2. Etanol. 3. Dopaminérgicos.
I. Bittencourt, Ana Paula Santana de Vasconcellos.
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. III. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir chegar até aqui, por ser a força necessária para encarar as adversidades do dia a dia.

À minha orientadora, professora Ana Paula, por me receber durante a graduação e continuar me orientando desde então, durante os últimos 6 anos. Agradeço por todo o carinho, dedicação e paciência. Você contribuiu muito não só para meu crescimento científico, mas também para o meu crescimento pessoal.

Ao professor Valério Garrone Baraúna, pelo auxílio com a execução da técnica de PCR, obrigado por toda a disposição para ajudar e por ser um exemplo de pesquisador.

Aos professores Athelson Bittencourt, Livia Carla de Melo e Luiz Carlos Schenberg, pelo auxílio com materiais e equipamentos necessários para a execução do projeto.

As professoras Carla Dalmaz e Rita Gomes Wanderley Pires, por aceitarem avaliar esse trabalho.

Agradeço também aos demais professores do programa e a secretária Kelly, por toda a disponibilidade e ajuda.

Aos amigos do laboratório, agradeço a Vanessa, pela divisão das tarefas e procedimentos necessários ao projeto. A Josefa e a Ludhielle, pela ajuda em tudo que eu precisava, tornando mais fácil a execução do projeto. Também agradeço ao Victor Hugo pela ajuda nos momentos de sufoco. A Laísa e a Jéssica, que embora não tenham ficado no laboratório durante todo o tempo do meu mestrado, foram grande inspiração e incentivo para mim. Ao João, nosso agregado, por toda ajuda, especialmente com a estatística. E claro, agradeço a minha dupla Randry.

Randry, obrigado por todo o companheirismo, nossa amizade foi um verdadeiro presente que o mestrado me deu. Não tenho como agradecer toda sua dedicação e disposição para me ajudar.

Agradeço aos outros alunos do PPGBF por auxílios, pela organização do curso de verão e pela companhia durante as disciplinas.

Aos alunos do laboratório de Plastinação da UFES, Laissa e Yuri, pela ajuda, consertos e apoio.

A todos os funcionários do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da UFES, pela auxílio e apoio, durante a execução do projeto.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM), à Natércia e ao Prof. Dr. Alexandre Martins, pelo suporte ao projeto.

À Prof. Dra. Edilamar Menezes e ao Dr. Stephano, por me receberem em São Paulo para a realização de parte dos experimentos, obrigado pela disposição e auxílio.

Agradeço especialmente à minha família, a minha mãe por toda a dedicação e sacrifício, por ter me dado tudo que fosse necessário para que eu pudesse ser tudo que sou hoje, as minhas irmãs, Mariela e Marcelly pelo companheirismo, ao meu pai e aos meus tios Fernando e Bel, pelo suporte e apoio.

Aos meus amigos, Glauci, Lara, Lele, Larys, Lilian, Letícia, Greg, Antônio e Danilo, por tantos momentos de alegria e por todo apoio.

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo pela estrutura, a CAPES pela bolsa, ao CNPQ, ao ProExt MEC, e à FAPES pelo recurso financeiro.

Agradeço a TODOS que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho, sem vocês não seria possível chegar até aqui. MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
1. REVISÃO DA LITERATURA	18
1. 1. Importância do apego mãe-filhote.....	18
1.2. Separação maternal	20
1.2.1. Separação maternal e eixo HHA.....	20
1.2.2. Efeitos comportamentais de longo prazo provocados pela separação maternal.....	22
1.2.3. Separação maternal x Consumo de etanol	24
1.3. Etanol.....	26
1.3.1. Etanol e Neurotransmissão	26
1.3.2. Etanol e danos neurais	28
1.3.3. Consumo de etanol e Δ FosB	28
1.3.4. Consumo de etanol em binge na adolescência	30
1.4. Sistema endocanabinóide	32
1.5. Sistema dopaminérgico.....	34
2. OBJETIVOS	38
2.1. Objetivo Geral:.....	38
2.2. Objetivos Específicos:	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Animais	39
3.2. Desenho experimental.....	39
3.3. Separação maternal.....	40
3.4. Administração de etanol.....	41
3.5. Concentração sanguínea de etanol.....	41
3.6. Testes comportamentais.....	41
3.6.1. Teste de aprendizado	41

3.6.2. Teste de impulsividade.....	43
3.6.3. Consumo voluntário de etanol.....	45
3.7. Eutanásia e obtenção das amostras.....	45
3.8. Análise da expressão gênica.....	45
3.8.1. Extração de RNA total	45
3.8.2. Eletrofose em gel de agarose	46
3.8.3. Síntese de cDNA	46
3.8.4. Reação de PCR em tempo real	46
3.9. Análise Estatística	47
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Concentração sanguínea de etanol	49
4.2. Teste de aprendizado no Labirinto em T.....	49
4.2.1 Consumo de etanol em binge agudo	49
4.2.2 Consumo de etanol em binge crônico.....	51
4.3. Teste de Impulsividade.....	53
4.4. Consumo Voluntário de Etanol	57
4.5. Expressão de mRNA de componentes do sistema endocanabinóide no córtex pré-frontal	57
4.6. Expressão de mRNA de componentes do sistema dopaminérgico no córtex pré-frontal	59
4.7. Expressão de mRNA do Δ FosB no córtex pré-frontal	60
4.8. Expressão de mRNA do sistema endocanabinoíde no hipocampo.....	61
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS	74

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Representação do sistema endocanabinóide	32
Figura 2 - Sinapse dopaminérgica.....	35
Figura 3 - Desenho experimental	40
Figura 4 - Caixa de separação maternal	40
Figura 5 - Representação esquemática do labirinto em T para o teste de aprendizado.....	43
Figura 6 - Representação esquemática do Labirinto em T para o teste de impulsividade.....	44
Figura 7 - Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre o aprendizado no Labirinto em T.....	50
Figura 8 - Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre o aprendizado no Labirinto em T.....	52
Figura 9 - Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre a curva de aprendizado no teste de impulsividade	54
Figura 10 - Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre a impulsividade.....	56
Figura 11 - Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre o consumo voluntário de etanol apresentada no gráfico de barras.....	57
Figura 12 - Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre a expressão de mRNA dos componentes do sistema endocanabinóide no córtex pré-frontal.....	58
Figura 13 - Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre a expressão de mRNA dos componentes do sistema dopaminérgico	60
Figura 14 - Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre a expressão de mRNA do marcador de adição Δ FosB.	61
Figura 15 - Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre a expressão de mRNA dos componentes do sistema endocanabinóide no hipocampo.....	62

TABELAS

Tabela 1 - Sequências de iniciadores utilizadas por gene	47
Tabela 2 - Efeito do consumo de etanol agudo e da separação maternal sobre a estratégia de aprendizado no Labirinto em T	51
Tabela 3 - Efeito do consumo de etanol crônico e da separação maternal sobre a estratégia de aprendizado no Labirinto em T	53

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG: 2- araquidonoil-glicerol

3-MT: 3-metoxitiramina

AC: adenilato cilase

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

AEA: Anandamida

AFR: “animal facility rearing” – condições padrão de manutenção

BDNF: neurotrófico derivado do encéfalo

CA: Campo aberto

cAMP: adenosina monofosfato cíclico

CE: Coleta de estruturas

CEB: consumo de etanol em *binge*

COMT: catecol-Ometiltransferase

CORT: estimula a liberação de corticosterona

CREB: elemento de resposta ao AMPc

CRH: hormônio liberador de corticotrofina

CVE: Consumo voluntário de etanol

D1: receptor D1

D2: receptor D2

DA: dopamina

DAG: diacilglicerol

DAGL: diacilglicerol lipase

DAT: transportador de dopamina

DEPC: dietilpirocarbonato

DOPAC: ácido diidroxifenilacético

DPN: dia pós-natal

EMT: transportador de membrana para endocanabinóides

EtOH: etanol

FAAH: amida hidrolase de ácidos graxos

GABA: ácido gama-aminobutírico

HHA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HVA: ácido homovanílico

LCE: Labirinto em cruz elevado

L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina

LTP: potencialização de longa duração

MAGL: monoacilglicerol lipase

MAO: enzima monoaminaoxidase

MAO-B: Monoaminoxidase-B

MEF2: fator de reforço de miócitos-2

NAC: núcleo acumbens

NAPE: N-acilfosfatidil –etanolamina

NAPE-PLD: N-acilfosfatidiletanolamina especifica fosfolipase D

NAT: N-acetiltransferase

NFkB: factor nuclear kB

NMDA: N-metil-D-apartato

NS: não separados

PLC: fosfolipase C específica

S: separados

SM: separação maternal

SNC: sistema nervoso central

TAE: Tris-ácido acético EDTA

TH: tirosina hidroxilase

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

VTA: área tegmentar ventral

Δ FosB: fator de transcrição da família Fos

RESUMO

A separação maternal tem sido um modelo animal amplamente utilizado, para mimetizar eventos estressores no período neonatal, podendo levar ao desenvolvimento de déficits cognitivos e ao abuso de substâncias, como o etanol. Essa substância representa um potencial risco a saúde por se tratar de uma bebida muito consumida por jovens e adolescentes, principalmente, em *binge*, um consumo pesado episódico de etanol. Este é capaz de provocar alterações comportamentais e em sistemas de neurotransmissores, como o dopaminérgico e o endocanabinóide. Neste estudo, nós buscamos avaliar a influência do consumo de álcool em binge por ratos adolescentes submetidos à separação maternal sobre o aprendizado, a impulsividade e o consumo voluntário de etanol na vida adulta, bem como investigar os efeitos desses tratamentos sobre o sistema endocanabinóide e dopaminérgico. Para isso, ratos Wistar machos foram separados ou não de suas mães dos dias pós-natal 2-15, por 3 horas diárias. Os animais não separados foram mantidos sob condições padrões de biotério. No 35º dia de vida, os animais foram divididos em grupos para o tratamento agudo ou crônico. Ambos os grupos foram novamente divididos em 3 subgrupos, que receberam veículo (salina) ou etanol em doses de 3,0 ou 6,0 g/kg, por gavagem. O etanol foi administrado por três dias consecutivos (binge agudo) ou uma vez por dia, dois dias consecutivos, intercaladas por dois dias sem etanol, perfazendo um total de 10 doses (binge crônico). No final deste procedimento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de aprendizado e impulsividade, ambos utilizando um Labirinto em T, ao teste de consumo voluntário de etanol, ou eutanasiados para obtenção das estruturas córtex pré-frontal e hipocampo. A expressão de mRNA dos componentes do sistema endocanabinóide: receptor CB1, e as enzimas: monoacilglicerol lipase, amida hidrolase de ácidos graxos, N-acilfosfatidiletanolamina específica fosfolipase D e diacilglicerol lipase, foi avaliada em ambas as estruturas, e os receptores dopaminérgicos D1, D2 e a enzima tirosina hidroxilase foram avaliados apenas no córtex pré-frontal. Nós observamos que separação maternal aumentou o comportamento de impulsividade e o consumo voluntário de etanol, e o consumo de etanol na

adolescência prejudicou a memória de curta duração, parecendo prevenir as demais alterações comportamentais geradas pela separação maternal. No córtex pré-frontal a separação maternal e o etanol alteraram o sistema dopaminérgico com redução da expressão de mRNA de D1 e aumento da tirosina hidroxilase, e parecem gerar um aumento das enzimas de síntese de endocanabinóides, N-acilfosfatidiletanolamina específica fosfolipase D e diacilglicerol lipase. No hipocampo no grupo submetido a ambos os tratamentos houve uma redução da expressão de mRNA de CB1 e da enzima N-acilfosfatidiletanolamina específica fosfolipase D, e um aumento da expressão da diacilglicerol lipase. Em conclusão, tanto a separação maternal quanto o etanol, foram capazes de provocar alterações comportamentais e nos sistemas endocanabinóide e dopaminérgico, e a separação maternal modifica a resposta aos efeitos do etanol.

Palavras chave: separação maternal, consumo de etanol na adolescência, sistema endocanabinóide, sistema dopaminérgico

ABSTRACT

Maternal separation is an animal model used to mimic stressful events in the neonatal period, which may lead to the development of cognitive impairments and substances abuse, such as ethanol. This substance is a potential risk to health due to its high consumption by young people, and its consumption alters behavior and neurotransmitter systems function, such as dopaminergic and endocannabinoid systems. In this study, we evaluate the influence of ethanol binge drinking in adolescent rats subjected to maternal separation on learning, impulsivity and voluntary ethanol consumption in adulthood, as well as (the effects of these treatments) on the endocannabinoid and dopaminergic systems. For this, male Wistar rats were separated from their mothers or not (control group) during the postnatal days (DPN) 2-15, for 3 hours daily. Animals not separated were kept on animal facility reared conditions. At DPN 35, the animals were divided in acute or chronic treatment. Both groups were again divided into 3 subgroups, which receive vehicle (saline) or ethanol in doses of 3.0 or 6.0 g/kg by intragastric administration. Ethanol was administered during three consecutive days (acute treatment) or once a day, two consecutive days, interspersed by two days without ethanol, totalizing 10 doses (chronic treatment). At the end of this procedure, the animals were subjected to behavioral tests (learning and impulsivity tests), both using a T-maze, and to the voluntary ethanol consumption test, or euthanized for prefrontal cortex and hippocampus removal. The mRNA expression of the components of the endocannabinoid system: CB1, monoacylglycerol lipase, fatty acid amide hydrolase, N-acyl-phosphatidylethanolamine phospholipase D and diacylglycerol lipase were evaluated in both structures, and the dopaminergic receptors D1, D2 and tyrosine hydroxylase enzyme were evaluated only in the prefrontal cortex. We observed that maternal separation increased impulsivity behavior and voluntary consumption of ethanol, and ethanol in adolescence impaired short-term memory and appears to reverse other behavioral changes due to maternal separation. In the prefrontal cortex, maternal separation and ethanol altered dopaminergic system with reduction of D1 mRNA expression and increased tyrosine hydroxylase, and appears to increase the enzymes for endocannabinoid synthesis, N-acyl-phosphatidylethanolamine phospholipase D e diacylglycerol

lipase. In the hippocampus, the group submitted to both treatments presented a reduction of CB1 mRNA expression and the enzyme N-acyl-phosphatidylethanolamine phospholipase D, and an increased expression of diacylglycerol lipase. In conclusion, maternal separation and ethanol were able to cause behavioral changes and modifications in endocannabinoid and dopaminergic systems, and maternal separation modifies ethanol effects response.

Keywords: maternal separation, adolescence ethanol binge drinking, endocannabinoid system, dopaminergic system

1. REVISÃO DA LITERATURA

1. 1. Importância do apego mãe-filhote

A relação entre mãe e filhote, em humanos e outras espécies de mamíferos, têm um papel crucial para o desenvolvimento e sobrevivência do recém-nascido. Para o filhote, a mãe tem função muito importante, pois fornece proteção, calor e alimento (SULLIVAN, 2003). Em ratos, inicialmente, o vínculo entre a mãe e filho é criado especialmente pelo odor, sendo essa a primeira coisa aprendida pelo filhote, assim o mesmo sabe que esse “odor” permite sua sobrevivência (BOLLES & WOODS, 1965).

Uma grande contribuição para a compreensão do desenvolvimento das relações maternas de apego foi dada pelo psiquiatra John Bowlby, o qual propôs que essa relação teria uma importância evolutiva, a qual representaria um modo de proteção contra predadores e, portanto, o elo mais importante para a sobrevivência. Além disso, Bowlby propôs que o apego mãe-filhote é necessário para a saúde mental e a qualidade de todos os relacionamentos no indivíduo adulto (BOWLBY, 1982).

Na clínica, uma forte evidência da importância da relação de apego entre mãe e filho para o desenvolvimento psicológico e fisiológico dos indivíduos é o método canguru. Este método foi idealizado e criado no ano de 1978, por Edgar Rey Sanabria e Hector Martinez, no Instituto Materno-Infantil de Bogotá, Colômbia (REY & MARTINEZ, 1983). O método, inicialmente proposto para recém-nascidos com baixo peso corporal, consiste na aproximação da mãe ao filho, aumentando o tempo de contato entre os mesmos, o que acelera o desenvolvimento do neonato (NYQVIST et al., 2010). Segundo alguns pesquisadores, o contato pele a pele da mãe com seu filho permitiria que este tivesse acesso aos três componentes básicos necessários para sobrevivência e desenvolvimento do neonato, quais sejam: o calor, o leite materno e amor maternal (NYQVIST et al., 2010)

A aplicação do método é capaz de acelerar a maturação e manter a regulação da temperatura em indivíduos recém-nascidos com baixo peso gestacional (PARK et al., 2014). Através desse método observa-se efeitos sobre os padrões de sono dos bebês, que sugerem uma melhoria da maturação

cerebral. Também ocorrem importantes benefícios para o desenvolvimento neurocomportamental e psicomotor (FELDMAN et al., 2003; SCHER et al., 2009).

A importância do apego, também se manifesta no desenvolvimento de outros animais: por exemplo, ratos filhotes que receberam mais cuidados maternos, como lambidas e maior interação, demonstraram uma melhora no desenvolvimento de estruturas encefálicas e no desempenho em tarefas cognitivas (LIU et al., 2000). Sendo assim, a relação mãe-filhote pode contribuir para a diferença nas características individuais na expressão gênica, e para o comportamento ao longo de gerações (WEAVER et al., 2004). A interação mãe-filhote é dinâmica, ou seja, sofre influência de diversos processos, e a influência do meio nessa relação pode induzir reorganizações permanentes dos sistemas neuroendócrinos e dos comportamentos tanto da mãe quanto da prole (LUCION & BORTOLINI, 2014).

Como visto, o apego e os cuidados iniciais recebidos pelos filhos de seus cuidadores parecem ser indispensáveis para o desenvolvimento saudável da criança, e muitos pesquisadores acreditam que a ausência desses cuidados, assim como eventos traumáticos como negligência ou abandono, pode levar a transtornos durante a idade adulta, como o desenvolvimento de doenças neurológicas e psiquiátricas (HEIM & NEMEROFF, 2001).

1.2. Separação maternal

Em filhotes de mamíferos a separação de suas mães representa um evento altamente ansiogênico, que pode causar danos ao desenvolvimento psicológico e fisiológico dos indivíduos. Para a maior parte dos filhotes, a mãe é a principal fonte de estimulação ambiental, portanto, mesmo pequenas perturbações na interação entre a mãe e sua prole, resultam em alterações duradouras nos filhotes (HELMEKE et al., 2008; LEVINE, 2001; MACRÌ & WÜRBEL, 2007; PANKSEPP, 2005).

Em animais, o modelo mais aplicado para mimetizar os efeitos de experiências traumáticas no período perinatal, tais como maus tratos e abandono, é a separação maternal, que tem sido amplamente utilizada como modelo neonatal de indução de transtornos psiquiátricos (HEIM & NEMEROFF, 2001; LAMBAS-SEÑAS et al., 2009; SÁNCHEZ et al., 2001).

1.2.1. Separação maternal e eixo HHA

A separação maternal (SM) por 3 horas diárias, nas primeiras semanas de vida, provoca alterações emocionais e na resposta ao estresse na vida adulta, estando associada à hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em resposta a um estímulo estressor (PLOTSKY & MEANEY, 1993).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal controla as respostas do organismo ao estresse e regula algumas atividades do ciclo circadiano. O hormônio liberador de corticotrofina (CRH) é produzido no núcleo paraventricular do hipotálamo e secretado na eminência mediana, atingindo a hipófise através da circulação portal hipofisária e regulando ali a liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrópico). O ACTH, por sua vez, estimula a liberação de corticosterona (CORT) na supra-renal em ratos (ou cortisol em humanos). A corticosterona participa na supressão da síntese de prostaglandinas e na modulação da resposta imune, estimula a gliconêogênese hepática, (WIEGERS & REUL, 1998), e exerce controle sobre a produção de hormônios no hipotálamo e na hipófise por retroalimentação.

A elevação da corticosterona nos animais submetidos ao estresse no período perinatal pode provocar mudanças duradouras no sistema nervoso central (SNC) desses animais. Isso ocorre porque, durante as duas primeiras

semanas de vida, existe uma baixa resposta da adrenal para a produção de glicocorticoides. Esse nível estável de glicocorticoides é importante para o desenvolvimento neuronal (SAPOLSKY & MEANEY, 1986). Procedimentos como a separação maternal são capazes de provocar um aumento da liberação de glicocorticoides, mesmo durante esse período, e levar a alterações duradouras no controle do eixo HHA (SAPOLSKY & MEANEY, 1986; LAJUD et al., 2012). A separação maternal leva a diversas alterações no controle do eixo HHA de animais quando adultos, tais como: aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e de corticosterona em resposta ao estresse, aumento da expressão do gene de CRH no hipotálamo e na amígdala (PLOTSKY & MEANEY, 1993; LIU et al., 2000), redução da densidade de receptores de glicocorticoides no hipocampo e no córtex pré-frontal (MACRI & WURBEL, 2007; DALLMAN et al., 1994).

A exposição a níveis elevados de glicocorticoides durante o período pós-natal tem sido associada ao desenvolvimento de psicopatologias no adulto, tais como depressão e distúrbios de ansiedade (HEIM et al., 1997). A SM pode interromper permanentemente a capacidade dos receptores de glicocorticoides do hipocampo de regular negativamente o eixo HHA (FUMAGALLI et al., 2007). Essas alterações são importantes, pois podem estar envolvidas nos efeitos a longo prazo provocado pela separação maternal, inclusive na regulação de mecanismos epigenéticos.

Mecanismos epigenéticos levam a alteração da expressão gênica, que independem de mudanças na sequência primária do DNA. Os principais mecanismos envolvidos são a metilação de DNA, modificações pós-traducionais em histonas (metilação, acetilação e fosforilação) e posicionamento de nucleossomos e microRNAs. Estas modificações epigenéticas são estáveis, mas reversíveis (LABBE et al., 2016).

Alterações epigenéticas provocadas pelo estresse perinatal, foram descritos, principalmente em genes relacionados a regulação do eixo HHA. Em humanos, alterações epigenéticas na região promotora do gene dos receptores de glicocorticoides, como a metilação, podem estar envolvidas no feedback negativo disfuncional do eixo HHA de indivíduos que sofreram abuso ou negligência na infância (JAWAHAR et al., 2015). Em animais, a SM leva a um

aumento da acetilação da região promotora do CRH, aumentando a atividade transcricional desse gene (MCGOWAN et al., 2011). Também foram observadas alterações na expressão de microRNAs no hipocampo de animais submetidos à separação maternal (DNP 1-13) (BAI et al., 2012) e indução da acetilação de histonas, principalmente no córtex pré-frontal de ratos submetidos a SM (DNP 1-14) (LEVINE et al., 2012). Essas alterações na expressão gênica podem estar associadas aos fenótipos comportamentais encontrados em animais submetidos à separação maternal.

1.2.2. Efeitos comportamentais de longo prazo provocados pela separação maternal

A separação maternal nos primeiros momentos de vida pode causar diversas variações comportamentais, na memória ou no aprendizado, a curto e longo prazo. Em ratos, as primeiras semanas de vida, são essenciais para que ocorra o desenvolvimento do sistema nervoso, e processos vitais como migração, divisão, diferenciação e morte de células neurais, ocorrem nessa fase do desenvolvimento (BOHN, 1980; SCHMIDT et al., 2002).

Muitos estudos demonstram os efeitos provocados pela separação maternal, como a predisposição ao desenvolvimento de psicopatologias, tais como, depressão (LEE et al., 2007), ansiedade (CASSIDY et al., 2009), abuso de substâncias (MOFFETT et al., 2007), mal adaptação ao estresse (KALINICHEV et al., 2002a, 2002b) e respostas do tipo-pânico (QUINTINODOS-SANTOS et al., 2014). Além disso, a separação maternal pode produzir mudanças estruturais nos circuitos cerebrais responsáveis pela memória e aprendizado (HOULT et al., 2002; PRICE & FELDON, 2003).

A literatura abordando os efeitos de longo prazo induzidos pela separação maternal é diversa. Vários estudos demonstram que a separação maternal é capaz de gerar déficits de aprendizado em teste de memória espacial como o labirinto aquático de Morris (LEMAIRE et al., 2000; OITZL et al., 2000), provocar prejuízos no desenvolvimento da potencialização de longa prazo (LTP) (CAO et al., 2014) e também gerar modificações estruturais no hipocampo, como a redução da expressão de receptores NMDA e do fator neurotrófico derivado do

encéfalo (BDNF) que possuem papel importante para a memória (ROCERI et al., 2002).

Outros autores, porém, não observaram alterações tanto durante a fase de aprendizado no labirinto aquático de Morris, quanto na memória de reconhecimento de objetos (GRACE et al., 2009; GRISSOM et al., 2012). Além disso, Zhang et al., (2014) demonstraram benefícios da separação maternal, nos testes de reconhecimento social e labirinto aquático de Morris, e a ainda uma facilitação da LTP. Esses achados demonstram o quão variável são os resultados encontrados em testes de memória, e os resultados encontrados são dependentes do tempo de separação maternal, idade na qual são realizados os testes comportamentais, entre outras variáveis.

Assim como o aprendizado, alguns autores sugerem que a impulsividade é um comportamento que também pode sofrer influência de episódios repetidos de separação maternal (LOVIC et al., 2011). A impulsividade é caracterizada como "uma predisposição para reações rápidas e não planejadas a estímulos internos e externos sem levar em conta as consequências negativas dessas reações a si ou para outros" (MOELLER et al., 2001). A impulsividade pode ser mensurada de duas formas: a escolha de uma recompensa menor e imediata, em detrimento de uma recompensa maior, porém demorada, ou a incapacidade de inibição de um comportamento, sem conseguir alterá-lo ou mesmo pará-lo após iniciado (MOELLER et al., 2001; FILLMORE & RUSH, 2002;). O córtex pré-frontal e o estriado são as principais estruturas responsáveis pelo comportamento impulsivo (WINSTANLEY et al., 2006).

Spivey et al. (2009) observaram que animais submetidos à separação maternal apresentavam, quando submetidos ao campo aberto (open field), um aumento de transições ambulatorias, velocidade, tempo de centrotaxia, e redução de respostas de orientação quando comparados com o grupo controle, mesmo quando os animais já haviam sido expostos a esse ambiente. Os autores associaram esses resultados a um aumento do comportamento imperativo/impulsivo nos animais separados. No mesmo teste, achados similares foram encontrados por outros pesquisadores, porém somente em resposta a primeira exposição no campo aberto (COLORADO et al., 2006). Lovic

e colaboradores (2011) observaram, em animais desprovidos dos cuidados maternos e submetidos ao isolamento social, um aumento da ação impulsiva.

O comportamento de impulsividade parece estar envolvido no comportamento de adição a drogas, sendo tanto um fator importante para o início e desenvolvimento da adição como consequência desse processo (WIT, 2009). A separação maternal é um fator que pode provocar o abuso de substâncias, tais como o etanol, e talvez a impulsividade nesses animais seja um fator que contribui para isso.

1.2.3. Separação maternal x Consumo de etanol

Diversos estudos encontrados na literatura demonstram que diferentes protocolos de separação maternal são capazes de provocar um aumento do consumo de etanol, corroborando a ideia de que eventos traumáticos durante o desenvolvimento podem ser desencadeadores do abuso de substâncias (para revisão ver MOFFET et al., 2007; NYLANDER & ROMAN, 2013).

Hout e colaboradores (2001) compararam animais em três diferentes condições: 1) ratos submetidos à separação maternal por 15 minutos dos dias pós-natal 2 ao 14 (SM15), 2) ratos submetidos a 180 minutos de separação maternal diária pelo mesmo período (SM180), e 3) ratos submetidos apenas a condições padrão de manutenção (AFR). Na idade adulta, os ratos tinham acesso a uma solução 8 % de etanol em 2,5 % de sacarose e outra com apenas 2,5 % de sacarose. Os resultados mostraram uma redução na ingestão de sacarose e um aumento da ingestão de etanol em ratos SM180 em comparação aos SM15 e AFR, e não foram encontradas diferenças entre SM15 e AFR.

A preferência por etanol em animais submetidos à separação maternal parece ser dependente da concentração da solução que é oferecida ao animal. Em um estudo, camundongos submetidos à separação, puderam escolher entre 3 garrafas diferentes, uma com sacarina 0.05%, outra com etanol 6% e a última com etanol 10%. Os animais separados apresentaram um aumento da ingestão de etanol somente na solução com maior concentração de etanol (CRUZ et al., 2008).

Dados obtidos recentemente em nosso laboratório confirmaram a preferência pelo etanol provocada pela separação maternal, uma vez que

animais submetidos a esse procedimento ingeriram o dobro de solução de etanol comparado aos animais controle (Ribeiro, L.B., dados não publicados).

Mesmo antes da vida adulta, o estresse no período perinatal pode ser um fator determinante para o consumo de etanol. García-Gutiérrez e colaboradores (2016) encontraram que animais adolescentes, submetidos à separação materna, tiveram um aumento do consumo de etanol e da motivação para beber num teste de autoadministração de etanol.

Quando associados, a separação materna e o etanol podem causar diversas alterações comportamentais em modelos experimentais. A SM parece estar associada a uma facilitação do condicionamento aversivo em resposta à administração de etanol (PAUTASSI *et al.*, 2012). Além disso, 3 horas diárias de separação materna pelos primeiros 14 dias após o nascimento levam à sensibilização do efeito provocado pelo etanol sobre a atividade locomotora (FERNÁNDEZ *et al.*, 2014).

Oreland *et al.* (2011) encontraram uma redução da concentração de serotonina na amígdala de animais submetidos à separação materna, realizada por 360 minutos diários durante os 21 primeiros dias de vida. Já animais que foram submetidos à separação materna e posteriormente, na vida adulta, expostos a um consumo voluntário de etanol por 10 dias, tiveram um aumento na concentração de serotonina nessa mesma estrutura, efeito esse que não foi encontrado em animais controle. Esses dados indicam que o consumo de etanol pode provocar efeitos diferentes em animais submetidos à separação materna.

Um grande número de trabalhos, encontrados na literatura, demonstram que eventos traumáticos durante o período perinatal podem contribuir para a elevação do consumo de etanol em animais adultos e adolescentes, um fator que é preocupante devido aos problemas causados pelo consumo dessa droga.

1.3. Etanol

Desde o início da história da humanidade, existem relatos do consumo de etanol, sendo que esse tem papel importante em diversas culturas, em rituais religiosos, comemorações, na culinária, como matéria-prima para perfumes e combustíveis. Devido a ao seu histórico cultural de uso, o etanol é uma droga bastante aceita pela sociedade, o que facilita seu uso (GIGLIOTTI & BESSA, 2014).

Embora seja uma droga bem aceita pela sociedade, o consumo abusivo de etanol tem sido relatado como um problema social crescente. A Organização Mundial de Saúde, num relatório publicado sobre o consumo de etanol, atribui ao consumo dessa droga cerca de 3,3 milhões de mortes em todo mundo no ano de 2010, o equivalente a aproximadamente 5,9% de todas as mortes mundiais do ano (WHO, 2014). Além das mortes, o consumo de álcool contribui para o crescimento de gastos com internação hospitalar e tratamento médico, elevação dos índices de acidentes de trânsito, violência urbana e mortes prematuras (UNODC, 2010; CARLINI-COTRIM et al., 2000).

Além dos prejuízos coletivos causados pelo uso de etanol, o mesmo também acarreta diversos problemas individuais. O consumo de crônico de etanol está associado com um aumento da incidência de uma variedade de doenças, incluindo a degeneração do sistema nervoso central, já que encéfalo é um dos principais alvos das ações tóxicas do etanol. Em etilistas crônicos, alguns dos danos cerebrais relatados são a atrofia cerebral e do cerebelo, bem como o comprometimento da função dos neurônios no hipocampo e no córtex pré-frontal (HARPER, 1998; KRUMAN et al., 2012).

1.3.1. Etanol e Neurotransmissão

Um dos principais sistemas neurotransmissores afetados pelo etanol é o sistema gabaérgico. O GABA (ácido gama-aminobutírico) é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central, suas principais ações são via receptores do tipo GABA_A que são associadas a canais de cloro, e a sua abertura promove uma hiperpolarização neuronal (SILVA, 2010). O etanol potencializa o fluxo de cloro mediado por esses receptores, facilitando a inibição

gabaérgica. A administração crônica de etanol altera a expressão dos mRNAs das subunidades do receptor GABA_A no córtex cerebral, hipocampo e VTA (área tegmentar ventral) (MORROW et al., 1990; FADDA & ROSSETTI, 1998).

Outro sistema neurotransmissor afetado pelo etanol é o glutamatérgico. O glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central, e as ações do etanol nesse sistema estão ligadas aos receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Os receptores NMDA são associados a canais de íons permeáveis ao cálcio, ao sódio e ao potássio (SILVA, 2010). O tratamento crônico com etanol, principalmente em doses intoxicantes, leva a um bloqueio crônico dos receptores NMDA. Esse bloqueio leva a respostas neuroadaptativas, como a regulação positiva do receptor NMDA, aumentam a expressão gênica das subunidades desse receptor e aumentam sua função (FADDA & ROSSETTI, 1998).

O sistema dopaminérgico também é afetado pelas ações do etanol. De um modo geral, as drogas de abuso exercem ações em sinapses dopaminérgicas, e o etanol aumenta a liberação de dopamina pelos neurônios VTA e eleva concentrações DA (dopamina) extracelular no NAc (núcleo accumbens) (WEISS & PORRINO, 2002). A exposição crônica ao etanol leva a alterações adaptativas na função dopaminérgica na via nigroestriatal, e ocorre uma redução da atividade dos neurônios dopaminérgicos do VTA e dos níveis de dopamina no NAc (DIANA et al., 1992; WEISS et al., 1996). Dessa forma, após a exposição crônica, ocorre uma hipofunção dopaminérgica na via nigroestriatal, sendo essa condição importante para a manutenção da dependência, através da promoção da ingestão de etanol para compensar a sua queda da liberação de dopamina, motivando sua ingestão (WEISS & PORRINO, 2002).

Outros sistemas neurotransmissores também são afetados pelas ações do etanol, como o colinérgico, serotoninérgico e endocanabinóide (ERDOZAIN & CALLADO, 2014), que será discutido adiante, e diversos mecanismos têm sido propostos para explicar os danos encefálicos relacionados com a toxicidade do etanol.

1.3.2. Etanol e danos neurais

Um dos mecanismos de toxicidade do etanol é a participação de receptores de glutamato do tipo NMDA. A administração do etanol inibe os receptores NMDA, e a exposição contínua causa uma regulação adaptativa desses receptores, tornando-os mais sensíveis a ação do etanol, que pode aumentar a vulnerabilidade a excitotoxicidade glutamatergica (KRYSTAL et al., 2003).

Outro mecanismo de toxicidade do etanol é o aumento do estresse oxidativo (MONTOLIU et al., 1995). O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a capacidade antioxidante do organismo (BARBOSA et al., 2010). A ingestão excessiva de etanol é capaz de provocar um aumento das espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lipídica, e esses dois fatores contribuem para os danos que o etanol pode causar no sistema nervoso central (MONTOLIU et al., 1995; DE LA MONTE et al., 2009).

Fowler e colaboradores (2014) encontraram um aumento significativo de neurônios que sofreram apoptose e com lesões oxidativas no DNA no córtex pré-frontal de animais após a exposição crônica ao etanol. Eles sugeriram que os danos no córtex poderiam levar à perda da função executiva e participar dos mecanismos da adição ao etanol.

Muitos dos efeitos do etanol, principalmente em relação à manutenção do comportamento de busca pela droga, estão relacionados com as alterações plásticas induzidas por essa droga no SNC (NESTLER, 2001).

1.3.3. Consumo de etanol e Δ FosB

A adição a drogas como o etanol induz no organismo, especialmente no sistema nervoso central, uma série de alterações plásticas, tais como mudanças morfológicas e moleculares. Essas mudanças são acompanhadas da regulação, aumento ou redução, da expressão de alguns genes que têm sido associados como resultantes de efeitos do uso prolongado das drogas de abuso (NESTLER, 2001). Entre esses genes, os mais importantes incluem CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc), Δ FosB (um fator de transcrição da família Fos), NFkB (factor nuclear kB), MEF2 (fator de reforço de miócitos-2), e receptores de glicocorticoides (NESTLER, 2013). Dentre eles, os fatores de

transcrição mais estudados em modelos de dependência são o CREB e o Δ FosB, que serão abordados nessa revisão.

O CREB é um fator transcricional que é ativado pelo AMPc, Ca^{2+} e pela ação de fatores de crescimento (BARROTI et al., 2002). Drogas de abuso podem ativar o CREB em regiões do cérebro que são importante para o processo de adição, principalmente no núcleo accumbens (SHAW-LUTCHMAN et al., 2002). Nessa região o CREB têm função facilitadora de processos importantes como os de tolerância e dependência (BARROTI et al., 2002). Suas ações parecem ser dependentes de receptores dopaminérgicos, especialmente D1 e D2 (SHAW-LUTCHMAN et al., 2003).

Por sua vez, o Δ FosB é um produto truncado do gene FosB, que apresenta bastante estabilidade e acumula gradualmente ao longo de exposições repetidas a drogas de abuso, e dentre todas as proteínas expressas do gene FosB é a mais predominante expressa (HOPE et al., 1994). As ações do Δ FosB no núcleo accumbens provocam um aumento da sensibilidade à droga, assim como um reforço positivo que promove a sua auto-administração (NESTLER et al., 2001). No córtex, a indução de Δ FosB no córtex orbito-frontal pode ser responsável pelo aumento da vulnerabilidade ao abuso de drogas (WINSTANLEY et al., 2009).

O etanol, assim como as demais drogas de abuso, também provoca um aumento da expressão desse marcador. Um estudo demonstrou que após 17 dias de etanol (concentração sanguínea mantida em aproximadamente 200 mg/dL), há um aumento marcante do Δ FosB em áreas como o córtex pré-frontal e o estriado, acompanhado de um aumento de menor intensidade no hipocampo (PERROTTI et al., 2008).

As drogas de abuso, de um modo geral provocam um aumento da expressão de Δ FosB no NAc mais exacerbada em animais adolescentes que em adultos, indicando que esse seja um período de maior vulnerabilidade à adição (EHRLICH et al., 2002).

1.3.4. Consumo de etanol em *binge* na adolescência

O uso do etanol, apresenta diferentes padrões de consumo, que diferem entre si, de acordo com a frequência de uso e a quantidade ingerida. Esses padrões podem ser classificados como o uso pesado, que é associado a ao etilismo, uso moderado, decorrente principalmente de situações sociais e um e o consumo em *binge* (NIAAA, 2016). O termo “consumo de álcool em *binge*” é empregado para definir o “uso pesado episódico de álcool”, ou seja, consumir em um curto espaço de tempo um volume excessivo de etanol (KUNTSCHE et al., 2004). Esse consumo é caracterizado pela ingestão de, no mínimo, cinco doses de bebida alcoólica para os homens e quatro para as mulheres, em uma só ocasião (BREWER & SWAHN, 2005). Esse padrão de consumo é muito frequente entre jovens e adolescentes em todo o mundo (WHO, 2014).

Essa forma de consumo está frequentemente associada a uma série de problemas físicos, sociais e mentais (NAIMI et al., 2003). Durante o consumo de álcool em *binge* ocorrem importantes modificações neurofisiológicas, como desinibição comportamental, comprometimento cognitivo, diminuição da atenção, piora da capacidade de julgamento, além de alteração da coordenação motora (LARANJEIRA et al., 2007).

A adolescência é um período de alta impulsividade e comportamentos de risco, tornando os indivíduos mais propensos ao uso drogas (ARNETT, 1992; STEINBERG, 2008; FUHRMANN et al., 2015). Além disso, é uma fase crítica para o desenvolvimento encefálico, na qual ocorre maturação e reorganização neuronal, alterações na neurotransmissão, plasticidade e remodelação sináptica. Tanto em humanos quanto nos outros animais, a exposição ao etanol durante a adolescência prejudica o desenvolvimento e a maturação do cérebro, causando danos ao mesmo, além de alterações estruturais e déficits cognitivos (GUERRI & PASCUAL, 2010).

Os déficits cognitivos provocados pelo etanol em animais adolescentes parecem ser mais graves do que em adultos, uma vez que o mesmo leva a prejuízos de memória e de funções cerebrais relativas a ela, como a LTP, maiores que em adultos. O maior dano em animais adolescentes provavelmente decorre de uma maior vulnerabilidade no encéfalo em desenvolvimento (GUERRI & PASCUAL, 2009).

Ratos submetidos a repetidos episódios de consumo de álcool em *binge* na adolescência (entre os DPN 30 a 45) apresentam morte neuronal em estruturas como hipocampo e córtex pré-frontal, o que leva esses animais a apresentarem déficits comportamentais e cognitivos na fase adulta (PASCUAL et al., 2007). Além disso, o consumo de etanol em *binge*, numa dose de 5 g/kg dos dias pós-natal 28 a 37, é capaz de provocar redução geral encefálica de receptores dopaminérgicos, gabaérgicos, glicinérgicos e de neuropeptídios, como o neuropeptídeo Y, sendo essas alterações duradouras (COLEMAN JR et al., 2014).

Os diversos efeitos comportamentais gerados pelo consumo de etanol são atribuídos à capacidade dessa droga de alterar diferentes sistemas cerebrais, como o dopaminérgico, glutamatérgico, gabaérgicos, colinérgico e serotoninérgico (para uma revisão ver ERDOZAIN & CALLADO, 2014). Além desses sistemas, o álcool pode interagir e provocar modificações no sistema endocanabinóide (PAVA & WOODWARD, 2012).

1.4. Sistema endocanabinóide

O sistema endocanabinóide é um sistema formado pelos receptores CB1 e CB2 e substâncias endógenas capazes de interagir com esses receptores (HOWLETT *et al.*, 2002). Os dois principais endocanabinóides são a Anandamida (AEA) e 2- araquidonoil-glicerol (2-AG). Essas substâncias não são armazenadas em vesículas, sendo produzidos sob demanda a partir de fosfolípidios de membrana. A AEA é produzida pela ação da N-acetiltransferase (NAT) e da N-acilfosfatidiletanolamina específica fosfolipase D (NAPE-PLD), e o 2-AG é sintetizado por duas reações subsequentes, a primeira catalisada pela fosfolipase C específica (PLC) e em seguida pela enzima diacilglicerol lipase (DAGL). A degradação ocorre por meio da ação das enzimas amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL), respectivamente (MECHOULAM & PARKER, 2013; ULUGÖL, 2014).

Esses neuromoduladores agem por meio de sinalização retrógrada: são produzidos nos neurônios pós-sinápticos e liberados na fenda sináptica, onde agem em receptores pré-sinápticos, por meio de mecanismos de sinalização intracelular, que envolve a redução da concentração de AMPc e a inibição direta de canais de cálcio voltagem-dependente e estimulação de canais de potássio, modulando a liberação de neurotransmissores como GABA e glutamato (KATONA *et al.*, 2006; ULUGÖL, 2014), acetilcolina (KATHMANN *et al.*, 2001) e dopamina (FONSECA *et al.*, 2001).

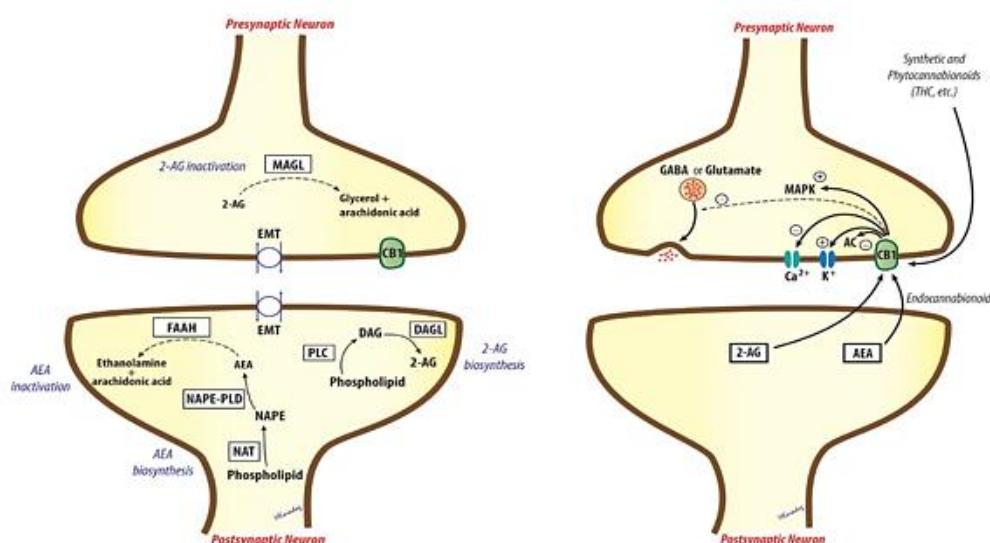


Figura 1: Representação do sistema endocanabinóide. À esquerda estão representados os componentes do sistema endocanabinóide. À direita, o

mecanismo de ação do sistema endocanabinóide. Legenda: 2-AG: Araquidonoil glicerol; AEA: Anandamida; CB1: Receptor canabinoíde 1; FAAH: Amida hidrolase de ácidos graxos; DAG: Diacilglicerol; DAGL: Diacil glicerol lipase; EMT: transportador de membrana para endocanabinóides; MAGL: Monoacil glicerol lipase; NAPE: N-acilfosfatidil -etanolamina; NAPE-PLD: N-acilfosfatidil -etanolamina- fosfolipase D seletiva; NAT: N-acetiltransferase; PLC: fosfolipase C. Retirado de Ulugöl, A. (2014).

O sistema endocanabinóide encontra-se amplamente distribuído pelo cérebro, sendo mais proeminente em algumas áreas como o hipocampo, o córtex, o cerebelo e os núcleos da base (FINE & ROSENFELD, 2013). Entre suas ações, esse sistema tem participação importante nos processos cognitivos, aprendizado, memória, processos de recompensa e aspectos motivacionais (MECHOULAM & PARKER, 2013).

As drogas de abuso, dentre elas o etanol, podem modular o sistema endocanabinóide através do aumento ou redução da atividade dos receptores canabinóides, assim como modulando a atividades das enzimas ligadas a esse sistema. Em geral, o uso crônico de etanol provoca um aumento dos níveis de endocanabinóides, assim como uma redução da atividade do receptor CB1 e da FAAH, em diversas regiões encefálicas, como o córtex pré-frontal, núcleo accumbens, hipocampo e amígdala (para uma revisão ver PAVA & WOODWARD, 2012).

Poucos estudos relatam os efeitos provocados pela separação maternal no sistema endocanabinóide. A privação maternal por 24 horas, no 9º dia de vida, provocou nos ratos quando adultos, um aumento da quantidade de 2-AG (LIORENTE *et al.*, 2008), modificação da expressão de receptores CB1 e CB2 (SÚARES *et al.*, 2009), além da redução da expressão proteica e de RNAm da enzima MAGL (SÚARES *et al.*, 2010) no hipocampo; o que indicaria um aumento dos endocanabinóides nessa estrutura provocado pela separação maternal. A separação maternal pode levar também a diminuição de receptores CB1 no córtex pré-frontal e o aumento desses receptores no estriado ventral (ROMANO-LÓPEZ *et al.*, 2012).

No hipocampo, o sistema endocanabinóide exerce papel importante na regulação de neurotransmissores como o GABA, acetilcolina e glutamato. Além

disso, o receptor CB1 possui papel importante nos processos de codificação, consolidação e reconsolidação da memória; sendo que o uso de agonistas desse receptor pode prejudicar o processo de aprendizado em diferentes testes comportamentais (para uma revisão ver, DAVIES et al.,2002).

Da mesma forma, o sistema endocanabinóide também possui função importante na regulação de liberação de neurotransmissores no córtex pré-frontal, e o estímulo de receptores CB1 nessa área pode levar a um prejuízo da atenção e controle comportamental (EGERTON et al., 2006). Entre as funções que podem ser prejudicadas estão o alerta, a atenção, a memória de trabalho e de curta duração, o controle de ações e o sistema de recompensa, todas elas fortemente influenciadas pela neurotransmissão dopaminérgica (YANG & RAINE, 2009)

1.5. Sistema dopaminérgico

A dopamina (DA) é um neurotransmissor pertencente à família das catecolaminas, e é sintetizada no neurônio pré-sináptico a partir do aminoácido tirosina. A formação desse neurotransmissor envolve duas etapas: a primeira consiste na hidroxilação do anel aromático do aminoácido, catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), formando o precursor L-DOPA (L-3,4 diidroxifenilalanina), e a segunda reação é catalisada pela enzima aminoácido aromático decarboxilase, que remove o grupo carboxil da L-DOPA, produzindo dopamina que finaliza a síntese (COOPER et al., 2003; STANDAERT & GALANTER, 2009).

A DA é armazenada em vesículas no citoplasma dos neurônios e é liberada em resposta à elevação na concentração de cálcio intracelular. As ações da dopamina são mediadas pela ligação a cinco subtipos de receptores, todos acoplados à proteína G. Os receptores são classificados em dois grupos – tipo-D1 e tipo-D2 – de acordo com suas características bioquímicas e funcionais (STANDAERT & GALANTER, 2009).

O término da transmissão dopaminérgica ocorre, principalmente, através da recaptação do neurotransmissor pelo transportador de dopamina (DAT). A DA pode ser rearmazenada nas vesículas para posterior reutilização ou ser

metabolizada. A metabolização pode ocorrer dentro do próprio neurônio, pela ação da enzima monoaminoxidase (MAO), levando a formação do ácido diidroxifenilacético (DOPAC) ou pela ação sequencial das enzimas catecol-Ometiltransferase (COMT) e MAO, originando ácido homovanílico (HVA) (COOPER et al., 2003).

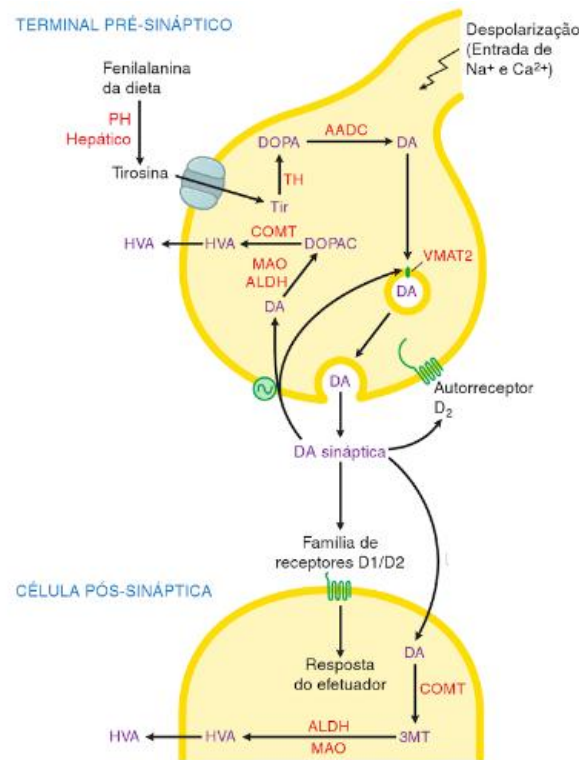


Figura 2. Sinapse dopaminérgica. Legenda: 3-MT: 3-metoxitiramina; COMT: Catecol-Ometiltransferase; DAT: Transportador de dopamina; D1: receptor D1; D2: receptor D2; G: proteína G; HVA: Ácido homovanílico; MAO-B: Monoaminoxidase-B; TH: tirosina hidroxilase (BRUNTON, 2012).

Os neurônios que contêm dopamina têm localização anatomo-funcional especialmente nas vias: nigroestriatal, mesolímbica e mesocortical. As vias mesolímbica e mesocortical têm seus corpos localizados na área tegmentar ventral, e se projetam para o sistema límbico e córtex, respectivamente. A via nigroestriatal, que se relaciona com a função motora, se projeta da substância negra para o estriado dorsal e núcleos da base. Também existem neurônios dopaminérgicos na via túberoinfundibular no hipotálamo, que tem relação com funções neuroendócrinas (SIEGEL et al., 2005).

O córtex pré-frontal é fundamental para a recompensa, controle e flexibilidade comportamental (RUSHWORTH et al., 2011). Essas funções são moduladas pela liberação de dopamina pelos neurônios da via mesocortical, que se projetam para o córtex medial pré-frontal a partir da área tegmentar ventral levando, por fim, à ativação dos receptores D1 nos neurônios piramidais corticais (ARNSTEN et al., 1997).

Drogas de abuso, como o etanol, são capazes de afetar a liberação de dopamina. Inicialmente, o consumo de etanol aumenta a liberação de dopamina na via mesocorticolímbica (WEISS et al., 1996). O consumo de etanol por ratos adolescentes também é capaz de aumentar a quantidade de dopamina no núcleo accumbens (BADANICH et al., 2007).

Porém, um efeito tardio do etanol, é a redução da neurotransmissão dopaminérgica, como demonstrado por Pascual e colaboradores (2009), que encontraram uma redução dos receptores D1 e D2 no córtex pré-frontal e de D2 no estriado e no hipocampo de animais submetidos ao consumo de etanol na adolescência.

A separação maternal também é capaz de alterar a neurotransmissão dopaminérgica e, conseqüentemente, suas funções. Uma das principais alterações é uma redução da neurotransmissão dopaminérgica provocada pela separação maternal (HEIDBREder et al., 2000; MATTHEWS et al., 2001).

Romano-Lopez e colaboradores (2015) investigaram se o sistema dopaminérgico e endocanabinóide no córtex pré-frontal e no núcleo accumbens estariam alterados em ratos submetidos à separação maternal. Os autores encontraram uma desregulação do sistema dopaminérgico no córtex (aumento dos receptores D2 e D3) e de ambos os sistemas no NAc (aumento de D2 e TH, e redução da FAAH, MAGL e D3). Essas alterações foram atribuídas como sendo possíveis causas para aumento do consumo de etanol em animais submetidos à separação maternal.

Assim, tendo em vista a propensão ao consumo de etanol gerada pela separação maternal, assim como a vulnerabilidade do período de adolescência aos efeitos provocados pelo consumo pesado episódico de etanol, o presente trabalho buscou investigar como a separação maternal e o consumo de etanol

por ratos adolescentes podem influenciar no processo de aprendizado e no comportamento impulsivo. Além disso, visou investigar como esses tratamentos em conjunto podem afetar os sistemas endocanabinóide e dopaminérgico no córtex pré-frontal e hipocampo, podendo assim estabelecer uma possível relação entre as mudanças provocadas nesse sistema com as mudanças comportamentais induzidas pelos tratamentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar a influência do consumo de álcool em binge por ratos adolescentes submetidos à separação maternal sobre o aprendizado e impulsividade, assim como investigar os efeitos desses tratamentos sobre o sistema endocanabinóide, e estabelecer possíveis relações.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar os efeitos da separação maternal e da administração aguda de etanol em binge nas doses 3,0 e 6,0 g/kg sobre o teste de aprendizado no labirinto em T;
- Avaliar os efeitos da separação maternal e administração crônica de etanol em binge nas doses 3,0 e 6,0 g/kg sobre o teste de aprendizado no labirinto em T;
- Avaliar os efeitos da separação maternal e administração crônica de etanol em binge nas doses 3,0 e 6,0 g/kg sobre a tolerância ao atraso na recompensa;
- Avaliar os efeitos da separação maternal e da administração crônica de etanol em binge nas doses 3,0 e 6,0 g/kg sobre a expressão de mRNA de componentes do sistema endocanabinóide: CB1, FAAH, MAGL, NAPE-PLD e DAGL no córtex pré-frontal e no hipocampo;
- Avaliar os efeitos da separação maternal e da administração crônica de etanol em binge nas doses 3,0 e 6,0 g/kg sobre a expressão de mRNA de componentes do sistema dopaminérgico: D1, D2 e TH no córtex pré-frontal;
- Avaliar os efeitos da separação maternal e da administração crônica de etanol em binge nas doses 3,0 e 6,0 g/kg sobre a expressão de mRNA de Δ FosB no córtex pré-frontal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados quarenta ratos Wistar, sendo trinta e três fêmeas nulíparas e sete machos, pesando entre 200-250g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde, e foram mantidos em sala com controle de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12 X 12 h, luzes acesas às 6:00 h). Estes foram alocadas em caixas viveiro (49 cm x 34 cm x 16cm) para o cruzamento, na proporção de 3 a 4 ratas por macho. Após 20 dias de cruzamento as fêmeas gestantes foram retiradas e isoladas em caixas menores (30 cm x 20 cm x 13 cm), nas quais permaneceram até o nascimento da ninhada. No primeiro dia pós-parto foi feita a adequação das ninhadas, que foram padronizadas ao número de 8 filhotes por rata, totalizando aproximadamente 260 animais. Durante o período de amamentação e crescimento os animais foram mantidos nas condições citadas acima. O presente trabalho possui aprovação no comitê de ética da UFES sob número 025/2015.

3.2. Desenho experimental

Após o nascimento e padronização das ninhadas, os animais foram divididos em dois grupos, não separados (controles) e os submetidos à separação maternal. Ao término desse procedimento, os animais de ambos grupos foram randomizados e subdivididos em tratamento com etanol agudo ou crônico. Em ambos os tratamentos foram utilizadas duas doses de etanol: 3g/kg ou 6g/kg, e salina como solução controle. Após os tratamentos com etanol, os animais foram submetidos aos testes comportamentais ou à eutanásia para a obtenção das estruturas encefálicas para a análise da expressão gênica, conforme demonstrado na figura 1.

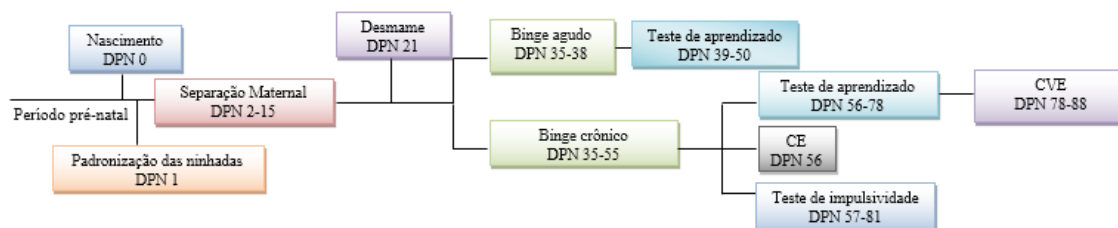


Figura 3. Desenho experimental. Fonte: Imagem própria. Legenda: CVE: Consumo voluntário de etanol, CE: Coleta de estruturas, LCE: Labirinto em cruz elevado, CA: Campo aberto.

3.3. Separação maternal

Após a padronização das ninhadas (DPN 1), estas foram divididas em dois grupos: um grupo de ninhadas submetidas à separação maternal (SM) e o grupo controle. O grupo controle, não separado (NS), permaneceu com as mães até o vigésimo primeiro dia pós-natal (DPN 21), sendo manipulados apenas para a manutenção das caixas. O outro grupo, separados (S), foi submetido ao procedimento de SM, no qual os animais eram separados de suas mães por um período de 3 horas, entre 12 e 16 horas, dos dias DPN 2 ao dia DPN 15. Para tanto, eles foram acomodados individualmente em compartimentos de dimensões: 9,5 cm x 15 cm x 16 cm e levados para outra sala, com temperatura controlada ($35 \pm 2^{\circ}\text{C}$). As mães também foram movidas para outra caixa (30 cm x 20 cm x 13 cm) e transferidas para uma terceira sala. Após o período de separação, os filhotes, assim como as mães retornaram à caixa moradia.



Figura 4. Caixa de separação maternal. Fonte: Arquivo pessoal

3.4. Administração de etanol

Para o consumo de etanol em *binge* (CEB), o etanol (Anidrol ®, 99,5%) foi diluído em solução salina, vol/vol, nas concentrações de 10% e 20%, sendo o volume de administração ajustado para a dose de 3 g/kg e 6 g/kg, respectivamente. Como controle foi utilizada solução salina. A administração da droga foi feita por via Intragástrica (gavagem).

O tratamento agudo foi realizado conforme descrito por Prins *et al.* (2014), com o etanol sendo administrado em uma dose única diária, por 3 dias consecutivos. Por sua vez, o tratamento crônico, conforme metodologia utilizada por Fleming *et al.* (2012), foi realizado com a administração de 10 doses de etanol. Estas doses foram administradas uma vez por dia, em um esquema de dois dias consecutivos intercalados por dois dias sem a ingestão de etanol, para caracterizar o uso episódico do mesmo.

3.5. Concentração sanguínea de etanol

Para a determinação da concentração sanguínea de etanol, 8 animais receberam uma única administração de etanol nas doses 3 g/kg (n= 4 animais) e 6 g/kg (n= 4 animais), e um grupo controle o qual recebeu apenas salina (n= 4 animais). Após uma hora, os mesmos foram decapitados e sangue proveniente do tronco foi coletado em tubos contendo fluoreto de sódio como anticoagulante. A amostra foi armazenada a – 4°C até sua posterior análise, sendo essa realizada por meio de cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (Varian 450-GC/FID). As análises foram realizadas em colaboração com o Departamento Médico Legal da Superintendência de Polícia Técnico-Científica do estado do Espírito Santo.

3.6. Testes comportamentais

3.6.1. Teste de aprendizado

O teste de aprendizado consistiu na avaliação do aprendizado dos animais estimulado por um reforço positivo, conforme descrito por Hagewoud *et al.* (2010). Para tanto, os animais foram submetidos a uma semana de restrição alimentar, durante a qual receberam 80% da ração ingerida habitualmente. O teste foi realizado em um labirinto em “T” feito de acrílico e transparente, e foi dividido em 3 partes: habituação, treinamento e desafio. A habituação foi

realizada em 02 sessões para familiarização dos animais ao aparato. Na sessão 1, um dos braços ficou aberto, e no final do mesmo o animal recebeu uma recompensa (aproximadamente 200 mg de ração Royal Canin Junior ®) enquanto o outro braço permaneceu fechado. Após comer a recompensa o animal foi retirado do braço e, 2 a 3 minutos após foi realizada a segunda sessão, na qual o animal teve acesso somente ao braço fechado inicialmente, recebendo recompensa da mesma forma. Na fase de treinamento os dois braços ficaram abertos, e os animais poderiam escolher livremente em qual dos dois entrar. Porém, somente um dos braços (sempre o mesmo para cada animal durante todo o período de treinamento) tinha recompensa acessível. Para evitar que os animais se orientassem pelo cheiro do alimento, no outro braço foi colocada a mesma quantidade de alimento, porém com acesso impedido por uma tela metálica. Assim que o animal entrava em um lado o outro lado era fechado. Quando o animal optava pelo braço correto, ele podia comer a recompensa para então ser retirado. Caso escolhesse o braço errado, o animal era retirado imediatamente do aparato. Foram realizadas um total de 6 tentativas em cada dia de treino, com intervalo de 2 minutos entre elas, e o aparato foi limpo com etanol a 70% entre uma tentativa e outra. Os treinos foram conduzidos até que os animais atingissem um percentual de acertos entre 85-90%. O desempenho dos animais foi computado para elaboração das curvas de aprendizado. Após atingirem a taxa de aprendizado entre 85-90% foi realizado um desafio para definir qual a estratégia de memória utilizada. Para tanto, o labirinto teve sua posição invertida, de forma que se durante o treino o animal virasse à direita para atingir a recompensa, no teste ele deveria virar à esquerda. Dessa forma, foi possível discriminar o tipo de estratégia de memória o animal usou durante o aprendizado: se espacial (baseada nas dicas espaciais presentes no ambiente, do braço onde estava a recompensa) ou procedural (baseada no procedimento, virar à esquerda ou à direita, para chegar até a recompensa).

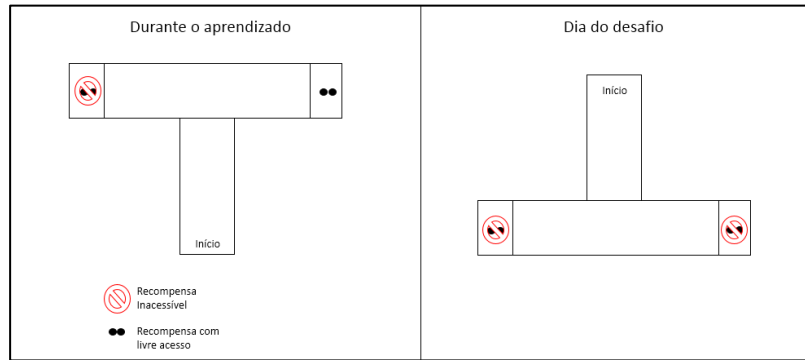


Figura 5. Representação esquemática do labirinto em T. A esquerda, posição do labirinto durante o treinamento. A direita, posição do labirinto no dia do desafio.

3.6.2. Teste de impulsividade

O comportamento impulsivo dos animais foi investigado através do paradigma da tolerância ao atraso da recompensa, que se baseia na preferência entre recompensas “menores e imediatas” ou “maiores e demoradas”, conforme protocolo utilizado por Pandolfo (2010). Para que os animais fossem motivados a buscar a recompensa, eles foram submetidos à restrição alimentar, onde receberam 80% da ração padrão ingerida habitualmente, durante 1 semana. Os experimentos foram realizados em um labirinto em ‘T’ feito de acrílico e transparente. Um dos braços do labirinto foi utilizado como ponto de partida para cada animal, os outros dois braços permitiam ao animal virar à esquerda ou à direita para conseguir a recompensa. Todos os braços possuíam portas tipo guilhotina que podem ser inseridas em fendas situadas na entrada (p1) e no final de cada braço (p2). No final de um dos braços, que foi escolhido de forma aleatória para cada animal, foi colocada a recompensa maior (aproximadamente 500mg de ração Royal Canin Junior®) e no braço oposto a recompensa menor (aproximadamente 100mg). O protocolo experimental foi dividido em três fases: habituação, pré-treinamento e treinamento.

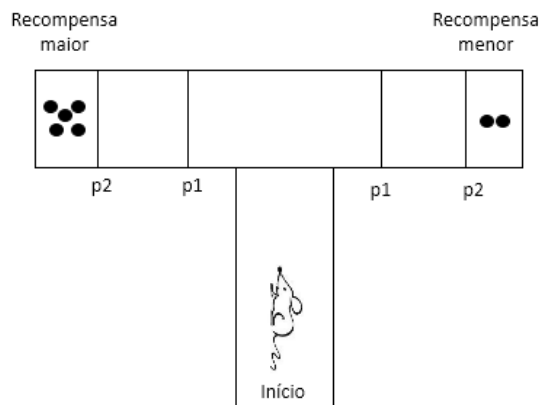


Figura 6. Representação esquemática do Labirinto em T para o teste de impulsividade.

2.6.2.1. Habituação: nessa fase, cada animal podia explorar o labirinto duas vezes, com intervalo de 2 horas entre as explorações, durante 5 minutos, e todas as portas guilhotinas ficavam abertas, para que o animal pudesse obter a recompensa em ambos os braços.

2.6.2.2. Pré-treino: nessa fase, o animal era colocado no labirinto com portas p2 fechadas, e quando ele escolhia um dos braços, a porta p1 era fechada e a porta p2 aberta, revelando a recompensa. O animal era removido do aparato após ter consumido completamente a recompensa e retornava a sua caixa moradia para um intervalo de 2-3 minutos. Esse procedimento era repetido cinco vezes e, após o intervalo de uma hora, os animais eram submetidos a mais uma sessão com cinco exposições. Essas duas sessões, com cinco exposições cada, foram executadas durante seis dias, para que todos os animais pudessem aprender a obter a maior recompensa.

2.6.2.3. Treino: quando o animal escolhia o braço da recompensa maior, a porta p1 foi fechada, confinando-o entre as portas p1 e p2 por 15 segundos antes ter acesso à recompensa. Por outro lado, quando a escolha do animal era pelo braço com recompensa menor não havia nenhum atraso na entrega da comida. A impulsividade foi então medida como a preferência do animal em escolher o braço com a recompensa menor e imediata em detrimento da recompensa maior, porém com um atraso para recebê-la.

3.6.3. Consumo voluntário de etanol

O teste foi realizado conforme metodologia descrita por Huot *et al.* (2001), e teve por objetivo avaliar se a separação maternal e o consumo de etanol em *binge* na adolescência seriam capazes de aumentar o consumo voluntário de etanol na vida adulta.

Para tanto, os animais foram alojados individualmente, sendo expostos simultaneamente a uma solução de sacarose 2,5% (solução controle) ou uma solução de 8% de etanol em sacarose 2,5% (solução etanol). A sacarose foi adicionada à solução de etanol para aumentar a palatabilidade da mesma. A exposição às soluções ocorreu em três períodos de 24 horas, intercalados por períodos de 72 horas, e a posição das garrafas foi alternada de um período para outro. A quantidade consumida de ambas as soluções foi aferida após cada um dos três períodos de 24 horas para estimativa de consumo. Os dados foram expressos como percentual de etanol consumido em relação ao total de solução, conforme expresso na formula abaixo:

$$\% \text{ EtOH} = \frac{\text{total de etanol em gramas de etanol consumido (soma dos 3 períodos de exposição)}}{\text{total de solução consumida (soma das soluções controle e etanol nos 3 períodos)}} * 100$$

3.7. Eutanásia e obtenção das amostras

Decorridas 24 horas da administração da última dose de etanol, os animais foram eutanasiados por decapitação, os encéfalos foram retirados e foram dissecados o córtex pré-frontal e hipocampo, segundo coordenadas descritas por Paxinos e Watson (1986). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

3.8. Análise da expressão gênica

3.8.1. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando TRIzol® Reagent (Life Technologies, USA) seguindo recomendações do fabricante. Os tecidos foram solubilizados em trizol (1mL/100mg de tecido) com o uso de um homogeneizador e em seguida, foi centrifugado a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido

e a ele foi adicionado clorofórmio (200µL/1 mL de trizol), o tubo foi agitado por 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por 3 minutos. O tubo foi centrifugado a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e a esta adicionou-se isopropanol (500µL/1 mL de trizol), para a precipitação do RNA. O tubo foi centrifugado a 12.000xg por 10 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado com etanol 75% (1mL/1 mL de trizol) e centrifugado a 7500xg por 5 minutos a 4°C. O RNA foi ressuscitado em 50 µL de água deionizada, previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, USA) e por meio de eletroforese em gel de agarose, respectivamente.

3.8.2. Eletrofose em gel de agarose

A qualidade do RNA foi analisada através de uma corrida com gel de agarose. O gel foi preparado a 1% em TAE (Tris-ácido acético EDTA), e a este foi adicionado 5 µL de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA). As amostras foram preparadas utilizando 1 µL de RNA, 2 µL de Loading Buffer e 9 µL de água DEPC, e foram aplicadas no gel. A corrida foi realizada a 80 V por 30 minutos, utilizando o TAE como tampão de corrida. As bandas foram observadas em um transiluminador UV.

3.8.3. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Biorad, CA, USA) usando o equipamento S1000 Thermal Cycler (Biorad, CA, USA). As amostras foram submetidas ao seguinte protocolo de reação: 25°C por 5 minutos (anelamento), 42°C por 30 minutos (transcrição reversa) e 85°C por 5 minutos (inativação da transcriptase reversa).

3.8.4. Reação de PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real realizada utilizando o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) e o iQ SYBR Green Supermix (Biorad, CA, USA). As reações foram preparadas com um volume total de 10µL, contendo 5 µL de SYBR Green Supermix 2x, 2,24 µL de água DEPC, 0,88 µL de cada iniciador a 10µM e 1,0 µL de cDNA. As amostras foram preparadas em triplicata

e submetidas a desnaturação inicial (95°C por 3 minutos), logo após foram realizados 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos a 60°C (anelamento e amplificação). Ao final, foi realizada a curva de melting dos produtos amplificados para confirmar a especificidade da reação, esta foi obtida variando a temperatura das amostras de 55 a 95°C, elevando-se a temperatura em 0,5°C a cada 5 segundos. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando o gene da ciclofilina como normalizador. Os primers foram desenhados utilizando o software PRIMER BLAST. Os genes assim como os primers utilizados estão descritos na tabela 1.

TABELA 1 Sequências de iniciadores utilizadas por gene

mRNA	Gene	Sequência	TM °C
Ciclofilina	Cypa	F-5'-TGGCAAGCATGTTGGGTCTTTGGGAG-3'	62
		R-5'-GGTGATCTTCTTGCTGGTCTGCCATTC-3'	60
Receptor CB1	Cnr1	F-5'-GTTGCTTTGCACTGGCCTTC-3'	62
		R-5'-CACTGCTTCGACGTCTGACT-3'	62
FAAH	Faah	F-5'-ACGATGCCAGATGGAATC-3'	62
		R-5'-CACAGGCAGACCGACACTAT-3'	62
MAGL	Mgll	F-5'-ATCATCCCCGAGTCAGGACA-3'	62
		R-5'-TCCTGTGAGACACCCACGTA-3'	62
n-PLD	Napepld	F-5'-CCAAGAGATCCGTGGCGATT-3'	62
		R-5'-ACCGGCGGCTCTAAGTAATG-3'	62
DAGL	Dagl α	F-5'-AAGCACCAAGCCAAATG-3'	60
		R-5'-AGCTCCGACTTGGGGATAC-3'	62
Receptor D1	Drd1	F-5'-CCATCGAGTCCCCTCTTGTG-3'	64
		R-5'-CAGTTCCATCCACGTGTTGC-3'	62
Receptor D2	Drd2	F-5'-TTGACCTTCTTGGGCAC-3'	62
		R-5'-GTAAGAACTGTCGCTCCCTCC-3'	66
Tirosina hidroxilase	Th	F-5'-CAATGACGCCAAGGACAAGC-3'	62
		R-5'-TCAATGGCCAGTGTGTACGG-3'	62
ΔFosB	FosB	F-5'-CGCATCCTCTCACAGAGGTC-3'	64
		R-5'-ATATCGAGGGTAGGGGAGCC-3'	64

3.9. Análise Estatística

Para as comparações entre grupos foi utilizada uma ANOVA de duas vias, tendo como fatores a separação maternal e o consumo de etanol, ou ANOVA de uma via seguida por teste *post-hoc* de Duncan, considerando nível de significância $p < 0,05$.

A análise das curvas de aprendizado e das curvas de preferência (teste de impulsividade) foi realizada por meio de ANOVA de medidas repetidas. Para a obtenção da estratégia de aprendizado utilizada no dia do desafio, foi utilizado o teste de χ^2 .

Para a realização da ANOVA foi utilizado o software IBM SPSS Statistics 22. Para o teste de χ^2 foi utilizado o software R 6.0.

4. RESULTADOS

4.1. Concentração sanguínea de etanol

Após uma única dose de etanol nas doses de 3 g/kg e 6 g/kg, ou salina, foram encontradas respectivamente as concentrações de $15,20^* \pm 2,48$ dg/L e $32,77^{*\#} \pm 9,90$ dg/L e 0,00 dg/L.

*: Diferença significativa do grupo salina, $P < 0,05$. #: Diferença significativa do grupo 3 g/kg, $P < 0,05$.

4.2. Teste de aprendizado no Labirinto em T

4.2.1 Consumo de etanol em *binge* agudo

Para que os grupos obtivessem o percentual de acerto entre 85-90% foram necessários 03 dias treino. Os resultados desse teste estão representados na figura 7.

No consumo de etanol agudo pudemos observar, no primeiro dia de treino, um efeito do consumo de etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,56) = 4,43$, $P < 0,05$], além de uma tendência a interação entre os efeitos da separação e do consumo de etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,56) = 3,73$, $P = 0,06$], porém sem efeito individual da separação maternal [ANOVA de duas vias, $F(1,56) = 2,22$].

A fim de comparar os grupos no primeiro dia, foi realizada uma ANOVA de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Duncan. Os resultados obtidos indicaram um efeito do etanol, sendo esse dependente da dose, uma vez que o efeito só foi observado na maior dose (6,0 g/kg), sendo os grupos NS 6,0 g/kg e S 6,0 g/kg diferentes do grupo controle.

Não houve efeito significativo de nenhuma das variáveis no segundo dia [ANOVA de duas vias, separação maternal: $F(1,56) = 1,31$; consumo de etanol: $F(1,56) = 0,28$; interação: $F(1,56) = 0,58$] e no terceiro dia de treino [ANOVA de duas vias, separação maternal: $F(1,56) = 0,36$; consumo de etanol: $F(1,56) = 0,002$; interação: $F(1,56) = 0,77$].

Pudemos observar, através da ANOVA de medidas repetidas, que houve um efeito dos dias de treinamento sobre o desempenho dos animais no teste [F

(2,106) = 35,621, $P < 0,0001$] indicando que ocorreu aprendizado. Porém não houve interação entre os dias de treinamento e a separação maternal [$F(2,106) = 1,399$], ou o consumo de etanol [$F(2,106) = 1,986$], nem mesmo uma interação entre as 3 variáveis [$F(2,106) = 2,4$].

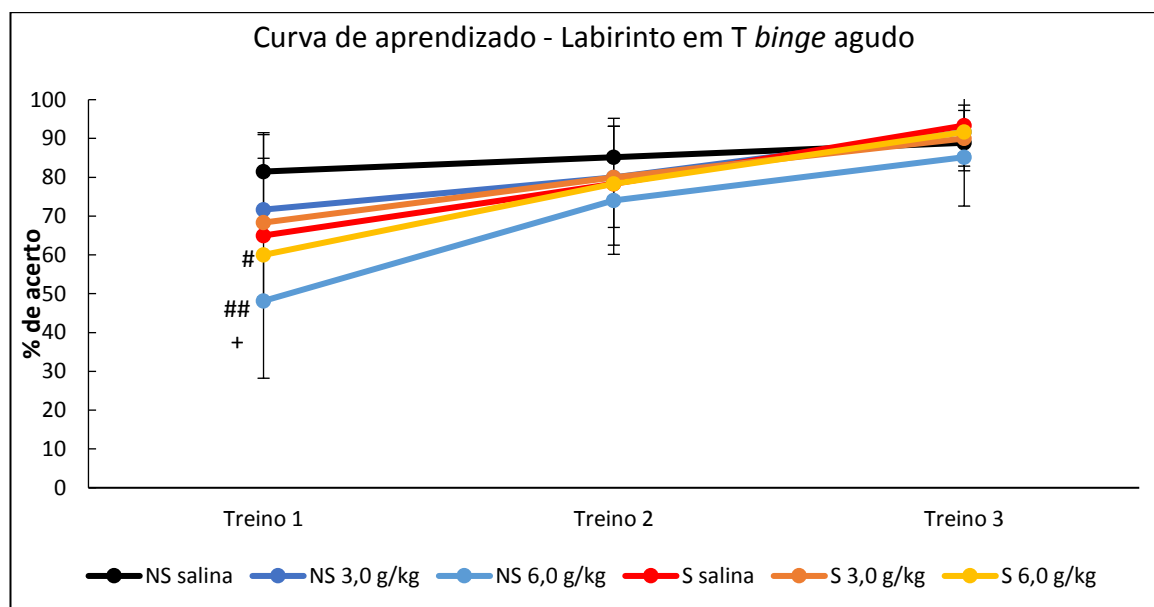


Figura 7. Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre o aprendizado no Labirinto em T. Dados expressos como média+ EPM, N = 8-10 por grupo.

#: Diferente do grupo não separado salina (teste de Duncan, $P < 0,05$).

##: Diferente do grupo não separado salina (teste de Duncan, $P < 0,01$).

+: Diferente do grupo 3,0 g/kg submetido à mesma condição de separação (teste de Duncan, $P < 0,05$).

Na análise do tipo de estratégia utilizada para o aprendizado no dia do desafio, nenhuma correlação foi estabelecida, $X^2 = 8.0918$, $df = 5$, $p = 0.1512$. (Resultados na Tabela 2)

TABELA 2. Efeito do consumo de etanol agudo e da separação maternal sobre a estratégia de aprendizado no Labirinto em T.

Grupo	%Espacial	%Procedural
NS salina	55,6	44,4
NS 3,0 g/kg	20	80
NS 6,0 g/kg	75	25
S salina	70	30
S 3,0 g/kg	70	30
S 6,0 g/kg	60	40

Dados expressos como percentual de animais por grupo que optaram por cada estratégia.

4.2.2 Consumo de etanol em *binge* crônico

Nos animais submetidos ao *binge* crônico, foram necessários 04 dias de treinamento para a obtenção de no mínimo 85-90% de acerto.

Pudemos observar que houve um efeito significativo do consumo de etanol no terceiro dia de treino [ANOVA de duas vias, $F(1,76) = 5,22$, $P < 0,05$]; sem efeito individual da separação maternal [ANOVA de duas vias, $F(1,76) = 0,82$] ou interação entre os efeitos da separação e do consumo de etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,76) = 0,09$].

Novamente para verificar as diferenças específicas entre os grupos no terceiro dia treino, foi realizada uma ANOVA de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Duncan. O tratamento com etanol provocou uma redução no percentual de acerto no grupo S 6,0 g/kg ($78,57 \pm 15,23$) em relação ao S salina ($91,67 \pm 11,24$).

Nos outros dias de treinamento, não foi encontrado efeito de nenhum dos procedimentos, ou mesmo interação entre eles. Treino 01 [ANOVA de duas vias, separação maternal: $F(1,76) = 1,05$; consumo de etanol: $F(1,76) = 0,006$; interação: $F(1,76) = 0,82$]; treino 02 [ANOVA de duas vias, separação maternal: $F(1,76) = 0,81$; CEB: $F(1,56) = 1,17$; interação: $F(1,76) = 1,47$] e treino 04 [ANOVA de duas vias, separação maternal: $F(1,76) = 1,44$; CEB: $F(1,76) = 1,17$; interação: $F(1,76) = 0,04$].

Assim como no consumo de etanol agudo, pudemos observar, através de da ANOVA de medidas repetidas, que houve um efeito do treinamento sobre o desempenho dos animais no teste [ANOVA de medidas repetidas, $F(3,312) = 72,09$, $P < 0,0001$] indicando que ocorreu aprendizado. Também não houve interação entre os dias de treinamento e a separação maternal [ANOVA de medidas repetidas, $F(3,312) = 2,09$], ou o CEB [ANOVA de medidas repetidas, $F(3,312) = 1,04$], nem mesmo uma interação entre as 3 variáveis [ANOVA de medidas repetidas, $F(3,312) = 1,32$]. Os resultados estão representados na figura 8.

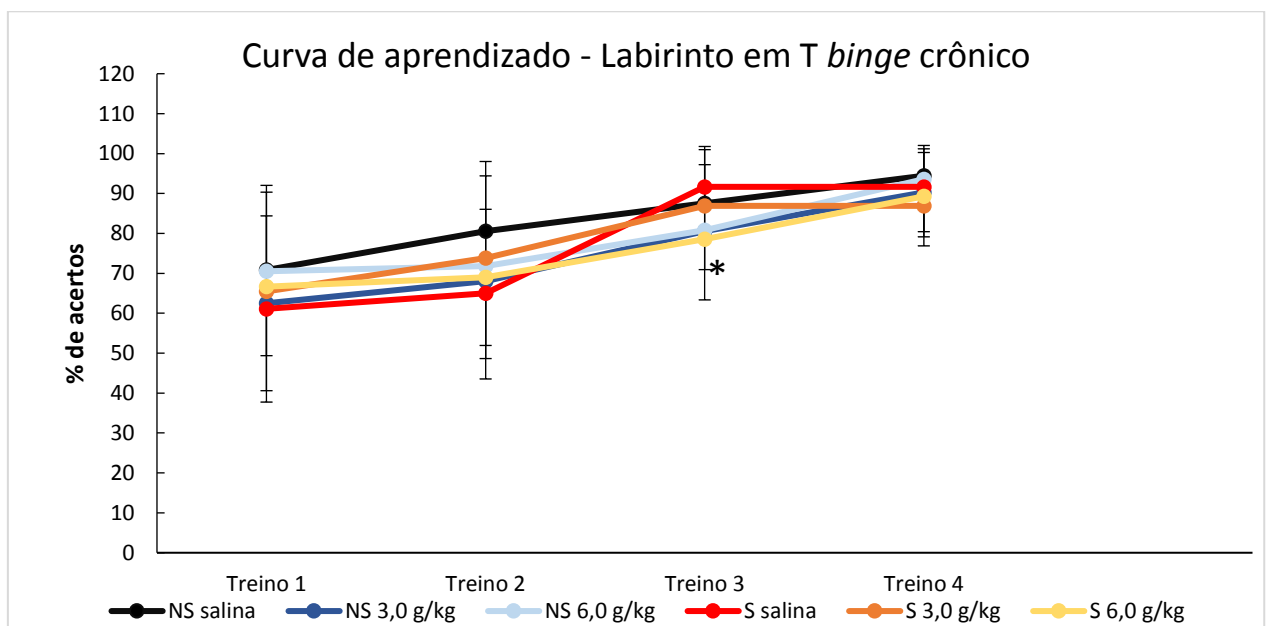


Figura 8. Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre o aprendizado no Labirinto em T. Dados expressos como média+ EPM, N = 12-14 por grupo.

*: Diferente do grupo separado salina (teste de Duncan, $P < 0,05$).

Na análise do tipo de estratégia utilizada para o aprendizado no dia do desafio, nenhuma correlação entre os dados foi estabelecida $X^2 = 4.6361$, $df = 5$, $p = 0.4619$.

TABELA 3. Efeito do consumo de etanol crônico e da separação maternal sobre a estratégia de aprendizado no Labirinto em T.

Grupo	Espacial	Procedural
NS salina	43,3	66,7
NS 3,0 g/kg	58,3	41,7
NS 6,0 g/kg	46,2	53,8
S salina	41,7	58,3
S 3,0 g/kg	50	50
S 6,0 g/kg	71,4	28,6

Dados expressos como percentual de animais por grupo que optaram por cada estratégia.

4.3. Teste de Impulsividade

Conforme previamente descrito, o teste de recompensa baseado no retardo foi realizado apenas nos grupos submetidos ao protocolo de Binge crônico, e contou com quatro fases distintas: habituação, pré-treino, treino e teste.

Pré-treino: Na fase de pré-treino, foram observadas diferenças entre os grupos, no processo de aprendizado do lado com a maior recompensa. Os animais submetidos à separação maternal tiveram um pior desempenho no pré-treino que foi mais evidente no 4º [ANOVA de duas vias, SM: $F(1,73) = 4,44$, $P < 0,05$] e no 5º treino [ANOVA de duas vias, SM: $F(1,73) = 4,44$, $P < 0,01$]; com o grupo S salina obtendo o pior desempenho, sendo diferente do grupo NS salina em ambos os dias. Em relação ao consumo do etanol, não foi observado efeito no 4º [ANOVA de duas vias, $F(1,73) = 2,24$] e no 5º treino [ANOVA de duas vias, $F(1,73) = 1,73$]. No 4º treino foi observada uma tendência à interação entre as duas variáveis [ANOVA de duas vias, $F(1,73) = 3,31$, $P = 0,073$]; porém esse efeito não foi observado no 5º treino [ANOVA de duas vias, $F(1,73) = 1,26$].

Nos demais dias, a ANOVA de duas vias não indicou efeito da separação maternal, do consumo de etanol, nem mesmo interação entre as duas variáveis {1º treino [SM: $F(1,73) = 0,42$, CEB $F(1,73) = 0,23$, SM*CEB: $F(3,73) = 1,26$]; 2º treino [SM: $F(1,73) = 0,21$, CEB: $F(1,73) = 1,22$, SM*CEB: $F(1,73) = 0,11$]; 3º treino [SM: $F(1,73) = 0,37$, CEB: $F(1,73) = 0,68$, SM*CEB: $F(1,73) = 0,15$]; 6º treino [SM: $F(1,73) = 1,29$, CEB: $F(1,73) = 0,65$, SM*CEB: $F(1,73) = 0,68$]}.}

A ANOVA de medidas repetidas apontou efeito dos dias pré-treino, levando a um aumento na preferência pela maior recompensa em detrimento da menor, indicando que ocorreu o aprendizado [F (5,350) = 122,68, $P < 0,0001$]. Nenhum dos outros parâmetros foi capaz de alterar o aprendizado no conjunto dos dias, [CEB: F (5,350) = 1,67; SM: F (5,350) = 1,62]. Não houve interação entre as variáveis [F (5,350) = 1,65]. Os resultados dessa fase do teste estão representados na figura 9.

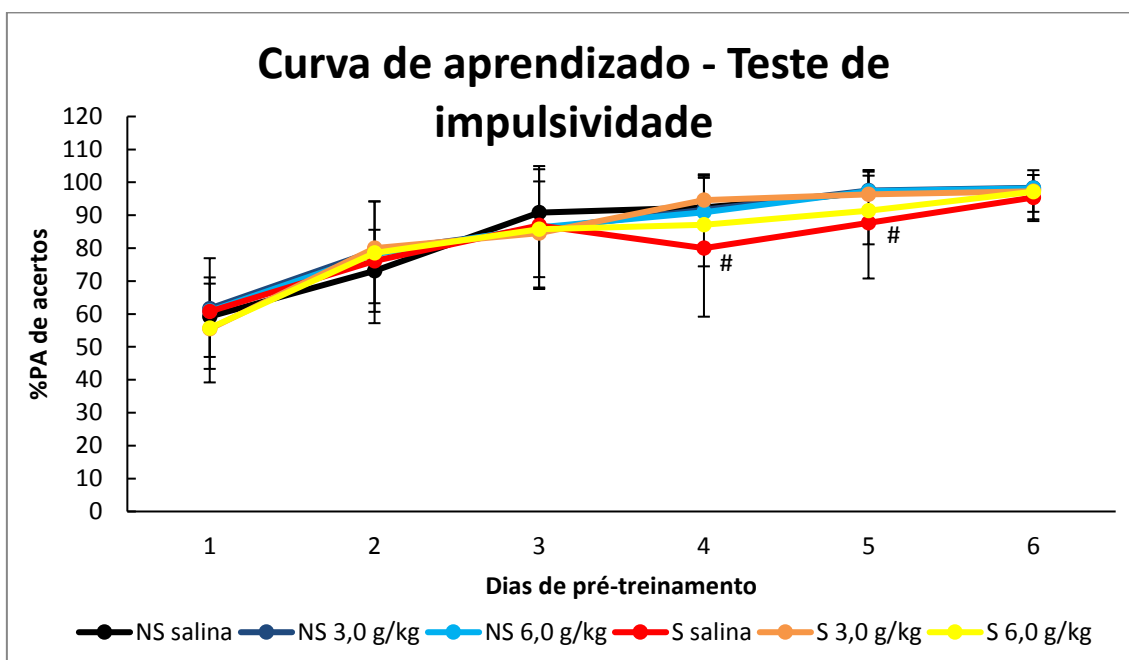


Figura 9. Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre a curva de aprendizado no teste de impulsividade. Dados expressos como média+ EPM, N = 11-14 por grupo. PA – Percentual de acerto.
#: Diferente do grupo não separado salina (teste de Duncan, $P < 0,05$).

Treino: Durante o treino, pudemos observar que todos os animais, independentemente do grupo, tiveram a preferência pelo lado de maior recompensa reduzida em função do atraso introduzido para obtê-la. No último dia a preferência dos animais havia sido reduzida de 97,33% (média geral do pré-treino 06) para 51,35% (média geral do treino 05).

Os dias de treino também influenciaram o comportamento de impulsividade, uma vez que os animais diminuíram o número de escolhas pelo

braço de maior recompensa no decorrer do tempo [ANOVA de medidas repetidas, $F(4,280) = 67,44$, $P < 0,0001$]. Não houve interação entre os tratamentos aplicados e o treinamento no teste de impulsividade {ANOVA de medidas repetidas, CEB [$F(4,280) = 1,30$] e SM [$F(4,280) = 1,87$]}. Houve ainda interação entre as variáveis [$F(4,280) = 2,88$, $P < 0,034$].

Nas análises realizadas para verificar os efeitos dos protocolos aplicados em cada dia, observamos diferenças, nos treinos 01, 02 e 04, conforme descrito abaixo.

No primeiro dia treino pudemos observar um efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,73) = 6,88$, $P = 0,01$], bem como do consumo de etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,73) = 5,01$, $P = 0,03$]. Houve também uma tendência à interação entre as duas variáveis [ANOVA de duas vias, $F(1,73) = 3,59$, $P = 0,06$]. A comparação entre os grupos, através da ANOVA de uma via, indicou que o grupo S salina é diferente dos demais grupos, confirmando o efeito da separação (figura 11).

No treino nº 2, observamos apenas o efeito da separação maternal [ANOVA de duas vias, $F(1,73) = 6,88$, $P = 0,05$], sem efeito do consumo de etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,73) = 0,65$] ou interação entre as duas variáveis [ANOVA de duas vias, $F(1,73) = 2,73$].

No 4º treino, através da ANOVA de duas vias, não observamos efeito do etanol [$F(1,73) = 2,97$, $P = 0,09$], da separação [$F(1,73) = 0,06$], nem interação entre as duas variáveis [$F(1,73) = 2,04$]. Porém, a ANOVA de uma via, nesse treino, indica diferença significativa entre os grupos NS salina e NS 6,0 g/kg.

Os resultados dessa fase do teste estão representados nas figuras 10 (gráfico de linhas) e 11 (gráfico de barras).

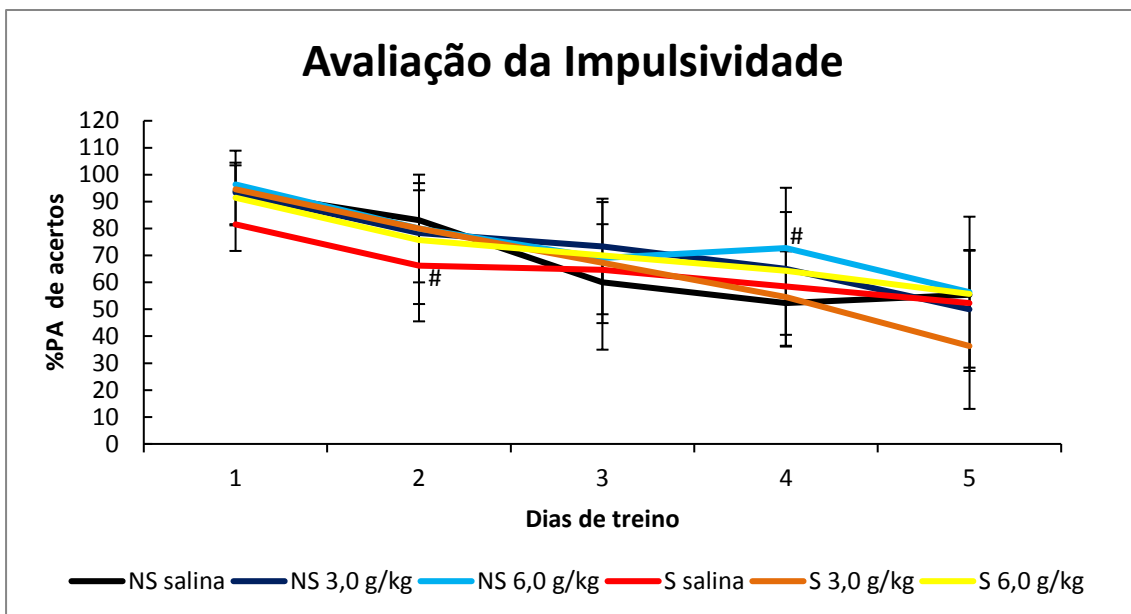


Figura 10. Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre o comportamento de impulsividade. Dados expressos como média, N = 11-14 por grupo. PA – Percentual de acerto.
#: Diferente do grupo não separado salina (teste de Duncan, $P < 0,05$).

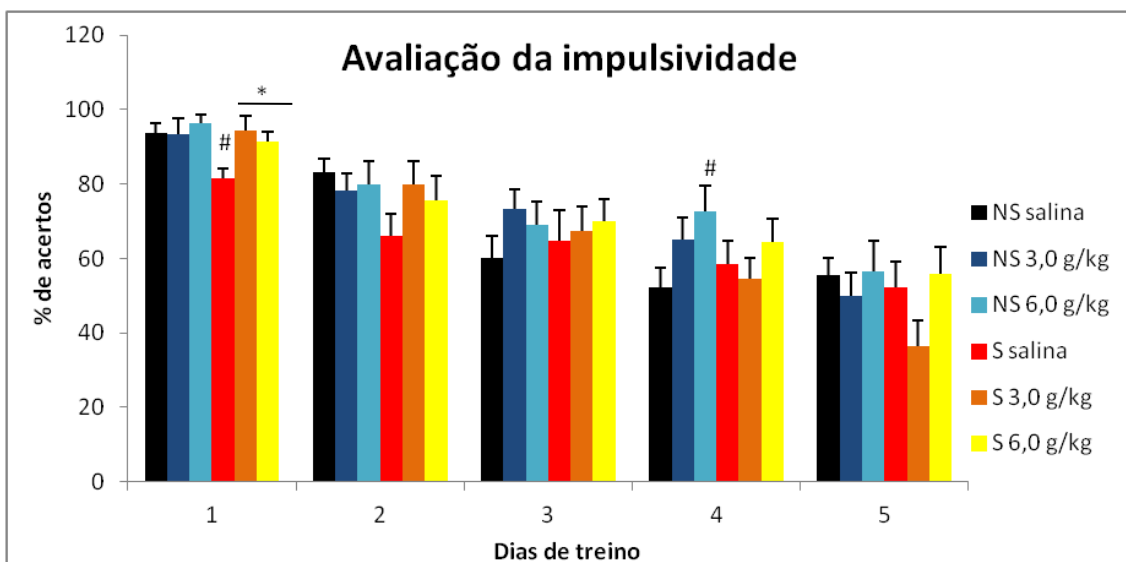


Figura 11. Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre a impulsividade, apresentada no gráfico de barras. Dados expressos como média, N = 11-14 por grupo. PA – Percentual de acerto.
#: Diferente do grupo não separado salina (teste de Duncan, $P < 0,05$).
*: Diferente do grupo separado salina (teste de Duncan, $P < 0,05$).

4.4. Consumo Voluntário de Etanol

No consumo voluntário de etanol, a ANOVA de duas vias indicou um aumento do consumo provocado pela SM [F (1,55) = 8,51, $P=0,005$], bem como efeito significativo do CEB [F (1,55) = 5,21, $P=0,027$], sem interação entre as variáveis [F (1,55) = 2,28].

Os animais submetidos apenas à separação maternal tiveram o maior consumo de voluntário de etanol, sendo este diferente de todos os demais grupos, conforme demonstrado na figura 12.

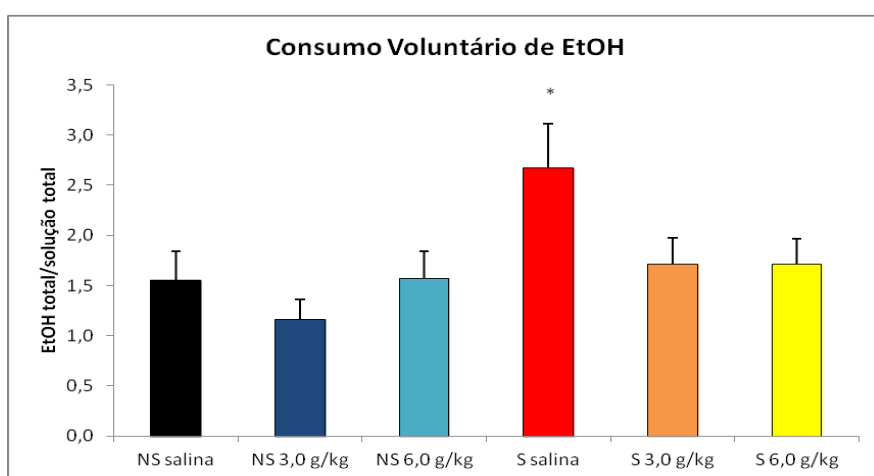


Figura 12. Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre o consumo voluntário de etanol apresentada no gráfico de barras. Dados expressos como média, N = 9-10 por grupo. *: Diferente dos demais grupos. teste de Duncan, $P < 0,05$).

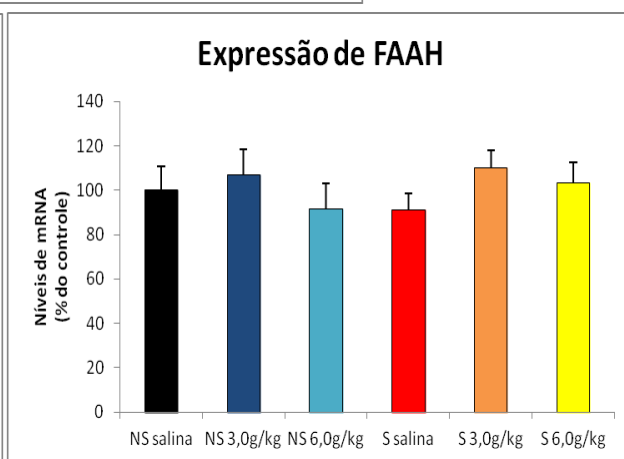
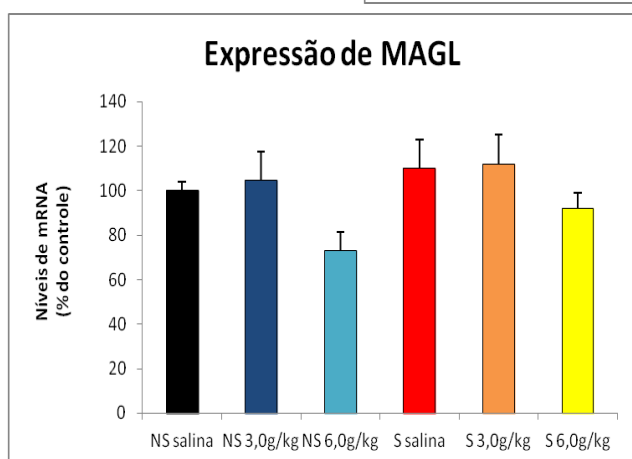
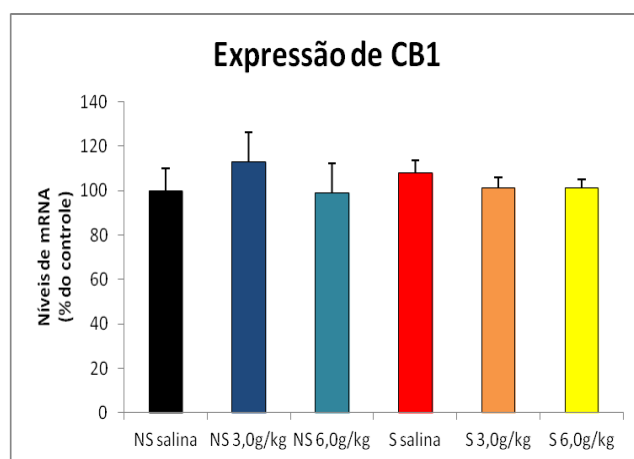
4.5. Expressão de mRNA de componentes do sistema endocanabinóide no córtex pré-frontal

A expressão gênica do receptor CB1 e das enzimas MAGL e FAAH não foi alterada pela separação maternal e pelo consumo de etanol, quando analisados por meio da ANOVA de duas vias - CB1 [SM: F (1,35) = 0,04, CEB: F (1,35) = 0,12, SM*CEB: F (1,35) = 1,07]; MAGL [SM: F (1,35) = 1,39, CEB: F (1,35) = 1,15, SM*CEB: F (1,35) = 0,03]; FAAH [SM: F (1,35) = 0,87, CEB: F (1,35) = 0,23, SM*CEB: F (1,35) = 0,15] (Figura 13).

A expressão gênica da enzima NAPE-PLD foi aumentada pela separação maternal [ANOVA de duas vias, F (1,29) = 5,69, $P=0,025$] e a ANOVA de uma via indicou um efeito significativo no grupo NS 6,0 g/kg e nos grupos S 3,0 g/kg e S 6,0 g/kg; todos com uma maior expressão dessa enzima em relação ao grupo

controle. Não houve interação entre os tratamentos [F (1,29) = 0,73], nem efeito do etanol [F (1,29) = 3,27, $P=0,082$] (Figura 13).

De maneira similar a expressão gênica da enzima DAGL foi aumentada pela separação maternal [ANOVA de duas vias, F (1,29) = 4,78, $P=0,038$] e a ANOVA de uma via indicou um efeito significativo no grupo NS 6,0 g/kg e nos grupos S salina, S 3,0 g/kg e S 6,0 g/kg; todos com uma maior expressão dessa enzima em relação ao grupo controle. Os grupos NS 6,0 g/kg e S 3,0 g/kg também são diferentes do grupo NS 3,0 g/kg. Não houve interação entre os tratamentos [F (1,29) = 1,87], nem efeito do etanol [F (1,29) = 2,97, $P=0,097$] (Figura 13).



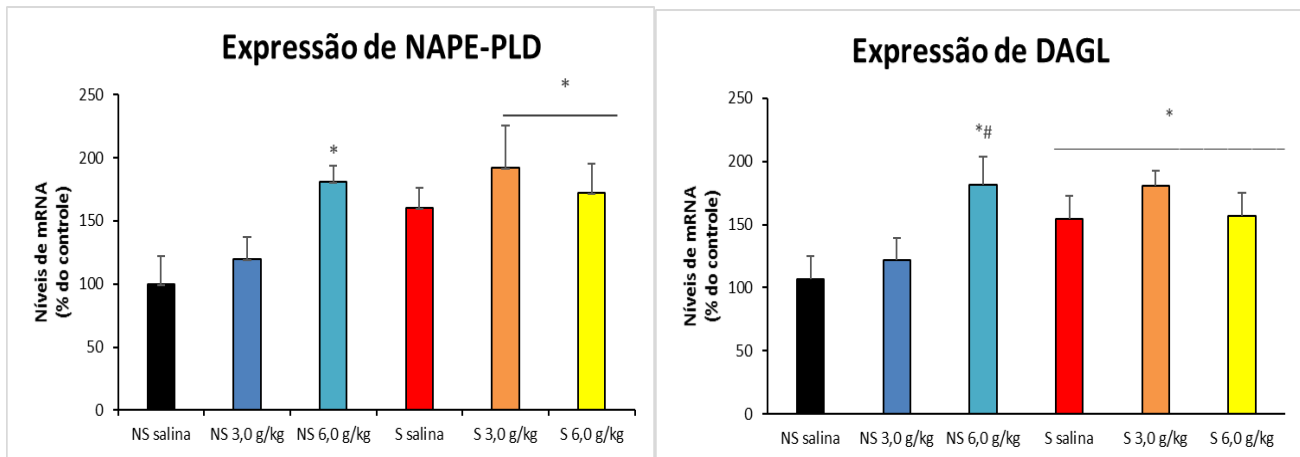


Figura 13. Efeito do consumo de etanol e da separação materna sobre a expressão de mRNA dos componentes do sistema endocanabinóide no córtex pré-frontal. Dados expressos como média + EPM (% do controle). *: Diferente do grupo NS salina, teste de Duncan, $P < 0,05$ # Diferente do grupo NS 3,0 g/kg, teste de Duncan, $P < 0,05$. N = 5-7 por grupo.

4.6. Expressão de mRNA de componentes do sistema dopaminérgico no córtex pré-frontal

Em relação aos componentes do sistema dopaminérgico no córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias indica redução na expressão gênica do receptor D1 pela SM [$F(1,35) = 4,24, P = 0,048$], uma interação significativa entre SM e o CEB também foi encontrada [$F(1,35) = 11,62, P = 0,002$], sem efeito individual do etanol [$F(1,35) = 1,63$]. A ANOVA de uma via indica efeito nos grupos NS 6,0 g/kg e S salina, os quais têm expressão reduzida desse receptor, como pode ser observado na figura 14.

A expressão gênica da enzima tirosina hidroxilase foi aumentada por ambos os tratamentos {ANOVA de duas vias, CEB [$F(1,29) = 4,44, P = 0,045$] e SM [$F(1,29) = 9,98, P = 0,004$]}, não houve interação entre os tratamentos [$F(1,29) = 0,07$]. Os grupos submetidos aos dois tratamentos possuem diferença significativa com relação ao grupo controle, sendo o grupo S 3,0 g/kg diferente também do S salina e NS 3,0 g/kg (Figura 14).

A expressão do receptor D2 não foi alterada por nenhum tratamento [ANOVA de duas vias, SM: $F(1,35) = 0,02$, CEB: $F(1,35) = 0,19$, SM*CEB: $F(1,35) = 2,30$] (Figura 14).

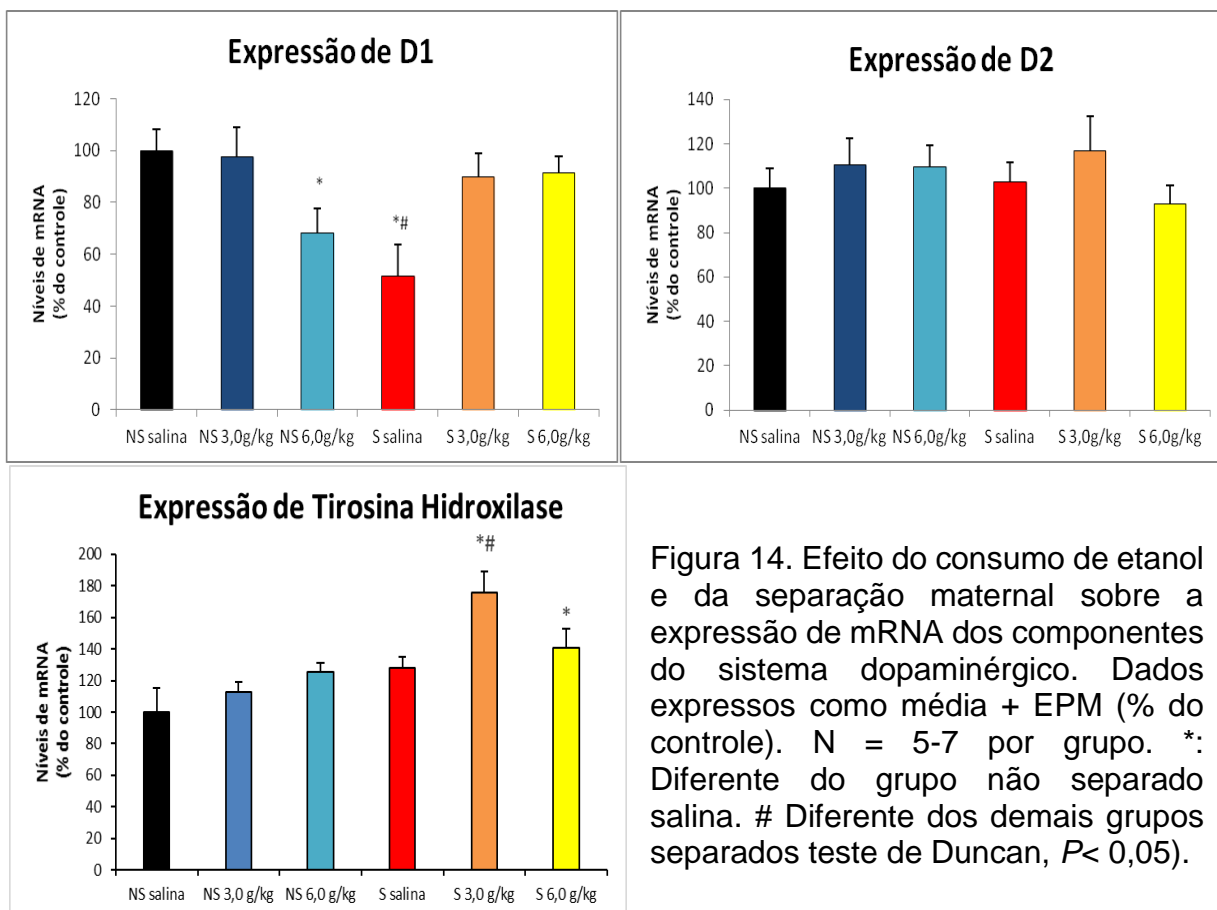


Figura 14. Efeito do consumo de etanol e da separação materna sobre a expressão de mRNA dos componentes do sistema dopaminérgico. Dados expressos como média + EPM (% do controle). $N = 5-7$ por grupo. *: Diferente do grupo não separado salina. #: Diferente dos demais grupos separados teste de Duncan, $P < 0,05$.

4.7. Expressão de mRNA do Δ FosB no córtex pré-frontal

A expressão gênica desse marcador foi aumentada por ambos os tratamentos {ANOVA de duas vias, CEB [$F(1,29) = 4,06$, $P=0,05$] e SM [$F(1,29) = 10,81$, $P=0,003$]}. A combinação dos dois tratamentos aumentou ainda mais a expressão gênica desse marcador, como representado na figura 15.

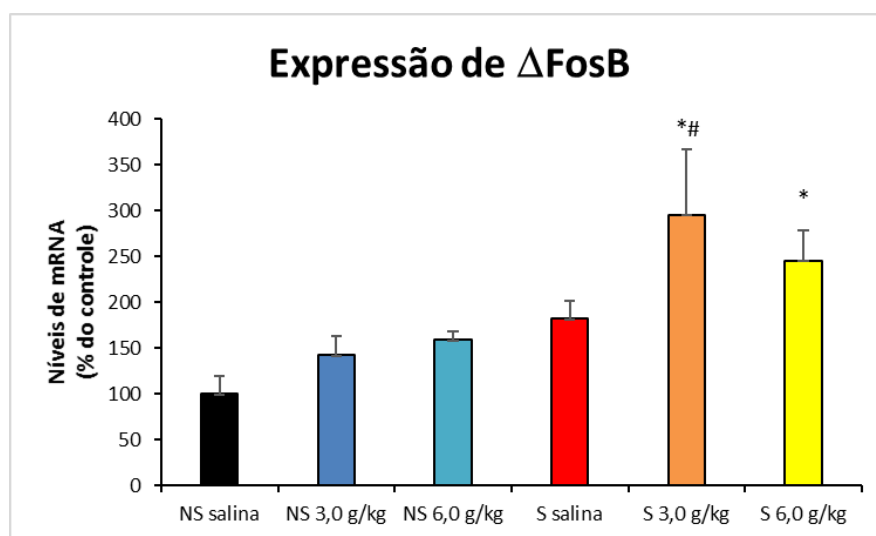


Figura 15. Efeito do consumo de etanol e da separação maternal sobre a expressão de mRNA do marcador de adição Δ FosB. Dados expressos como média + EPM (% do controle). N = 5 por grupo. *: Diferente do grupo não separado salina. # Diferente dos demais grupo S salina e NS com a mesma dose de etanol, teste de Duncan, $P < 0,05$).

4.8. Expressão de mRNA do sistema endocanabinoide no hipocampo

A expressão do receptor CB1 não foi influenciada pelos tratamentos, exceto quando a separação maternal foi combinada com o etanol na dose de 6,0 g/kg, conforme visualizado na figura 16. As enzimas MAGL e FAAH não foram alteradas pela separação maternal e pelo consumo de etanol. {ANOVA de duas vias - CB1 [SM: $F(1,29) = 3,15$, CEB: $F(1,29) = 2,89$, SM*CEB: $F(1,29) = 0,25$]; MAGL [SM: $F(1,29) = 0,50$, CEB: $F(1,29) = 0,01$, SM*CEB: $F(1,29) = 0,19$]; FAAH [SM: $F(1,29) = 0,58$, CEB: $F(1,29) = 0,45$, SM*CEB: $F(1,29) = 0,22$]}.}

A expressão da enzima NAPE-PLD foi reduzida pela separação maternal [ANOVA de duas vias, $F(1,29) = 5,05$, $P = 0,03$], não sendo encontrado efeito do CEB [ANOVA de duas vias, $F(1,29) = 1,11$] ou interação entre os tratamentos [ANOVA de duas vias, $F(1,29) = 2,08$]. A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo nos grupos NS 6,0 g/kg e S salina, ambos reduzindo a expressão dessa enzima em relação ao controle. Em relação à enzima DAGL, a ANOVA de uma via indicou diferença entre os grupos NS 6,0 g/kg e S 6,0 g/kg. A ANOVA

de duas vias não indicou efeito dos tratamentos [SM: $F(1, 29) = 0,33$, CEB: $F(1, 29) = 0,01$, SM*CEB: $F(1, 29) = 1,24$] (Figura 16).

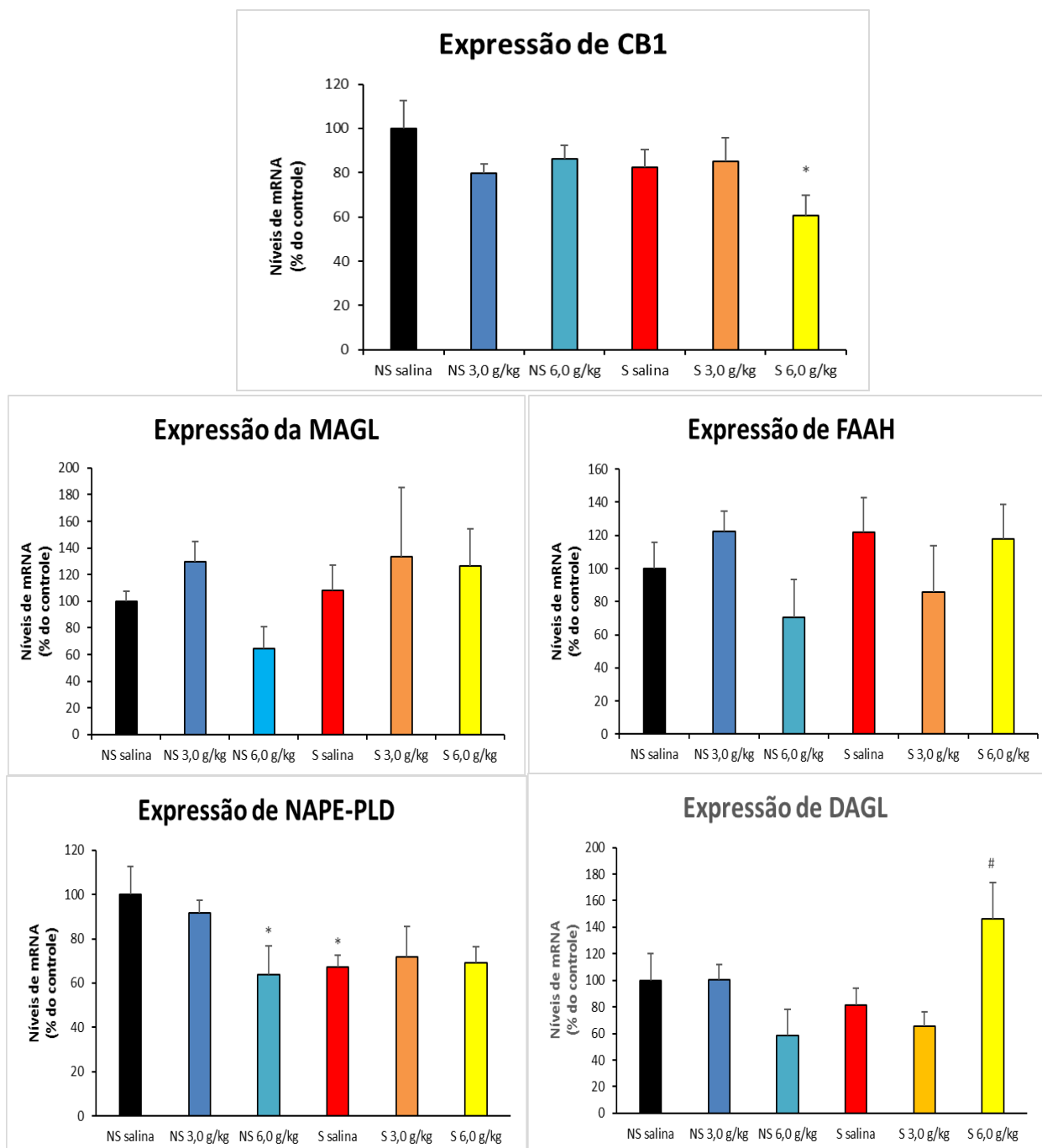


Figura 16. Efeito do consumo de etanol e da separação materna sobre a expressão de mRNA dos componentes do sistema endocanabinóide no hipocampo. Dados expressos como média + EPM (% do controle). *: Diferente do grupo NS salina. # Diferente do grupo NS 6,0 g/kg. Teste de Duncan, $P < 0,05$. $N = 5$ por grupo.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo, nós observamos que a separação maternal aumentou o comportamento de impulsividade e o consumo voluntário de etanol. O etanol preveniu essas alterações comportamentais geradas pela separação maternal. No teste de aprendizado apenas o etanol em *binge* agudo na adolescência prejudicou a memória de curta duração. No córtex pré-frontal a separação maternal e o etanol alteraram o sistema dopaminérgico com redução da expressão de mRNA de D1 e aumento da TH, e geraram um aumento das enzimas de síntese de endocanabinóides, NAPE-PLD e DAGL. Ainda no córtex pré-frontal, a separação maternal e o etanol aumentaram, de forma sinérgica, a expressão gênica do Δ FosB. No hipocampo, no grupo submetido a ambos os tratamentos houve uma redução da expressão de mRNA de CB1 e da enzima de síntese NAPE-PLD e um aumento da DAGL.

As concentrações de etanol encontradas após um único episódio de *binge drinking* estão de acordo com o observado em outro trabalho (PELIÇÃO et al., 2016), e estão acima dos valores preditos pelo NIAAA (Instituto Nacional de abuso de etanol e alcoolismo) para a caracterização de um episódio de consumo pesado de etanol, confirmando o objetivo da metodologia proposta.

No teste de aprendizado no Labirinto em T, pudemos observar que ambos os protocolos de consumo pesado episódico de etanol, agudo e crônico, influenciaram o aprendizado em dias específicos do teste. No tratamento agudo, observamos um efeito do etanol dificultando o aprendizado dos animais no primeiro dia de treino, que pode ser atribuído a um prejuízo da memória de curta duração. Esse resultado possivelmente não está associado a presença de etanol na corrente sanguínea, uma vez que o teste foi realizado 7 dias após o último episódio de *binge*. Resultados similares foram obtidos por Lacaille et al (2015), que observou efeito do etanol na memória de curta duração no teste de reconhecimento de objetos, sendo esses resultados encontrados 5 dias após o último episódio de *binge*. Esse autor atribuiu o déficit de memória provocado pelo etanol em *binge* na adolescência ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio provocado pelo mesmo.

Em animais submetidos ao protocolo de *binge* crônico, o consumo de etanol dificultou o aprendizado dos animais de forma significativa apenas no terceiro dia de treinamento. Embora efeitos mais robustos sejam descritos em relação ao uso de etanol e prejuízos de memória (RYBACK, 1971; WHITE et al., 2000), a maioria dos estudos foram realizados utilizando protocolos de consumo crônico e continuado de etanol. Dessa forma, o uso de etanol em *binge*, administrado de forma intermitente como utilizado em nosso trabalho, tornou os efeitos encontrados mais discretos.

Assim como o etanol, prejuízos de memória são relatados em animais submetidos ao estresse no período neonatal (HUOT et al., 2002; LUPIEN et al., 2009). Porém, em nosso trabalho esses prejuízos não foram encontrados. Os estudos encontrados na literatura que descrevem os efeitos da separação maternal sobre o aprendizado utilizaram tarefas de aprendizado como o Labirinto Aquático de Morris (AISA et al., 2009; EILAND et al., 2012; TATA et al., 2015) uma tarefa mais que complexa do que a utilizada em nosso trabalho. Mesmo nesse teste, outros autores (GRACE et al. 2009; GRISSOM et al. 2012) não encontraram efeito significativo da separação maternal na fase de aprendizado. Logo, a tarefa de aprendizado utilizado no nosso trabalho, uma tarefa simples, pode ter sido responsável pela ausência de resultados.

Nenhum dos tratamentos aplicados – separação maternal ou os diferentes protocolos de administração de etanol – foi capaz de provocar diferenças significantes no tipo de estratégia utilizada para o aprendizado. Essa fase do teste teve como intenção discriminar se a estratégia de aprendizado utilizada pelos animais seria mais procedural, dependente principalmente do estriado, ou espacial, dependente do hipocampo (HAGEWOUD et al., 2010). Seria possível postular que problemas funcionais em alguma dessas estruturas promoveriam alterações na estratégia de aprendizado utilizada pelos mesmos, mas os dados obtidos não permitiram observar disfunções região-específicas, induzidas pela separação maternal ou pelo etanol, capazes de impactar no comportamento mensurado por este teste.

Em relação à impulsividade, esta é caracterizada como "uma predisposição para reações rápidas e não planejadas a estímulos internos e externos sem levar em conta as consequências negativas dessas reações a si ou para outros"

(MOELLER et al., 2001). A impulsividade pode ser mensurada de duas formas: a impulsividade de escolha, que se dá pela escolha de uma recompensa menor e imediata, em detrimento de uma recompensa maior, porém demorada, e a impulsividade de ação, que é a incapacidade de inibição de um comportamento, sem conseguir alterá-lo ou mesmo pará-lo após iniciado (MOELLER et al., 2001; FILLMORE & RUSH, 2002).

O teste de tolerância ao atraso na recompensa mede a capacidade dos animais de manter o autocontrole diante da demora para a obtenção de recompensa. No presente estudo, o comportamento tipo-impulsivo foi mais evidente nos animais submetidos à separação maternal, os quais tiveram uma redução no percentual de escolha do braço com a maior recompensa, indicando aumento da impulsividade de escolha.

Nossos dados são os primeiros na literatura que demonstram, nestes modelos, um aumento da impulsividade de escolha utilizando um labirinto em T. Lovic e colaboradores (2011), utilizando um modelo de condicionamento operante, observaram em animais desprovidos dos cuidados maternos e submetidos ao isolamento social, um aumento da impulsividade de ação, mas não um aumento da impulsividade de escolha. A impulsividade é relacionada a algumas patologias como o transtorno de déficit de atenção e aprendizado e ao abuso de drogas, sendo um fator importante para o início ao abuso de substâncias (WIT, 2009). Diversos estudos apontam que a separação maternal induz um aumento do consumo de drogas de abuso, tais como o etanol (HUOT et al., 2001; CRUZ et al., 2008; GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2016), e nossos resultados reafirmam essas observações, uma vez que observamos um aumento pronunciado do consumo voluntário de etanol, provocado pela separação maternal. O fato de animais separados terem apresentado também um aumento da impulsividade corrobora a ideia de que o consumo de substâncias esteja relacionado ao comportamento impulsivo.

O CEB, por sua vez, preveniu o comportamento impulsivo induzido pela separação maternal. Da mesma forma, uma interação entre a SM e o CEB foi observada no teste de consumo voluntário de etanol, sendo o CEB capaz de prevenir o aumento do consumo voluntário de etanol provocado pela separação maternal. É possível que a exposição prévia ao etanol em binge, de forma

prolongada e em altas concentrações, como as usadas em nossos experimentos, tenha induzido um condicionamento aversivo aos efeitos do etanol, diminuindo a ingestão de etanol independentemente das condições prévias de separação maternal, o que corrobora o encontrado por Fabio e colaboradores (2012).

Os dados da expressão de mRNA no córtex pré-frontal apontam um aumento na expressão das enzimas NAPE-PLD e DAGL, responsáveis pela síntese de endocanabinóides, sem alterações nos demais componentes desse sistema. Esse efeito foi induzido tanto pela SM quanto pelo etanol em sua maior dose. Já em relação ao sistema dopaminérgico, a diminuição dos receptores D1 induzida pela separação maternal pode indicar uma redução da neurotransmissão dopaminérgica provocada pela separação e pela maior dose de etanol; porém, nos animais separados, o CEB parece atenuar a redução da expressão de receptores D1 provocada pela separação maternal. Há também um provável aumento da síntese de dopamina, devido ao aumento da expressão gênica da enzima tiroxina hidroxilase, em animais submetidos a ambos os tratamentos, a separação e ao protocolo de etanol em *binge*.

A redução da neurotransmissão dopaminérgica provocada pela separação maternal também foi relatada por outros pesquisadores (HEIDBREder et al., 2000; MATTHEWS et al, 2001). Essa redução é capaz de influenciar a impulsividade de escolha em modelos animais: por exemplo, o uso de bloqueadores de receptores dopaminérgicos, como o haloperidol e o raclopride, aumentam o nº de escolhas por recompensas imediatas em detrimento de recompensas maiores em que um retardo foi inserido (KOFFARNUS et al., 2011, WADE et al., 2000; respectivamente), assim como fármacos agonistas dopaminérgicos como o metilfenidato diminuem a impulsividade de escolha (PATERSON et al. 2012). Dessa forma, a redução dessa neurotransmissão dopaminérgica pode estar associada ao aumento da impulsividade observado em nossos animais.

Dados anteriores de nosso laboratório demonstram que a separação maternal gera um aumento da dopamina tissular (Ribeiro et al., dados não publicados). Esse aumento, pode ser o responsável pela redução do receptor D1 encontrada em animais submetidos à separação maternal. De forma similar a

administração de etanol aumenta a liberação de dopamina no córtex pré-frontal (SCHIER et al., 2013), levando uma redução compensatória do receptor D1. Nos animais separados, o etanol normalizou a expressão gênica do receptor D1 e aumentou a expressão da enzima tiroxina hidroxilase (o que sugere um aumento da síntese de dopamina). Nos animais separados, essa regularização da neurotransmissão dopaminérgica pode ser responsável pelo efeito atenuador da impulsividade provocado pelo etanol.

No córtex pré-frontal, o sistema endocanabinóide também exerce regulação de liberação de neurotransmissores, sendo importante para as funções desempenhadas por essa área. O estímulo de receptores CB1 nessa área pode levar a um prejuízo das funções corticais (EGERTON et al., 2006). O sistema endocanabinóide é um sistema formado pelos receptores CB1 e CB2 e substâncias endógenas capazes de interagir com esses receptores (HOWLETT et al., 2002). Os dois principais endocanabinóides são a Anandamida (AEA) e 2-araquidonoil-glicerol (2-AG). Essas substâncias não são armazenadas em vesículas, sendo produzidos sob demanda a partir de fosfolipídios de membrana. A AEA é produzida pela da n-acetiltransferase (NAT) e da fosfolipase D n-acilfosfatidiletanolamina específica (NAPE-PLD) e o 2-AG é sintetizado por duas reações subsequentes, a primeira catalisada pela fosfolipase C específica (PLC) e em seguida pela enzima diacilglicerol lipase (DAGL). A degradação ocorre por meio da ação das enzimas amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL), respectivamente (MECHOULAM & PARKER, 2013; ULUGÖL, 2014). O aumento da expressão, das enzimas responsáveis pela síntese dos endocanabinóides pode resultar em aumento da produção dos endocanabinóides, AEA e 2-AG, aumentando a regulação exercida pelo sistema endocanabinóide.

O possível aumento da síntese de endocanabinóides encontrado em nosso trabalho, devido ao aumento da expressão da DAGL e da NAPE-PLD, pode estar contribuindo para o efeito da separação maternal no comportamento de impulsividade. Como citado acima, o aumento da neurotransmissão endocanabinóide no córtex pré-frontal reduz a liberação de dopamina, e baixos níveis de dopamina são relacionados ao aumento da impulsividade. Nos animais separados, o etanol preveniu o efeito da separação maternal sobre a

impulsividade. Embora nesses animais também tenha se observado um aumento da expressão gênica de DAGL e da NAPE-PLD, e esse aumento sugira um aumento da síntese de endocanabinóides e por consequência redução da liberação de dopamina, nesses animais há um aumento da expressão gênica da enzima tirosina hidroxilase, o que contribuiria para o aumento da síntese de dopamina no córtex pré-frontal, regularizando a neurotransmissão dopaminérgica e dessa forma prevenindo o aumento da impulsividade nos animais separados.

No hipocampo, o sistema endocanabinóide exerce papel importante na regulação de neurotransmissores, como o GABA, acetilcolina e glutamato. Além disso, o receptor CB1 participa nos processos de codificação, consolidação e reconsolidação da memória; e o uso de agonistas desse receptor pode prejudicar o processo de aprendizado em diferentes testes comportamentais (para uma revisão ver, DAVIES et al.,2002). Esses autores descreveram que o uso de antagonistas desse receptor, embora revertam as alterações de memória provocada pelos seus agonistas, não geram, por si só, efeito significantes sobre a memória. Em nosso estudo, tanto a separação maternal quanto o etanol diminuíram a expressão da enzima da síntese NAPE-PLD, que pode estar provocando uma redução da síntese de endocanabinóides. Essa possível redução da síntese de endocanabinóides, assim como o bloqueio do sistema gerado pelo uso de antagonistas, não exercem efeitos diretos sobre a memória. No grupo submetido à SM e ao CEB na maior dose houve redução da expressão gênica dos receptores CB1 e aumento da enzima DAGL. Esse possível aumento da síntese de endocanabinóides, provavelmente está sendo compensado pela redução dos receptores, e com isso o comportamento não foi alterado.

Avaliamos também o efeito da separação maternal e do etanol em *binge* sobre a expressão do Δ FosB. O Δ FosB é um produto truncado do gene FosB, que apresenta bastante estabilidade e acumula gradualmente ao longo de exposições repetidas a drogas de abuso. Dentre todas as proteínas expressas do gene FosB, esta é a mais predominante expressa (HOPE et al., 1994). Estudos apontam que a administração crônica de etanol provoca um aumento marcante do Δ FosB em áreas como o córtex pré-frontal e o estriado, acompanhado de um aumento de menor intensidade no hipocampo (PERROTTI

et al., 2008). O Δ FosB se liga a regiões promotoras de genes específicos, regulando sua expressão, e essa regulação se dá principalmente em genes que estão envolvidos com a adição a drogas (NESTLER, 2008).

O aumento da expressão gênica do Δ FosB vem sendo descrito como uma importante alteração após processos de adição a drogas, como o etanol (NESTLER, 2008). Nossos dados reafirmam o descrito na literatura, confirmando o efeito do etanol na indução de um marcador que importante para os processos de adição. Também encontramos um aumento da expressão gênica de Δ FosB, em animais submetidos à separação maternal. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Wang e colaboradores (2016), e o fato de este fator estar envolvido na regulação de genes relacionados a processos aditivos pode ser um fator predisponente ao aumento no consumo voluntário de etanol observado em animais submetidos à separação maternal.

Nos grupos submetidos a ambos os tratamentos, o aumento na expressão do mRNA de Δ FosB foi maior do que o induzido pelos tratamentos individualmente (expressão de mRNA 2 a 3 vezes maior que o controle). A separação maternal e o etanol, individualmente, provocaram diferentes efeitos comportamentais nos animais, e quando associados não geraram efeitos sinérgicos em relação ao aprendizado, à impulsividade e ao consumo voluntário de etanol. No entanto, os dados da expressão de Δ FosB indicam que a SM pode potencializar os efeitos do consumo de etanol na adolescência sobre a plasticidade relacionada a processo aditivos, e estudos posteriores devem ser conduzidos para confirmar o efeito no desenvolvimento de comportamentos aditivos em relação a outras drogas.

A exposição ao etanol durante a adolescência prejudica o desenvolvimento e a maturação encefálica, causando alterações estruturais e déficits cognitivos (GUERRI & PASCUAL, 2010). Dentre os possíveis mecanismos apontados para esses efeitos podemos apontar a excitotoxicidade glutamatérgica, que é mediada pelas ações do etanol em receptores do tipo NMDA, o estresse oxidativo produzido por essa droga, que leva a peroxidação lipídica de membranas (DE LA MONTE et al., 2009) e também a lesões oxidativas no DNA (FOWLER et al., 2014). No entanto, a adolescência é também uma fase de

grande plasticidade sináptica (GUERRI & PASCUAL, 2010), sendo possível que alterações neuroquímicas não se reflitam em déficits comportamentais. Embora os resultados encontrados tenham demonstrado apenas um pequeno impacto da administração de etanol sobre os parâmetros cognitivos avaliados, o impacto do etanol nos sistemas neurotransmissores avaliados foi bastante evidente, sendo possível que alterações cognitivas possam ser encontradas em outros protocolos comportamentais ou, ainda, em outras fases da vida adulta.

A adolescência é um período de vulnerabilidade para o uso de substâncias, principalmente porque os adolescentes de uma forma geral são altamente impulsivos e apresentam comportamentos de risco, tornando os indivíduos mais propensos ao uso de drogas (ARNETT, 1992; STEINBERG, 2008; FUHRMANN et al., 2015). E, como visto em nosso trabalho e em outros relatos da literatura, a separação materna provoca um aumento da predisposição ao uso (e abuso) de substâncias. Em função disso, um dos objetivos deste trabalho foi investigar quais as consequências do abuso de etanol em animais previamente expostos à separação materna.

Muitos resultados indicando uma interação significativa do etanol e da separação materna foram encontrados em nosso trabalho, tais como nos testes de impulsividade e consumo voluntário de etanol e na expressão do receptor dopaminérgico D1 no córtex pré-frontal, e indicam que os efeitos do etanol sobre esses parâmetros são dependentes de experiências prévias durante o período de desenvolvimento. Eventos traumáticos durante as primeiras experiências de vida provocam alterações anatômicas e neuroquímicas durante o desenvolvimento encefálico e podem causar mudanças de longo prazo na função neural (ANAND & SCALZO, 2000). Essas alterações podem estar ligadas aos efeitos da separação materna sobre a regulação do eixo HHA. A separação materna é capaz de provocar um aumento da liberação de glicocorticoides, levando a alterações duradouras no controle do eixo HHA (SAPOLSKY & MEANEY, 1986; LAJUD et al., 2012). O córtex pré-frontal e principalmente o hipocampo são regiões sensíveis à ação dos glicocorticoides (MIZOGUCHI et al., 2003), e essa ação pode levar a mudanças estruturais neuronais e nas espinhas dendríticas (ANAND & SCALZO, 2000). Essas alterações de plasticidade no sistema nervoso central provocadas pela separação materna,

modificam sua resposta a ação de diferentes substâncias (MATTHEWS et al., 1999; KALINICHEV et al., 2002), incluindo o etanol (ORELAND et al., 2011). Por essa razão a administração do etanol induz respostas diferentes em animais separados e com isso preveniu alguns efeitos eliciados pela separação maternal.

Por outro lado, muitos dos efeitos do etanol foram sinérgicos aos da separação maternal, e indicam que essa associação leva a alterações ainda maiores na neurotransmissão dopaminérgica e endocanabinóide no córtex pré-frontal e no hipocampo. Mais estudos devem ser realizados para demonstrar possíveis outros efeitos da associação entre a SM e o CEB. Além disso, possíveis estratégias, relacionadas aos sistemas neurotransmissores estudados nesse trabalho, podem ser desenvolvidas para prevenir ou alterar os prejuízos provocados pela separação maternal e pelo consumo de etanol em *binge* na adolescência. Uma das possíveis alterações responsáveis pela indução dos efeitos da separação maternal sobre a expressão gênica, são as alterações epigenéticas.

Estudos na literatura, demonstram que os cuidados maternos têm uma profunda influência sobre o fenótipo dos filhotes, e essa influência é mediada por alterações na expressão gênica (JAWAHAR et al., 2015). Entre os mecanismos que regulam a transcrição gênica, estão os mecanismos epigenéticos. Mecanismos epigenéticos alteram a expressão gênica sem provocar mudanças na sequência primária do DNA. São muitos mecanismos envolvidos na regulação do genoma, como a metilação de DNA, modificações pós-traducionais em histonas (metilação, acetilação e fosforilação) e posicionamento de nucleossomos e microRNAs. Estas modificações epigenéticas são estáveis, mas reversíveis (LABBE et al., 2016).

A separação maternal foi associada com hipermetilação de genes envolvidos na regulação da plasticidade neuronal, diminuindo a atividade dos genes do receptor de adenosina A2A e da subunidade catalítica da proteína fosfatase 1 no NAc, sendo que este tem função direta na estabilização dos níveis de dopamina no NAc (ANIER et al., 2014). A SM também provoca aumento da metilação, persistente até a vida adulta, de éxons do gene do BDNF no córtex pré-frontal (ROTH et al., 2009) e aumento do micro-RNA 16, que é associado a redução da neurogênese no hipocampo (BAI et al., 2012).

Embora não encontremos relatos de alterações epigenéticas provocadas pela separação maternal nos genes estudados neste trabalho, efeitos como a modificação da acetilação de histonas (LEVINE et al., 2012) e da metilação geral de genes no córtex e no NAc (ANIER et al., 2014), provocados pela separação maternal, levam a crer que alterações epigenéticas importantes também ocorram na regulação desses genes, abrindo um campo para que investigações futuras possam ser conduzidas nesse sentido.

Enfim, o conjunto de resultados demonstra que a separação maternal altera comportamentos como a impulsividade e o consumo voluntário de etanol, o que pode estar associado às alterações na neurotransmissão dopaminérgica e endocanabinóide no córtex pré-frontal e hipocampo; o consumo agudo de etanol em *binge* na adolescência provoca prejuízos na memória de curto prazo, embora cronicamente esses efeitos não sejam observados; e o consumo crônico de etanol parece prevenir alguns efeitos da separação maternal, como a impulsividade e o consumo voluntário de etanol, e exacerbar outros, especialmente sobre os sistemas neurotransmissores e a expressão do Δ FosB.

6. CONCLUSÕES

- A separação maternal não provocou alterações no aprendizado dos animais. Por sua vez o consumo de etanol em *binge* agudo na adolescência prejudicou a memória de curta duração;
- A separação maternal provocou um aumento da impulsividade e do consumo voluntário de etanol. Ambos os comportamentos foram prevenidos pelo consumo de etanol em *binge* na adolescência;
- A separação maternal levou a uma redução da expressão gênica de D1, e aumento da expressão das enzimas DAGL e NAPE-PLD, o que pode estar relacionado ao aumento da impulsividade e do consumo voluntário de etanol;
- O aumento da expressão gênica da TH e normalização da expressão de D1 podem ser responsáveis pela prevenção, causada pelo consumo de etanol nos animais submetidos à separação maternal sobre a impulsividade;
- A síntese de endocanabinóides no hipocampo parece ser afetada pela separação maternal e pelo consumo de etanol em *binge* na adolescência;
- O aumento da expressão de Δ FosB foi observado tanto em animais submetidos à separação maternal quanto ao consumo de etanol em *binge*;
- Os efeitos provocados pela separação maternal estão provavelmente ligados aos efeitos deletérios do estresse nesse período de vida;
- Os efeitos neuroquímicos provocados pelo consumo de etanol em *binge* na adolescência podem ser decorrentes de sua ação tóxica, e os poucos efeitos comportamentais encontrados podem estar ligados a limitações do método.

7. REFERÊNCIAS

ANAND, K.J., SCALZO, F.M. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? **Biol. Neonate**. 77, 69–82, 2000.

ANIER, K., MALINOVSKAJA, K., PRUUS, K., AONURM-HELM, A., ZHARKOVSKY, A., KALDA, A. Maternal separation is associated with DNA methylation and behavioural changes in adult rats. **Eur. Neuropsychopharmacol**. 24, 459–468, 2014.

ARNETT, J. Reckless Behavior in Adolescence - a Developmental Perspective. **Developmental Review**, v.12, p. 339–373, 1992.

ARNSTEN, A.F. Catecholamine regulation of the prefrontal cortex. **J Psychopharmacol**, v.11, p. 151–162, 1997.

BADANICH, K. A.; MALDONADO, A. M.; KIRSTEIN, C. L. Chronic ethanol exposure during adolescence increases basal dopamine in the nucleus accumbens septi during adulthood. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 31, n. 5, p. 895–900, maio 2007.

BAI, M.; ZHU, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, L.; XUE, L.; YI, J.; YAO, S.; ZHANG, X. Abnormal hippocampal BDNF and miR-16 expression is associated with depression-like behaviors induced by stress during early life. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46921, 2012.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA S. O.; MINIM V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 23, n. 4, p. 629-643, Aug. 2010.

BLACKSTONE, C. Infantile parkinsonism-dystonia: a dopamine “transportopathy”. **J Clin Invest**, v. 119(6), p. 1455-1458, 2009.

BOHN, M.C. Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. **Neuroscience**, v. 5 (11), p. 2003-2012, 1980.

BOLLES, R.C.; WOODS, P.J. The ontogeny of behavior in the albino rat. **Anim Behav**, v. 12, p. 427–441, 1965.

BOWLBY, J. **Attachment and loss**, volume 1: Attachment., New York: Basic Books, 2ª Edição, 1969/82.

BREWER, R.D.; SWAHN, MH. Binge drinking and violence. **JAMA**, v. 294 (5), p. 616-619, 2005.

BRUNTON, L.L. Goodman & Gilman: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CAO, X.; HUANG, S.; CAO, J.; CHEN, T.; ZHU, P.; ZHU, R.; SU, P.; RUAN, D. The timing of maternal separation affects morris water maze performance and

long-term potentiation in male rats. **Developmental Psychobiology**, v. 56, n. 5, p. 1102–1109, jul. 2014.

CARLINI-COTRIM, B.; GAZAL-CARVALHO, C.; GOUVEIA, N. Comportamentos de saúde entre jovens estudantes das redes pública e privada da área metropolitana do Estado de São Paulo. **Rev Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 636-645, 2000.

CASSIDY, J.; LICHTENSTEIN-PHELPS, J., SIBRAVA, N.J., THOMAS, C.L.; BORKOVEC, T.D. Generalized anxiety disorder: connections with self-reported attachment. **Behav Ther**, v.40(1), p. 23-38, 2009.

COLORADO, R. A.; SHUMAKE, J.; CONEJO, N. M.; GONZALEZ-PARDO, H.; GONZALEZ-LIMA, F. Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. **Behavioural processes**, v. 71, n. 1, p. 51–8, 10 jan. 2006.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. Dopamine. **The biochemical basis of Neuropharmacology**, p. 225 – 270, 2003.

CRUZ, F. C.; QUADROS, I. M.; PLANETA, C. da S.; MICZEK, K. A. Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake. **Psychopharmacology**, v. 201, n. 3, p. 459–68, 2008.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; LEVIN, N.; WALKER, C. D.; BRADBURY, M. J.; SUEMARU, S.; SCRIBNER, K. S. Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, p. 22-31, 1994.

DAVIES, S.; PERTWEE, R. .; RIEDEL, G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 8, p. 993–1007, 2002.

DE LA MONTE, S. M.; LONGATO, L.; TONG, M.; DENUCCI, S.; WANDS, J. R. The liver-brain axis of alcohol-mediated neurodegeneration: role of toxic lipids. **International journal of environmental research and public health**, v. 6, n. 7, p. 2055–75, jul. 2009.

DE WIT, H. Impulsivity as a determinant and consequence of drug use: a review of underlying processes. **Addiction biology**, v. 14, n. 1, p. 22–31, jan. 2009.

DIANA, M.; PISTIS, M.; CARBONI, S.; GESSA, G.L.; ROSSETTI, Z.L. Profound decrement of mesolimbic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90:7966–7969, 1992.

EGERTON, A.; ALLISON, C.; BRETT, R. R.; PRATT, J. A. Cannabinoids and prefrontal cortical function: Insights from preclinical studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 5, p. 680–695, 2006.

EHRlich, M. E.; SOMMER, J.; CANAS, E; UNTERWALD, E. M. Periadolescent mice show enhanced DFosB upregulation in response to cocaine and amphetamine. **J. Neurosci**, v. 22, p. 9155–9159, 2002.

EILAND, L., MCEWEN, B. S. Early life stress followed by subsequent adult chronic stress potentiates anxiety and blunts hippocampal structural remodeling. **Hippocampus**, 22, 82-91, 2010.

ERDOZAIN, A. M.; CALLADO, L. F. Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review. **Adicciones**, v. 26, n. 4, p. 360–70, 2014.

FABIO, M.C., NIZHNIKOV, M.E., SPEAR, N.E., PAUTASSI, R.M. Binge ethanol intoxication heightens subsequent ethanol intake in adolescent, but not adult, rats. **Dev. Psychobiol.** 56, 574–583, 2014.

FADDA, F.; ROSSETTI, Z. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 4, p. 385–431, 1998.

Feldman, R.; Eidelman, A.I. Skin-to-skin contact (Kangaroo care) accelerates autonomic and neurobehavioural maturation in preterm infants. **Dev Med Child Neurol**, v. 45: 274–81, 2003.

FERNÁNDEZ, M., FABIO, M. C., NIZHNIKOV, M. E., SPEAR, N. E., ABATE, P.; PAUTASSI, R. M. Maternal isolation during the first two postnatal weeks affects novelty-induced responses and sensitivity to ethanol-induced locomotor activity during infancy. **Dev. Psychobiol.**, 56: 1070–1082, 2014.

FILLMORE. M.T; RUSH, C.R. Impaired inhibitory control of behavior in chronic cocaine users. **Drug Alcohol Depend**, v. 66, p. 265–273, 2002.

FINE, P.G., ROSENFELD, M.J. The Endocannabinoid System, Cannabinoids, and Pain. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 4, 2013.

FLEMING, R.L., ACHESON, S.K., MOORE, S.D., WILSON, W.A., SWARTZWELDER, H.S. In the Rat, Chronic Intermittent Ethanol Exposure During Adolescence Alters the Ethanol Sensitivity of Tonic Inhibition in Adulthood. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 36, 279, 2012.

FONSECA, F.R.; GORRITI, M.A.; BILBAO, A.; et al. Role of the Endogenous Cannabinoid System as a Modulator of Dopamine Transmission: Implications for Parkinson's Disease and Schizophrenia. **Neurotoxicity Research**. v. 3, p. 23–35, 2001.

FOWLER, A.-K.; THOMPSON, J.; CHEN, L.; DAGDA, M.; DERTIEN, J.; DOSSOU, K. S. S.; MOADDEL, R.; BERGESON, S. E.; KRUMAN, I. I. Differential sensitivity of prefrontal cortex and hippocampus to alcohol-induced toxicity. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106945, 2014.

FUHRMANN, D.; KNOLL, L. J.; BLAKEMORE, S.-J. Adolescence as a Sensitive Period of Brain Development. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 19, n. 10, p. 558–566, out. 2015.

FUMAGALLI, F.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; RIVA, M.A. Stress during development: impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology, **Prog. Neurobiol**, v. 81, 197–217, 2007.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S.; NAVARRETE, F.; ARACIL, A.; BARTOLL, A.; MARTÍNEZ-GRAS, I.; LANCIEGO, J. L.; RUBIO, G.; MANZANARES, J. Increased vulnerability to ethanol consumption in adolescent maternal separated mice. **Addiction biology**, v. 21, n. 4, p. 847–58, jul. 2016.

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

GRACE, L.; HESCHAM, S.; KELLAWAY, L. A.; BUGARITH, K.; RUSSELL, V. A. Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress. **Metabolic brain disease**, v. 24, n. 4, p. 643–57, 2009.

GRISSOM, E. M.; HAWLEY, W. R.; BROMLEY-DULFANO, S. S.; MARINO, S. E.; STATHOPOULOS, N. G.; DOHANICH, G. P. Learning strategy is influenced by trait anxiety and early rearing conditions in prepubertal male, but not prepubertal female rats. **Neurobiology of learning and memory**, v. 98, n. 2, p. 174–81, set. 2012.

GUERRI, C.; PASCUAL, M. Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. **Alcohol**, v. 44, n. 1, p. 15–26, 2010.

HAGEWOUD, R., HAVEKES, R., TIBA, P.A., NOVATI, A., HOGENELST, K., WEINREDER, P., VAN DER ZEE, E.A., MEERLO, P. Coping with Sleep Deprivation : Shifts in Regional Brain Activity and Learning Strategy. **SLEEP**, 33, 11, 1465-1473, 2010.

HARPER, C. The neuropathology of alcohol-specific brain damage, or does alcohol damage the brain?. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 57, p 101–10, 1998.

HEIDBREder, C.A.; WEISS, I.C.; DOMENEY, A.M.; PRYCE, C.; HOMBERG, J.; HEDOU, G.; FELDON, J.; MORAN, M.C.; NELSON, P. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. **Neuroscience**, v. 100, 749–768, 2000.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 12, p. 1023–1039, 2001.

HEIM, C.; OWENS, M. J.; PLOTSKY, P. M.; NEMEROFF, C. B. The Role of Early Adverse Life Events in the Etiology of Depression and Posttraumatic Stress Disorder. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 821: 194–207, 1997.

HELMEKE, C.; OVTTSCHAROFF, W.J.R.; POEGGEL, G.; BRAUN, K. Imbalance of immunohistochemically characterized interneuron populations in

the adolescent and adult rodent medial prefrontal cortex after repeated exposure to neonatal separation stress. **Neuroscience**. v. 152(1), p. 18-28, 2008.

HOPE, B. T.; NYE, H. E.; KELZ, M. B.; SELF, D. W.; IADAROLA, M. J.; NAKABEPPU, Y.; DUMAN, R. S.; NESTLER, E. J. Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. **Neuron**, v. 13, n. 5, p. 1235–44, nov. 1994.

HOWLETT, A. C. Cannabinoid receptor signaling. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 53-79, 2005.

HOWLETT, A.C.; BARTH, F.; BONNER, T.I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P., DEVANE, W.A.; FELDER, C.C.; HERKENHAM, M.; MACKIE, K.; MARTIN, B.R.; MECHOULAM, R.; PERTWEE, R.G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol Rev**, v. 54:161–202, 2002.

HUOT, R.L.; PLOTSKY, P.M.; LENOX, R.H.; MCNAMARA, R.K. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Research**, v. 950, p. 52–63, 2002.

HUOT, R.L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; MEANEY, M.J.; PLOTSKY, P.M. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. **Psychopharmacology (Berl)**. 158, 366–73, 2001.

JAWAHAR, M. C.; MURGATROYD, C.; HARRISON, E. L.; BAUNE, B. T. Epigenetic alterations following early postnatal stress: a review on novel aetiological mechanisms of common psychiatric disorders. **Clinical epigenetics**, v. 7, p. 122, 2015.

JR COLEMAN JR, L.G., HE, J., LEE, J., STYNER, M., CREWS, F.T. Adolescent Binge Drinking Alters Adult Brain Regional Volumes, and Neurochemistry in Mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 4, p. 671–688, 2011.

KALINICHEV, M.; EASTERLING, K.E.; HOLTZMAN, S.G. Early neonatal experience of Long–Evans rats results in long-lasting changes in morphine tolerance and dependence. **Psychopharmacology**, v. 157 p. 305–312, 2001a.

KALINICHEV, M.; EASTERLING, K.E.; HOLTZMAN, S.G.. Repeated neonatal maternal separation alters morphine-induced antinociception in male rats. **Brain Res Bull**, v. 54, p. 649–654, 2001b.

KALINICHEV, M., EASTERLING, K.E., HOLTZMAN, S.G. Early neonatal experience of Long–Evans rats results in long-lasting changes in reactivity to a novel environment and morphine-induced sensitization and tolerance. **Neuropsychopharmacology** 27, 518–533, 2002.

KATHMANN, M.; WEBER, B; SCHLICKER, E. Cannabinoid CB1 receptor mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 and

C57BL/6J mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 363, n. 1, p. 50-56, 2001.

KATONA, I.; SPERLÁGH, B.; MAGLÓCZKY, Z.; SÁNTHA, E.; KÖFALVI, A.; CZIRJÁK, S.; MACHIE, K.; VIZI, E. S.; FREUND, T. F. Gabaergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. **Neuroscience**, v. 100, n. 4, p. 797-804, 2000.

KOFFARNUS, M. N., NEWMAN, A. H., GRUNDT, P., RICE K. C., WOODS, J. H. Effects of selective dopaminergic compounds on a delay discounting task. **Behav. Pharmacol.** 22, 300–311, 2011.

KOOB, G. F. Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: alcohol addiction as a reward deficit disorder. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 13, p. 3–30, 2013.

KRUMAN II, HENDERSON GI, BERGESON SE DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. **Exper Biol Med**, v. 237, p.740–747, 2012.

KRYSTAL, J.H.; PETRAKIS, I.L.; MASON, G.; TREVISAN, L.; D'SOUZA, D.C. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. **Pharmacol Ther**, v. 99, p. 79–4, 2003.

KUNTSCHKE, E.; REHM, J.; GMEL, G. Characteristics of heavy episodic drinkers in Europe. **Soc Sci Med**, v. 59, p. 113-127, 2004.

LABBÉ, C.; LORENZO-BETANCOR, O.; ROSS, O. A. Epigenetic regulation in Parkinson's disease. **Acta Neuropathologica**, p. 1–16, 2016.

LACAILLE, H., DUTERTE-BOUCHER, D., LIOT, D., VAUDRY, H., NAASSILA, M., VAUDRY, D. Comparison of the deleterious effects of binge drinking-like alcohol exposure in adolescent and adult mice. **J. Neurochem.** 132, 629–641, 2015.

LAJUD, N.; ROQUE, A.; CAJERO, M.; GUTIÉRREZ-OSPINA, G.; TORNER, L. Periodic Maternal Separation Decreases Hippocampal Neurogenesis without Affecting Basal Corticosterone during the Stress Hyporesponsive Period, but Alters HPA Axis and Coping Behavior in Adulthood. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 3, p. 410–20, 1 mar. 2012.

LAMBAS-SEÑAS, L.; MNIE-FILALI, O.; CERTIN, V.; FAURE, C.; LEMOINE, L.; ZIMMER, L.; HADDJERI, N. Functional correlates for 5-HT1A receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, p. 262-268, 2009.

LARANJEIRA, R.; PINSKI, I.; ZALESKI, M.; CAETANO, R.; DUARTE, P.C.A.V. I Levantamento Nacional sobre os Padrões de Consumo de Álcool na

População Brasileira. **Brasília: SENAD – Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas**, 76 p, 2007.

LEE, J.-H.; KIM, H. J.; KIM, J. G.; RYU, V.; KIM, B.-T.; KANG, D.-W.; JAHNG, J. W. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. **Neuroscience Research**, v. 58, n. 1, p. 32–39, 2007.

LEMAIRE, V.; KOEHL, M.; LE MOAL, M.; ABROUS, D. N. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 20, p. 11032–7, 26 set. 2000.

LEVINE, A.; WORRELL, T. R.; ZIMNISKY, R.; SCHMAUSS, C. Early life stress triggers sustained changes in histone deacetylase expression and histone H4 modifications that alter responsiveness to adolescent antidepressant treatment. **Neurobiology of disease**, v. 45, n. 1, p. 488–98, jan. 2012.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology Behavior**, v. 73, p. 255-260, 2001.

LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J.C.; FRANCIS, D.D.; MEANEY, M.J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature Neuroscience**, v. 3, p. 799–806, 2000.

LLORENTE, R.; LLORENTE-BERZAL, A.; PETROSINO, S.; MARCO, E.-M.; GUAZA, C.; PRADA, C.; LÓPEZ-GALLARDO, M.; DI MARZO, V.; VIVEROS, M.P. Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: A possible role for the endocannabinoid system. **DevelNeurobio**, 68: 1334–1347, 2008.

LOVIC, V.; KEEN, D.; FLETCHER, P. J.; FLEMING, A. S. Early-life maternal separation and social isolation produce an increase in impulsive action but not impulsive choice. **Behavioral Neuroscience**, v. 125, n. 4, p. 481–491, 2011.

LUCION, A. B.; BORTOLINI, M. C. Mother-pup interactions: rodents and humans. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, p. 17, 2014.

LUPIEN, S. J., MCEWEN, B. S., GUNNAR, M. R., HEIM, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature Reviews**, 10, 434-445, 2009.

MACRÌ, S.; WÜRBEL, H. Environmental modulation of maternal behavior and behavioural and HPA-responses in rats. **Anim. Behav**, v. 73, p. 171-184, 2007.

MATTHEWS, K.; DALLEY, J. W.; MATTHEWS, C.; TSAI, T. H.; ROBBINS, T. W. Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 40, n. 1, p. 1–10, abr. 2001.

MCGOWAN, P.; SUDERMAN, M.; SASAKI, A.; HUANG, T.; HALLETT, M.; MEANEY, M.J. et al. Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. **PLoS One**. V. 6(2). 2011.

MECHOULAM, R.; PARKER, L.A. The Endocannabinoid System and the Brain. **Annu. Rev. Psychol**, v. 64, p. 21–47, 2013.

MIZOGUCHI, K., ISHIGE, A., ABURADA, M., TABIRA, T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. **Neuroscience** 119, 887–97, 2003.

MOELLER, F.G.; BARRATT, E.S.; DOUGHERTY, D.M.; SCHMITZ, J.M.; SWANN, A.C. Psychiatric aspects of impulsivity. **Am J Psychiatry**, v. 158, p. 1783–1793, 2001.

MOFFETT, M. C.; VICENTIC, a.; KOZEL, M.; PLOTSKY, P.; FRANCIS, D. D.; KUHAR, M. J. Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 321–330, 2007.

MONTOLIU, C.; SANCHO-TELLO, M.; AZORIN IBURGAL, M.; VALLER, S.; RENAU, J.; GUERRI, C. Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induced oxidative stress in astrocytes. **J Neurochem** v. 65, 2561–2570, 1995.

MORROW, A.L.; MONTPIED, P.; LINGFORD-HUGHES, A.; PAUL, S.M. Chronic ethanol and pentobarbital administration in the rat: effect on GABA_A receptor function and expression in brain. **Alcohol**, v. 7, p. 237–244, 1990.

NAIMI, T.S.; BREWER, R.D.; MOKDAD, A.; DENNY, C.; SERDULA, M.K.; MARKS, J.S. Heavy episodic drinking among US adults. **JAMA**, v. 289(1), p. 70–75, 2003.

NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nat. Rev. Neurosci**, v. 2, 119–128, 2001.

NESTLER, E.J. Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 363, 3245–55, 2008.

NESTLER, E. J. Cellular basis of memory for addiction. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 431–43, dez. 2013.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; SELF, D. W. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11042–6, 25 set. 2001.

NYLANDER, I.; ROMAN, E. Is the rodent maternal separation model a valid and effective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption? **Psychopharmacology**, v. 229, n. 4, p. 555–69, out. 2013.

NYQVIST K, H, et al; State of the art and recommendations Kangaroo mother care: application in a high-tech environment. **Acta Paediatr**. v. 99(6), p. 812-9, 2010.

OITZL, M. S.; WORKEL, J. O.; FLUTTERT, M.; FRÖSCH, F.; DE KLOET, E. R. Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats. **The European journal of neuroscience**, v. 12, n. 10, p. 3771–80, out. 2000.

ORELAND, S.; RAUDKIVI, K.; ORELAND, L.; HARRO, J.; ARBORELIUS, L.; NYLANDER, I. Ethanol-induced effects on the dopamine and serotonin systems in adult Wistar rats are dependent on early-life experiences. **Brain Research**, v. 1405, p. 57–68, 2011.

PANDOLFO, P. **Papel dos receptores da adenosina em um modelo animal do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade**. 2010, 134 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2010.

PANKSEPP, J. Affective consciousness: Core emotional feelings in animals and humans. **Consciousness and Cognition**, v. 14, p.30–80, 2005.

PARK, H. K.; CHOI, B.S.; LEE, S.J.; SEOL, I.J.; LEE, H.J. Practical application of kangaroo mother care in preterm infants: clinical characteristics and safety of kangaroo mother care. **J Perinat Med**, v. 42(2), p. 239-45, 2014.

PASCUAL, M.; BLANCO, A. M.; CAULI, O.; MIÑARRO, J.; GUERRI, C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 541–550, jan. 2007.

PASCUAL, M.; BOIX, J.; FELIPO, V.; GUERRI, C. Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. **J Neurochem**, v. 108, p. 920–931, 2009.

PATERSON, N. E., WETZLER, C., HACKETT, A., HANANIA, T. Impulsive action and impulsive choice are mediated by distinct neuropharmacological substrates in rat. **Int. J. Neuropsychopharmacol.** 15, 1473–1487, 2012.

PATRICK, M.E., SCHULENBERG, J.E., MARTZ, M.E., MAGGS, J.L., O'MALLEY, P.M., JOHNSTON, L.D. Extreme binge drinking among 12th-grade students in the United States: prevalence and predictors. **JAMA Pediatr** 167(11):1019–1025, 2013.

PAUTASSI, R. M.; NIZHNIKOV, M. E.; FABIO, M. C.; SPEAR, N. E. Early maternal separation affects ethanol-induced conditioning in a nor-BNI insensitive manner, but does not alter ethanol-induced locomotor activity. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 100, n. 3, p. 630–8, 2012.

PAVA, M. J.; WOODWARD, J. J. A review of the interactions between alcohol and the endocannabinoid system: Implications for alcohol dependence and future directions for research. **Alcohol**, v. 46, n. 3, p. 185–204, 2012.

PAVA, M.J.; WOODWARD, J.J. Chronic ethanol alters network activity and endocannabinoid signaling in the prefrontal cortex. **Front Integr Neurosci**, v. 18, p. 8:58, 2014.

PAXINOS G., WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Sydney: Academy, 1986.

PELIÇÃO, R., SANTOS, M.C., FREITAS-LIMA, L.C., MEYRELLES, S.S., VASQUEZ, E.C., NAKAMURA-PALACIOS, E.M., RODRIGUES, L.C.M. URB597 inhibits oxidative stress induced by alcohol bingeing in the prefrontal cortex of adolescent rats. **Neurosci. Lett.** 624, 17–22, 2016.

PERROTTI, L. I., WEAVER, R. R., ROBISON, B., RENTHAL, W., MAZE, I., YAZDANI, S., NESTLER, E. J. Distinct patterns of DFosB induction in brain by drugs of abuse. **Synapse**, v. 62, p. 358–369, 2008.

PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Molecular Brain Research**, v. 18, p. 195–200, 1993.

PRINS, S.A., PRZYBYCIEN-SZYMANSKA, M.M., RAO, Y.S., PAK, T.R. Long-Term Effects of Peripubertal Binge EtOH Exposure on Hippocampal microRNA Expression in the Rat. **PLoS One** 9, e83 166, 2014.

PRYCE, C.R.; FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 57–71, 2003.

QUINTINO-DOS-SANTOS, J.W.; MULLER, C.J.T.; BERNABÉ, C.S.; ROSA, C.A.; TUFIK, S.; SHENBERG, L.C. Evidence That the Periaqueductal Gray Matter Mediates the Facilitation of Panic-Like Reactions in Neonatally-Isolated Adult Rats. **Plos One**, v. 9(3), 2014.

REY ES, MARTINEZ HG. **Manejo racional del niño prematuro**. Curso de Medicina Fetal. Bogota: Universidad Nacional, 1983.

RIBEIRO, L.B. **Estratégias não farmacológicas para prevenção dos efeitos de longo prazo da separação maternal**. Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGBF, 2015.

ROCERI, M.; HENDRIKS, W.; RACAGNI, G.; ELLENBROEK, B. A.; RIVA, M. A. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. **Molecular Psychiatry**, v. 7, n. 6, p. 609–616, 30 jul. 2002.

ROMANO-LÓPEZ, A.; MÉNDEZ-DÍAZ, M.; RUIZ-CONTRERAS, A. E.; CARRISOZA, R.; PROSPÉRO-GARCÍA, O. Maternal separation and proclivity for ethanol intake: A potential role of the endocannabinoid system in rats. **Neuroscience**, v. 223, p. 296–304, 2012.

ROMANO-LÓPEZ, Q. F. B. A.; MÉNDEZ-DÍAZ, M.; GARCÍA, F. G.; REGALADO-SANTIAGO, C.; RUIZ CONTRERAS, A. E.; PROSPÉRO-GARCÍA, O. Maternal separation and early stress cause long-lasting effects on dopaminergic and endocannabinergic systems and alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and frontal cortex in rats. **Developmental Neurobiology**, p. n/a–n/a, 2015.

ROTH, T.L, LUBIN, F.D, FUNK, A., SWEATT, J.D. Lasting epigenetic influence of early- life adversity on the BDNF gene. **Biol Psychiatry**, 65(9):760–9, 2009.

RUSHWORTH, M.F.S.; NOONAN, M.P.; BOORMAN, E.D.; et al. Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making. **Neuron**, v. 70, p. 1054–69, 2011.

RYBACK R.S. The continuum and specificity of the effects of alcohol on memory. A review. **Q J Stud Alcohol**, 32, 995-1016,1971.

SÁNCHEZ, M.M.; LADD, C.O.; PLOTSKY, P.M. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. **Dev Psychopathol.** v. 13(3), p. 419-49, 2001.

SAPOLSKY, R.M., MEANEY, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Res.** V. 396, p. 64—76, 1986.

SCHER, M.S.; LUDINGTON-HOE, S.; KAFFASHI, F.; JOHNSON, M.W.; HOLDITCH-DAVIS, D.; LOPARO, K. A. Neurophysiologic assessment of brain maturation after an 8-week trial of skin-to-skin contact on preterm infants. **Clin Neurophysiol**, v. 120: p. 1812–8, 2009.

SCHMIDT, M.; OITZL, M.S.; LEVINE, S.; KLOET, R. The HPA system during the postnatal development of CDI mice and the effects of maternal deprivation, **Dev. Brain. Res.**, v. 139, p. 39-49, 2002.

SHAW-LUTCHMAN, S.Z.; IMPEY, S.; STORM, D.; NESTLER, E.J.; Regulation of CREmediated transcription in mouse brain by amphetamine. **Synapse.** 2003;48:10–17.

SHAW-LUTCHMAN, T.Z.; BARROT, M.; WALLACE, et al. Regional and cellular mapping of CRE-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. **J Neurosci.** v. 22, p. 3663–3672, 2002.

SIEGEL, G.; ALBERS, R.W.; BRADY, S.; PRICE, D. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. **American Society for Neurochemistry-Academic Press**, v. 7, p. 14:1016, 2005.

SILVA, P. **Farmacologia** – Penildon Silva – 8ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SPIVEY, J. M.; SHUMAKE, J.; COLORADO, R. A.; CONEJO-JIMENEZ, N.; GONZALEZ-PARDO, H.; GONZALEZ-LIMA, F. Adolescent female rats are more resistant than males to the effects of early stress on prefrontal cortex and impulsive behavior. **Developmental psychobiology**, v. 51, n. 3, p. 277–88, abr. 2009.

STANDAERT, D.G. E GALANTER, J.M . Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. In: GOLAN, David E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, P. 166-179, 2009.

STEINBERG, L., 2008. A social neuroscience perspective on adolescent risk-taking. *Dev. Rev.* 28, 78–106.

SUÁREZ, J.; LLORENTE, R.; ROMERO-ZERBO, S.Y.; MATEOS, B.; BERMÚDEZ-SILVA, F.J.; RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; VIVEROS, M.P. Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB1 and CB2 cannabinoid receptors of neonatal rats. **Hippocampus**, 19, pp. 623–632, 2009.

SUÁREZ, J.; LLORENTE, R.; ROMERO-ZERBO, S.Y.; BERMÚDEZ-SILVA, F.J.; VIVEROS, M.P. Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. **Brain Res.** 19;1349:162-73, 2010.

SULLIVAN, R. M. Developing a sense of safety: the neurobiology of neonatal attachment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1008, p. 122–31, dez. 2003.

ULUGÖL, A. The Endocannabinoid System as a Potential Therapeutic Target for Pain Modulation. **Balkan medical jornal**, 31(2):115-120, 2014.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2010**. United Nations Publication, Sales n. E. 10. XI. 13, 2010.

WADE, T. R., DE WIT, H., RICHARDS, J. B. Effects of dopaminergic drugs on delayed reward as a measure of impulsive behavior in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 150, 90–101, 2000.

WANG, H., TAO, X., HUANG, S.-T., WU, L., TANG, H.-L., SONG, Y., ZHANG, G., ZHANG, Y.-M. Chronic Stress Is Associated with Pain Precipitation and Elevation in DeltaFosB Expression. **Front. Pharmacol.** 7, 1–10, 2016.

WEAVER, I. C. G.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F. A.; D’ALESSIO, A. C.; SHARMA, S.; SECKL, J. R.; DYMOV, S.; SZYF, M.; MEANEY, M. J. Epigenetic

programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847–854, 27 ago. 2004.

WEISS, F.; PARSONS, L.H.; SCHULTEIS, G.; LORANG, M.T.; HYYTIÄ, P.; BLOOM, F.E.; KOOB, G.F. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and serotonin release in dependent rats. **J Neurosci** 16:3474–3485, 1996.

WEISS, F.; PORRINO, L. J. Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 3332–7, 1 maio 2002.

WHITE, A. M., MATTHEWS, D. B., BEST, P. J. Ethanol, memory, and hippocampal function: A review of recent findings. *Hippocampus*, 10, 88-93, 2000.

WHO. World Health Organization. **Global status report on alcohol and health 2014**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf?ua=1> Acesso em: 22 de fevereiro de 2015

WIEGERS, G. J.; REUL, J. M. Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance. **Trends in pharmacological sciences**, v. 19, n. 8, p. 317–21, ago. 1998.

WINSTANLEY, C. A. et al. Double dissociation between serotonergic and dopaminergic modulation of medial prefrontal and orbitofrontal cortex during a test of impulsive choice. **Cereb Cortex**, v.16, n.1, p.106-14, Jan 2006.

WIT, H. Impulsivity as a determinant and consequence of drug use: a review of underlying processes. **Addict. Biol.** 14, 22–31, 2009.

YANG, Y.; RAINE, A. Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis. **Psychiatry Research**, v. 174, p. 81–88, 2009.

ZHANG, X.; WANG, B.; JIN, J.; AN, S.; ZENG, Q.; DUAN, Y.; YANG, L.; MA, J.; CAO, X. Early deprivation reduced anxiety and enhanced memory in adult male rats. **Brain research bulletin**, v. 108, p. 44–50, set. 2014.

ZORUMSKI, C. F.; MENNERICK, S.; IZUMI, Y. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 48, n. 1, p. 1–17, fev. 2014.