



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

VANESSA GHIDETTI ALVARENGA TELLES

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPARAÇÃO
MATERNAL E AO CONSUMO DE ETANOL EM *BINGE* DURANTE A
ADOLESCÊNCIA.**

VITÓRIA

2016

VANESSA GHIDETTI ALVARENGA TELLES

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPARAÇÃO
MATERNAL E AO CONSUMO DE ETANOL EM *BINGE* DURANTE A
ADOLESCÊNCIA.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do grau de Mestra em Bioquímica e Farmacologia. Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Vasconcellos Bittencourt. Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Lívia Carla de Melo Rodrigues.

VITÓRIA

2016

VANESSA GHIDETTI ALVARENGA TELLES

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPARAÇÃO
MATERNAL E AO CONSUMO DE ETANOL EM *BINGE* DURANTE A
ADOLESCÊNCIA.**

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

Aprovada em: 16/09/2016

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Ana Paula S. de Vasconcellos Bittencourt – Orientadora, UFES

Prof.^a Dr.^a Livia Carla de Melo Rodrigues – Co-orientadora, UFES

Prof.^a Dr.^a Carla Dalmaz – Membro externo, UFRGS

Prof.^a Dr.^a Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves – Membro interno, UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, setembro de 2016

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

Telles, Vanessa Ghidetti Alvarenga, 1986 -

T274a Avaliação dos parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em animais submetidos à separação maternal e ao consumo de etanol em binge durante a adolescência / Vanessa Ghidetti Alvarenga Telles – 2016.

101 f. : il.

Orientador: Ana Paula S. de Vasconcellos Bittencourt.

Coorientador: Lívia Carla de Melo Rodrigues.

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

1. Estresse oxidativo. 2. Comportamento. 3. Córtex pré-frontal.
4. Hipocampo. I. Bittencourt, Ana Paula S. de Vasconcellos.
II. Rodrigues, Lívia Carla de Melo. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Aos curiosos, que buscam incessantemente respostas para seus questionamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Marcus, por ter me apoiado em todas circunstâncias para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus pais, Miguel e Marisa, por ter me incentivado a permanecer no meu sonho.

À minha querida avó Acely, por entender a minha ausência durante os almoços de domingo.

Aos meus colegas de laboratório, Martielo, Victor, Randriely, Josefa, Ludhiele, Izabela, Lucas, pela ajuda disponibilizada durante a execução do projeto.

Ao Marcelo pelas valorosas contribuições ao trabalho.

Aos alunos LANEP, em especial à Cleciane, Elisa e Ingryd, por terem disponibilizado materiais e equipamentos utilizados neste trabalho.

À Danusa e a Ana Paula, pela dedicação, atenção, disponibilidade que tiveram durante as análises das minhas amostras.

À prof.^a Dr^a. Ana Paula Vasconcellos Bittencourt, pelo aceite da orientação lá no início do mestrado, pelo aprendizado e ensinamentos adquiridos durante estes últimos anos.

À prof.^a. Dr^a. Carla Dalmaz, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório para que as minhas análises fossem executadas.

À prof.^a Dr^a. Lívia Carla de Melo Rodrigues, que sempre se disponibilizou em ajudar, sempre teve aquela palavra de conforto e incentivo nas horas certas.

À prof.^a Dr^a. Juliana Barbosa Coitinho, pela disponibilidade em tirar as minhas dúvidas e, por ter me ajudado na execução dos ensaios bioquímicos.

Ao prof. Dr. Athelson Bittencourt pelo apoio financeiro.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia.

A todos os meus professores que passaram em minha vida, afinal se eu consegui chegar até aqui foi por causa de todos vocês.

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia.

Ao biotério central da Universidade Federal do Espírito Santo e toda sua equipe:
Rodolfo, João, Amarildo e Amaral.

À Universidade Federal do Espírito Santo.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante o mestrado.

A todos vocês que fizeram parte desta caminhada, a minha eterna gratidão.

Muito obrigada!

“Eu aprendi que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-a.”

William Shakespeare

RESUMO

Eventos estressantes que ocorrem no início da vida podem induzir danos persistentes no encéfalo e no comportamento durante a vida adulta. Além disso, experiências estressantes estimulam o consumo abusivo do etanol, o que induz danos neuronais, e contribuem para o aumento do estresse oxidativo no Sistema Nervoso Central. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da separação maternal (SM) e da exposição ao etanol em *binge* em ratos adolescentes sobre parâmetros de estresse oxidativo e comportamentais. Para isso, foram utilizadas ratas fêmeas Wistar prenhes e após o nascimento das ninhadas, os animais foram divididos em grupo controle (NS) ou grupo separação maternal (SM). A SM foi realizada de 2 a 15 dias pós-natal, 3 horas por dia. No dia pós-natal 35, os animais foram novamente divididos em 3 grupos: os animais que receberam solução salina intragástrica (grupo do veículo) ou etanol em doses de 3,0 ou 6,0 g / kg. No tratamento crônico, o etanol foi administrado uma vez por dia, durante dois dias consecutivos intercalados por dois dias sem etanol, perfazendo um total de 10 doses. A exposição ao tratamento do *binge* agudo aconteceu no dia 35 até o dia 37 pós-natal. No final deste procedimento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais ou submetidos à eutanásia para a obtenção de estruturas encefálicas. A memória foi avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos (TRO) e pelo teste do labirinto em Y, o hipocampo e córtex pré-frontal (CPF) foram recolhidos apenas nos animais submetidos ao tratamento crônico. Nestas estruturas, foram avaliadas a produção de radicais livres pela oxidação química do diclorodifluoresceína (DCFH), a atividade enzimática da catalase (CAT), da glutatona peroxidase (GPx) e da superóxido dismutase (SOD), a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de tióis totais. Nos testes comportamentais do grupo agudo, observou-se efeito da SM e do etanol induzindo a diminuição da memória de longa duração (MLD) no TRO. No tratamento crônico por sua vez, observou-se interação entre a SM e o etanol induzindo a diminuição da memória de curta duração (MCD) no TRO e no labirinto em Y, foi visto efeito da SM diminuindo a MCD, mais especificamente durante a fase de aquisição da memória. Em relação aos parâmetros bioquímicos, os resultados do CPF mostraram que a SM e a interação entre os tratamentos SM e etanol induziram o aumento da atividade da GPx bem como o aumento dos níveis de TBARS foram induzidos

somente pela SM. Já no hipocampo, a SM aumentou a produção de radicais livres, diminuiu a atividade enzimática da GPx, aumentou a atividade enzimática da SOD e a produção de TBARS. Além disso, os resultados mostraram interação entre os tratamentos SM e etanol, favorecendo a diminuição da atividade enzimática da CAT no hipocampo. Concluimos que há interação entre a SM e o etanol na indução de um o déficit cognitivo na MCD e MLD, sugerindo alterações funcionais no hipocampo e CPF. Além disso, a separação maternal foi capaz de promover estresse oxidativo nessas estruturas, não sofrendo grande influência do consumo crônico de etanol em *binge*.

Palavras-chave: Separação maternal. Estresse oxidativo. Etanol em *binge*.
Comportamento. Córtex pré-frontal. Hipocampo.

ABSTRACT

Early life stress can generate long-lasting effects on brain and behavior during adulthood. Furthermore, stressful experiences stimulate abusive consumption of ethanol, which induces neuronal damages and contributes to increases on parameters of oxidative stress on Central Nervous System. The aim of this research was to evaluate the effects of Maternal Separation (MS) and of intermittent ethanol binge drinking in adolescent rats on behavioral and oxidative stress parameters. Pregnant Wistar rats were used. After birth of litters, the animals were divided into control group (NS) or maternal separation group (MS). Maternal separation was performed from 2 to 15 postnatal day, 3 hours daily. At postnatal day 35, animals were divided again into 3 groups: animals which received intragastric saline (vehicle group) or ethanol in doses of 3.0 or 6.0 g/kg. Ethanol was administered once a day, in a regimen of two consecutive days interspersed by two days without ethanol, totalizing 10 doses for chronic binge treatments. Acute binge exposure happened at postnatal day 35 until 37 postnatal day. At the end of this procedure the animals were subjected to behavioral tests or euthanized for obtaining structures. Memory was accessed by object recognition test and by Y maze test, and hippocampi and pre frontal cortex were dissected. Only from animals submitted to chronic binge treatment, for evaluation of lipid peroxidation (LP), oxidative species production (ROS), and enzymatic activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). We observed a significant interaction between factors on short-term memory of Object Recognition Test (OR), and an influence of MS on the acquisition phase during Y maze test on the animals submitted chronic binge treatment. In animals submitted to acute binge exposure we observed effect of MS and of ethanol on long-term memory of OR. Furthermore, our results showed that MS induced an increase in SOD activity, ROS and LP, decreasing GPx activity, as well as an interaction between factors in CAT activity on hippocampus. In pre frontal cortex, our results to show that MS induced an increase in GPx activity and lipid peroxidation. To summarize, we found an interaction between MS and ethanol as contributing factors for cognitive impairment in short-term memory and long-term memory. Besides, maternal separation was able to induce oxidative stress in PFC and hippocampus, but this parameter was not influenced by ethanol chronic binge treatment.

Keywords: Maternal Separation. Oxidative stress. Exposure binge ethanol. Behavioral. Pre frontal cortex. Hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dose padrão de etanol segundo a OMS	30
Figura 2 – Caixa de separação maternal.....	37
Figura 3 - Delineamento Experimental do grupo controle (NS).....	38
Figura 4- Delineamento Experimental do grupo submetido à SM.....	38
Figura 5 - Linha cronológica.....	39
Figura 6 - Teste de reconhecimento de objetos suas respectivas fases: treino, teste 1 e teste 2.....	41
Figura -7 Labirinto em Y durante a fase de habituação.....	42
Figura 8 - Labirinto em Y durante a de fase treino.....	43
Figura 9 - Labirinto em Y durante a de fase teste/treino reverso.....	44
Figura 10 - Reação enzimática da Catalase.....	46
Figura 11 - Reações enzimáticas do sistema glutathiona peroxidase e redutase.....	47
Figura 12 - Reação entre o TBA e uma espécie reativa ao ácido tiobarbitúrico.....	48
Figura 13 - Reação entre o DTNB e os tióis presentes na amostra formando TNB.	49
Figura 14 - Comparação do teor de etanol no sangue dos animais após uma única exposição às doses de 3g/kg e 6g/kg de etanol e salina.....	50
Figura 15 - Avaliação da fase treino em animais submetidos ao <i>binge</i> agudo.....	51
Figura 16 - Avaliação da MCD em animais submetidos ao <i>binge</i> agudo	52
Figura 17- Avaliação da MLD em animais submetidos ao <i>binge</i> agudo.....	53
Figura 18- Avaliação do treino em animais submetidos ao <i>binge</i> crônico....	54

Figura 19 - Avaliação da MCD em animais submetidos ao <i>binge</i> crônico....	55
Figura 20 - Avaliação da MLD em animais submetidos ao <i>binge</i> crônico.....	56
Figura 21 - Curva de crescimento dos animais durante a restrição alimentar em animias submetidos ao <i>binge</i> agudo.....	57
Figura 22 - Curva de crescimento dos animais durante a restrição alimentar em animias submetidos ao <i>binge</i> crônico.....	58
Figura 23 - Curva de aprendizagem do labirinto em Y em animais submetidos ao <i>binge</i> agudo.....	59
Figura 24 - Curva de aprendizagem do labirinto em Y em animais submetidos ao <i>binge</i> crônico.....	54
Figura 25 - % da taxa de acerto durante a fase de treino do labirinto em Y em animais submetidos ao <i>binge</i> crônico.....	60
Figura 26 - Dosagem de diclorofluoresceína, no CPF.....	61
Figura 27 - Dosagem de diclorofluoresceína, no hipocampo.....	61
Figura 28 - Avaliação da atividade enzimática da CAT no CPF.....	62
Figura 29 - Avaliação da atividade enzimática da CAT no hipocampo.....	63
Figura 30 - Avaliação da atividade da GPx no CPF.....	64
Figura 31 - Avaliação da atividade da GPx no hipocampo.....	64
Figura 32 - Avaliação da atividade enzimática da SOD no CPF.....	65
Figura 33 - Avaliação da atividade enzimática da SOD no hipocampo.....	66
Figura 34 - Avaliação da razão enzimática entre a SOD e a CAT no CPF.....	67
Figura 35 - Avaliação da razão enzimática entre a SOD e a CAT no hipocampo.....	68
Figura 36 - Avaliação da razão enzimática entre a SOD e a GPx no CPF.....	68
Figura 37 - Avaliação da razão enzimática entre a SOD e a GPx no hipocampo.....	69

Figura 38 - Avaliação da razão entre a SOD e o somatório da GPx e CAT no CPF.....	69
Figura 39 - Avaliação da razão entre a SOD e o somatório da GPx e CAT no hipocampo.....	70
Figura 40 - Avaliação dos níveis de TBARS no CPF.....	71
Figura 41 - Avaliação dos níveis de TBARS no hipocampo.....	71
Figura 42 - Avaliação de tióis totais no CPF.....	72
Figura 43 - Avaliação de tióis totais no hipocampo.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais espécies reativas ao oxigênio (ERO).....	26
Tabela 2 - Tempo de exploração do objeto familiar (ta_1) (s) e objeto novo (tb_2) (s) de animais submetidos ao <i>binge</i> agudo na avaliação da MCD.....	52
Tabela 3 - Tempo de exploração do objeto familiar (ta_1) (s) e objeto novo (tb_2) (s) de animais submetidos ao <i>binge</i> agudo na avaliação da MLD.....	53
Tabela 4 - Tempo de exploração do objeto familiar (ta_1) e objeto novo (tb_2) de animais submetidos ao <i>binge</i> crônico na avaliação da MCD.....	55
Tabela 5: Tempo de exploração do objeto familiar (ta_1) (s) e objeto novo (tb_2) (s) de animais submetidos ao <i>binge</i> crônico na avaliação da MLD.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH – Hormônio Adrenocorticotrópico
- AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
- ARE– elementos de resposta antioxidante
- BA – Binge agudo
- BC – Binge crônico
- BSA – Albumina bovina sérica
- CA – Corno de Amon
- CAT – Catalase
- CG – Cromatografia Gasosa
- CORT – Corticosterona
- CRH – Hormônio Corticotrópico
- CPF – Córtex pré-frontal
- DA – Dopamina
- DCFH – Dicloroidrofluoresceína
- DCF – Diclorofluoresceína
- DTNB – 5, 5-ditiobis-2-nitrobenzoico
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- GCs – Glicocorticoides
- GSH – Glutaciona/Glutaciona reduzida
- GSSH – Glutaciona oxidada
- GPx – Glutaciona peroxidase
- HHA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
- IRO – Índice de Reconhecimento de Objetos
- INT – cloreto 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio
- LP – Peroxidação Lipídica

LTD – Depressão de longa duração

LTP – Potenciação de longa duração

MCD – Memória de curta duração

MLD – Memória de longa duração

NAD⁺ – Dinucleotídio de adenina e nicotinamida oxidado

NADH – Dinucleotídio de adenina nicotinamida reduzido

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido

NMDA – N-metil D-Aspartato

Nrf 2 – Fator nuclear derivado eritroide 2

OMS – Organização Mundial da Saúde

PN – Pós-natal

RG – Receptores para glicocorticoides

SM – Separação Maternal

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

PHRS – Período hiporresponsivo ao estresse

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRO – Teste de Reconhecimento de Objetos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
	1.1 SEPARAÇÃO MATERNAL (SM).....	22
	1.1.1 Conseqüências da Separação Maternal	22
	1.1.1.1 Hiperativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA).....	22
	1.1.1.2 Estresse oxidativo.....	24
	1.1.1.3 Alterações em estruturas encefálicas.....	27
	1.1.1.3.1 Hipocampo.....	27
	1.1.1.3.2 Córtex pré-frontal (CPF).....	28
	1.2 CONSUMO DE ETANOL.....	28
	1.2.1 <i>Binge drinking</i>	29
	1.2.2 Consumo de etanol na adolescência	30
	1.2.3 Conseqüências do consumo de etanol em <i>binge</i> durante a adolescência	30
	1.2.4 Ação do etanol no Sistema Nervoso Central	31
	1.2.4.1 Indução do estresse oxidativo.....	33
2	OBJETIVOS	35
	2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3	METODOLOGIA	36
	3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	36
	3.2 SEPARAÇÃO MATERNAL.....	36

3.3 EXPOSIÇÃO AO ETANOL EM <i>BINGE</i> AGUDO.....	37
3.4 EXPOSIÇÃO AO ETANOL EM <i>BINGE</i> CRÔNICO.....	38
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
3.6 CONCENTRAÇÃO DO ETANOL NO SANGUE.....	39
3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	39
3.7.1 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO).....	39
3.7.2 Restrição alimentar.....	41
3.7.3 Labirinto em Y.....	41
3.8 EUTANÁSIA.....	44
3.9 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	44
3.10 ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	45
3.10.1 Avaliação da produção de radicais livres pela oxidação química do diclorodifluoresceína (DCFH).....	45
3.10.2 Atividade enzimática da catalase (CAT)	46
3.10.3 Atividade enzimática da Glutathione peroxidase (GPx).....	46
3.10.4 Atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD).....	47
3.10.5 Avaliação da formação de espécies reativas ao ácido tiobabúrico (TBARS).....	48
3.10.6 Determinação de Tióis totais.....	48
3.10.7 Dosagem de proteínas totais.....	49
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4 RESULTADOS.....	50

4.1	CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NO SANGUE.....	50
4.2	TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (TRO)	50
4.2.1	TRO – <i>binge</i> agudo.....	50
4.2.2	TRO – <i>binge</i> crônico.....	54
4.3	CURVA DE CRESCIMENTO DOS ANIMAIS DURANTE O PERÍODO DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR.....	57
4.4	LABIRINTO EM Y.....	58
4.5	ANÁLISES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	60
4.5.1	Produção de radicais livres pela oxidação química do diclorodifluoresceína (DCFH).....	60
4.5.2	Atividade enzimática da catalase (CAT).....	62
4.5.3	Atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx)	63
4.5.4	Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)	65
4.5.5	Relações enzimáticas entre a CAT, GPx e SOD.....	66
4.5.6	Dosagem da formação de espécies reativas ao ácido tiobabúrico (TBARS).....	70
4.5.7	Dosagem de Tióis totais.....	71
5	DISCUSSÃO.....	73
6	CONCLUSÕES.....	82
7	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPARAÇÃO MATERNAL (SM)

Os períodos pré e pós-natal são críticos para o desenvolvimento do sistema nervoso. Exposição a eventos traumáticos nas fases iniciais da vida podem afetar profundamente o desenvolvimento encefálico, promovendo efeitos de longa duração em estruturas neuronais e no comportamento, que podem se prolongar até a vida adulta (DE BELLIS et al., 1999; NEYLANDER e ROMAN, 2013; NISHI; HORII-HAYASHI; SASAGAWA, 2014). Tais eventos traumáticos possuem um importante papel etiológico em transtornos de humor, ansiedade, depressão, bem como distúrbios neurológicos, transtornos psiquiátricos e doenças neurodegenerativas (MICZEK; YAP e COVINGTON III, 2008; ODEON; SALATINO e ACOSTA, 2013). Na tentativa de mimetizar experiências traumáticas e avaliar as consequências destes eventos em modelos animais, um modelo de estresse neonatal amplamente aceito é a Separação Maternal (SM), a qual é caracterizada por sucessivas separações diárias entre os neonatos e progenitoras durante os primeiros dias pós-nascimento (PRYCE et al., 2005; NEYLANDER e ROMAN, 2013; TRACTENBERG et al., 2016).

Existem distintos protocolos de separação maternal, os quais se diferenciam tanto pelo número de dias de separação quanto pelo tempo de duração de cada sessão de separação. Há a separação maternal com 5 minutos de duração, curta duração com 15 minutos, longa duração, de 180 a 360 minutos, e a privação materna, com duração de 24 horas (KLOET, ROTS e COOLS, 1996; NEYLANDER e ROMAN, 2013; SADEGHI, PEERI e HOSSEINI, 2016). O modelo de SM, bem como a privação materna, promove perturbações no cuidado materno, causando estresse aos filhotes neonatos como alterações comportamentais, além de distúrbios fisiológicos como aumento da liberação de citocinas inflamatórias, diminuição da neurogênese, aumento do nível basal de glicocorticoides e hiperativação do eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal (HHA) (HUOT et al., 2002; PRYCE et al., 2005; FRANKLIN et al., 2012; SILBERMAN, ACOSTA e ZORRILLA, 2016).

1.1.1 Consequências da Separação Maternal

1.1.1.1 Hiperativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA)

A resposta fisiológica aos eventos estressantes é derivada da ativação do eixo HHA, do sistema nervoso autônomo e do sistema imunitário, cujos mediadores

fisiológicos são: glicocorticoides, catecolaminas e citocinas (SAPOLSKY, ROMERO e MUNCK, 2000). Diversos estudos mostram que a função do eixo HHA é alterada através de mecanismos epigenéticos ocorridos nos períodos iniciais da vida e que essas alterações persistem até a vida adulta (NISHI, HORII-HAYASHI e SASAGAWA, 2014; SPIGA et al., 2014; BAUCHAINE; CROWELL e HSIAO, 2015; JAIMES-HOY et al., 2016). Tal eixo é responsável pelo controle dos níveis de glicocorticóides na circulação e por promover a resposta ao estresse (NISHI; HORII-HAYASHI e SASAGAWA, 2014; SPIGA et al., 2014).

As experiências estressantes funcionam como gatilho para a ativação do núcleo paraventricular do hipotálamo, o qual libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e arginina vasopressina na circulação portal hipotálamo-hipofisária. A ligação do CRH a seus receptores na hipófise anterior estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), que, por sua vez, estimula a síntese e liberação de glicocorticoides pelo córtex da glândula adrenal sendo liberado cortisol em humanos e corticosterona (CORT) em roedores (SAPOLSKY, ROMERO e MUNCK, 2000; CHARMANDAR, TSIGOS e CHROUSOS, 2005).

Os glicocorticoides exercem retroalimentação negativa sobre sua liberação, uma vez que se ligam a seus respectivos receptores presentes na hipófise anterior e no hipotálamo e, desta forma, promovem a modulação na transcrição dos componentes do eixo HHA e cessam a resposta ao estresse. A resposta neuroendócrina ao estresse possui um papel importante na adaptação ao ambiente. (SAPOLSKY, ROMERO e MUNCK, 2000; CHARMANDAR, TSIGOS e CHROUSOS, 2005; JOHN et al., 2007). Entretanto, tal eixo encontra-se quiescente durante as duas primeiras semanas de vida caracterizado por concentrações quase indetectáveis de glicocorticoides e de ACTH, e por elevados números de receptores para glicocorticoides (RG) em diversas estruturas encefálicas, tal momento é chamado de período hiporresponsivo ao estresse (PHRS) (WALKER et al., 2001; LAJUD et al., 2012). A SM, porém atua como um agente estressor, logo, promove ativação do eixo durante o PHRS que por sua vez estimula o aumento da liberação de ACTH e CORT, conforme foi observado primeiramente por Plotsky e Meaney (1993). Algumas regiões encefálicas como o hipocampo, possuem uma maior sensibilidade aos níveis elevados de glicocorticoides, uma vez que apresentam elevados RG, o que pode culminar em danos neuronais (MCINTOSH e SAPOLSKY, 1996; MCEWEN, 2007; KLOET et al,

2016). Entretanto, a exposição prolongada aos glicocorticoides induz uma diminuição na expressão dos RG e conseqüentemente, promove uma diminuição da retroalimentação negativa quando os animais chegam à vida adulta (HEIM e NEMEROFF, 2001; ROMANO-LOPEZ et al., 2012).

O aumento da CORT em animais experimentais, como aves e roedores, contribui para alterações comportamentais e metabólicas, comprometendo o desenvolvimento neuronal dos animais e tornando-os mais suscetíveis ao estresse na vida adulta (DORN, 2014; NISHI; HORII-HAYASHI e SASAGAWA, 2014). Como conseqüências da ativação do eixo HHA observa-se o prejuízo no desenvolvimento do sistema nervoso central, alterações comportamentais como déficits cognitivos, além de alterações neuroquímicas, com o aumento do estresse oxidativo (GUPTA, RADHAKRISHNAN e KURHE, 2015; SPIERS et al., 2015; BORROW et al., 2016; SILBERMAN; ACOSTA e ZORRILLA, 2016). Em crianças e adolescentes, humanos, ativação do eixo HHA está relacionada com eventos estressantes como separação materna precoce, violência física, divórcio parental, abusos sexuais e psicológicos e exposição a áreas de conflitos de guerra (SCHIAVONE, COLAIANNA e CURTIS, 2015). Jovens que passaram por alguma situação estressante durante a infância podem apresentar alterações comportamentais persistentes capazes de se prolongar até a vida adulta (DE BELLIS et al., 1999; NEYLANDER e ROMAN, 2013). Ansiedade, depressão, transtorno bipolar, transtornos de personalidade, transtorno de déficit de atenção e abuso de drogas são listados como alguns exemplos das alterações comportamentais (SCHIAVONE, COLAIANNA e CURTIS, 2015; ODEON; SALATINO e ACOSTA, 2013). A nível molecular, já foi encontrado elevados níveis de cortisol na saliva de crianças após sofrerem acidente de carro e liberação de citocinas inflamatórias. Como conseqüência, observam-se as alterações na neurogênese hipocampal, ativação da micróglia e da apoptose neuronal (PERVANIDOU e CHROUSOS, 2012). No entanto, diversos estudos relacionam a ativação do eixo com a indução ao estresse oxidativo no sistema nervoso central (PLOTSKY E MEANEY, 1993; SCHIAVONE et al., 2013; SPIERS et al., 2015).

1.1.1.2 Estresse oxidativo

Radical livre é qualquer espécie química capaz de existir com elétrons desemparelhados nos orbitais atômicos. Surgem pela perda ou adição de um único

elétron a um composto não radicalar, podendo ser originado através de uma fissão homolítica, na qual ocorre o rompimento da ligação covalente e, assim, formam-se duas espécies radicalares, cada uma com o acréscimo de um elétron (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). O elétron livre caracteriza o radical livre e pode estar associado a átomos de nitrogênio, enxofre, e principalmente, ao oxigênio. Quando o oxigênio molecular sofre uma redução parcial eletrônica ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) como ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, oxigênio singlete, óxido nítrico, entre outras espécies, conforme mostra a tabela 01 (RAHMAN et al., 2012; PHANIENDRA, JESTADI e PERIYASAMY, 2015). A formação de ERO ocorre naturalmente em organismos vivos, proveniente de reações bioquímicas para manter a homeostasia como crescimento e senescência celular, respiração celular, apoptose, processos inflamatórios e participação na sinalização celular redox como segundos mensageiros. Entretanto, tais espécies são altamente reativas e instáveis, e podem reagir com alvos biológicos (BECKMAN e AMES, 1999; WEI et al., 2001; ZOPPI et al., 2003).

Embora os mecanismos entre a formação de EROs e o aparecimento de diversas doenças não esteja esclarecido, sabe-se que tais espécies possuem participação direta em mecanismos fisiopatológicos que promovem a continuidade e complicações presentes em processos patológicos. Apesar de tais complicações, o organismo possui sistemas de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos que apresentam a capacidade de neutralizar tais espécies reativas (ROVER-JÚNIOR, HÖEHR e VELLASCO, 2001). O sistema de defesa não enzimático é composto por vitamina A (retinol), vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), glutathiona (GSH), cisteína, tioredoxina e minerais antioxidante como cobre, ferro, selênio, manganês e zinco. Já o sistema enzimático antioxidante está relacionado com a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (HITCHON e EL-GABALAWY, 2004; FILIPPIN et al., 2008).

A exposição constante a diferentes protocolos de estresse bem como o abuso de drogas, induz a formação de um quadro de estresse oxidativo, o qual se caracteriza pelo desequilíbrio entre o aumento da produção de espécies altamente reativas e a diminuição da capacidade antioxidante tecidual (FONTELLA et al., 2005; DE VASCONCELLOS et al., 2006; ENACHE et al., 2008; NG et al., 2008; HOVATTA, JUHILA e DONNER, 2010; SCHIAVONE et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014). Estudos

apontam a presença elevada de marcadores de estresse oxidativo e inflamação em ratos submetidos à SM (HOLLAND et al., 2014). Como consequência, especula-se que a presença de tais marcadores possa ser a justificativa molecular para a promoção de distúrbios neurológicos, comportamentais, psiquiátricos e neurodegenerativos, observados em animais submetidos à SM (MICZEK; YAP e COVINGTON III, 2008; SPIERS et al., 2015). Como citado anteriormente, a SM promove a hiperfunção do eixo HHA e liberação exacerbada de CORT e inúmeros estudos correlacionam de glicocorticoide com o aumento do estresse oxidativo (MCINTOSH, CORTOPASSI e SAPOLSKY, 1998; LIU et al., 2002; COSTANTINI, MARASCO e MOLLER, 2011; SCHIAVONE et al., 2013; SCHIAVONE, COLAIANNA e CURTIS, 2015; CHITTY et al., 2015).

Existem diversas estratégias experimentais para mensurar o estresse oxidativo em tecidos biológicos, tais como através da avaliação da peroxidação lipídica (LP), carbonilação de proteínas, bem como da atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e GPx (VASCONCELOS et al., 2007; MOORE et al., 2015). Vários desses marcadores de estresse oxidativo estão alterados em função de altos níveis de CORT, o que é observado em diversas estruturas encefálicas, como núcleo accumbens, hipotálamo, hipófise, estriado, córtex pré-frontal (CPF), hipocampo entre outras (FONTANELLA et al., 2005; DERIN et al., 2006; MCEWEN, 2007; AISA et al., 2009; MUHAMMAD e KOLB, 2011; LAJUD et al., 2012; FREEDOM et al., 2014; GUPTA, RADHAKRISHNAN e KURHE, 2015; SPIERS et al., 2015; SASAKI; LEUTGEB, S; LEUTGEB, K, 2015).

ERO

RADICALARES	NÃO RADICALARES
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Hidroxila, $\cdot OH$	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxila, RO_2^{\cdot}	Ácido hipobromoso (HOBr)
Alcoxila, RO^{\cdot}	Ozônio (O_3)
Hidroperoxila, HO_2^{\cdot}	Oxigênio singlete

Tabela 1: Principais espécies reativas ao oxigênio (ERO). Adaptada. RAHMAN et al, 2012.

1.1.1.3 Alterações em estruturas encefálicas

Inúmeras estruturas encefálicas apresentam seu desenvolvimento alterado pelo estresse neonatal, como o estriado, núcleo accumbens, amígdala, hipotálamo, hipófise, hipocampo e CPF (MCEWEN, 2007; AISA et al., 2009; MUHAMMAD e KOLB, 2011; LAJUD et al., 2012; FREEDOM et al., 2014; SASAKI; LEUTGEB, S; LEUTGEB, K, 2015). Este trabalho se limitou a avaliação dos efeitos do estresse oxidativo presente no hipocampo e CPF.

1.1.1.3.1 Hipocampo

O hipocampo é constituído por duas camadas finas de neurônio dobradas uma sobre a outra. Uma camada é composta pelo giro denteado e a outra pelo Corno de Amon, que por sua vez é dividido em áreas CA1, CA2, CA3 e CA4 (BEAR, CONNORS, PARADISO, 2002). A grande via de entrada de informações no hipocampo é estabelecida pelo córtex entorrinal, que conduz as informações ao hipocampo por um feixe de axônios que segue a via perforante e estabelece sinapses com neurônios do giro denteado. Os neurônios do giro denteado se projetam e estabelecem sinapses com os neurônios da região CA3, e as eferências dessa região sofrem ramificações, estabelecendo sinapses em CA1 (através das de fibras colaterais de Scheaffer), ou projetando-se a partir do hipocampo pelo fórnix (VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTE, 2009).

O hipocampo é a estrutura encefálica responsável pela aquisição da memória espacial, pelo processamento da memória de curto prazo (MCD) para longo prazo (MLD), por processos relacionados às emoções e aprendizado, além de ser um dos componentes do sistema límbico (IZQUIERDO et al., 1998; DAVACHI e DUBROW, 2015). Diante disso, algumas situações podem promover danos ao hipocampo o que leva a prejuízos na memória e aprendizado (SCHIAVONE; COLAIANNA; CURTIS, 2015). Mais especificamente, eventos estressantes emocionais ou até mesmo agressões químicas como consumo de etanol, são capazes de desencadear um quadro de estresse oxidativo hipocampal que podem ser a causa etiológica de danos permanentes no encéfalo bem como alterações comportamentais (BRIONES e WOODS, 2013; VETRENO e CREWS, 2015; SPIERS et al., 2015).

1.1.1.3.2 Córtex pré-frontal (CPF)

O CPF está localizado na extremidade anterior dos hemisférios cerebrais ele pode ser considerado como a região do córtex que recebe aferências de outras regiões corticais (KOLB et al., 2012). O CPF é responsável pelo comportamento, interação social, aquisição de novas informações, concentração, compreensão e soluções de problemas, memória, e apresenta um longo período de desenvolvimento até chegar a sua maturação completa (FUSTER, BODNE e KROGER, 2000; LUNA, PADMANABHAN e O'HEARN, 2010; TEIXEIRA et al., 2014; SASAKI; LEUTGEB, S; LEUTGEB, K, 2015), o que o torna mais suscetível a alterações funcionais como as vistas em transtornos psiquiátricos.

A exposição ao estresse compromete o desenvolvimento do CPF (WHITE, 2003; THOMPSON et al., 2004; KOLB et al., 2012; SPEAR, 2015). Eventos traumáticos durante período pré e pós-natal geram prejuízos em tal estrutura, com alterações neuroquímicas e comportamentais que permanecem durante a vida adulta (BELLIS et al., 1999; AISA et al., 2009; ZIMMERBERG e SAGESER, 2011; DE NEYLANDER e ROMAN, 2013; NISHI; HORII-HAYASHI e SASAGAWA, 2014). Além disso, a função do CPF também pode ser modulada durante a adolescência, visto que estima-se que sua maturação esteja totalmente finalizada somente em torno dos 30 anos de idade em humanos (SOWELL et al., 1999; CHAN et al., 2011). O CPF também integra o circuito de gratificação encefálica, o qual está fortemente associado com os processos neurais relacionados ao abuso de drogas (GARDNER, 2005). Portanto, a exposição a eventos estressantes durante o período neonatal, associada à maturação tardia do CPF, pode contribuir para tornar os adolescentes alvos vulneráveis às alterações emocionais, cognitivas e ao abuso de drogas, como episódios pesados da ingestão de etanol (MICZEK et al., 2008; ODEON; SALATINO e ACOSTA, 2013; VANDENBERG et al., 2015).

1.2 CONSUMO DE ETANOL

O consumo de etanol é realizado há séculos por diversos povos em todo o mundo, e, até hoje, esse hábito está presente em nossa sociedade. O etanol é uma substância amplamente consumida e representa um problema de saúde pública, visto que contribui para incidência de cirrose hepática e câncer, doenças infecciosas como tuberculose, HIV/AIDS, transtornos comportamentais e psiquiátricos, doenças

crônicas como hipertensão arterial e diabetes, intoxicações entre outros (WHO, 2014). Além disso, o consumo de etanol ainda apresenta o grande impacto social, pois está relacionado com vandalismo, desordem pública, problemas familiares, homicídios, abuso de menores, problemas financeiros e custos sociais (MELONI e LARANJEIRA, 2001). Em função de todos os transtornos de saúde e sociais, o consumo do álcool é a causa de aproximadamente 3,3 milhões de mortes por ano no mundo e, quando se compara com todos os óbitos que acontecem mundialmente, temos que 5,9% destes estão relacionados somente com as consequências do consumo de etanol (WHO, 2014).

No Brasil, a ausência de dados oficiais dificulta o acompanhamento da evolução do consumo de etanol. Entretanto, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016) divulgou dados sobre o consumo de etanol em cada região do país e por faixa etária. A região sudeste apresentou o maior número de habitantes que apresentaram consumo abusivo de etanol e a faixa etária de 18 a 24 anos correspondeu a 20,1% da população analisada na pesquisa. O último relatório sobre o consumo de etanol no mundo foi publicado em 2014 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Neste relatório, a organização observou aumento dos níveis de consumo de etanol em regiões europeias e no continente americano, com níveis intermediários de consumo na África e no pacífico e níveis mais baixos de consumo na região do mediterrâneo e sudoeste asiático. Além disso, um dado que chamou atenção da OMS foi o aumento de consumo episódico de etanol, ou o consumo em *binge*, entre os adolescentes na faixa etária de 15 a 19 anos nos continentes europeu, americano e no pacífico.

1.2.1 *Binge drinking*

O *binge drinking*, ou beber em *binge*, é a designação usada para determinar o uso pesado episódico de etanol (TWIGG e MOON, 2013). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a ingestão de 6 doses ou o equivalente a 60g de álcool puro ou mais, em uma única ocasião uma vez ao mês caracteriza a prática do *binge drinking*. O consumo em *binge* tem chamado a atenção da comunidade científica por estar sendo praticado pelo público adolescente, e este comportamento tem aumentado em diversas regiões do mundo.

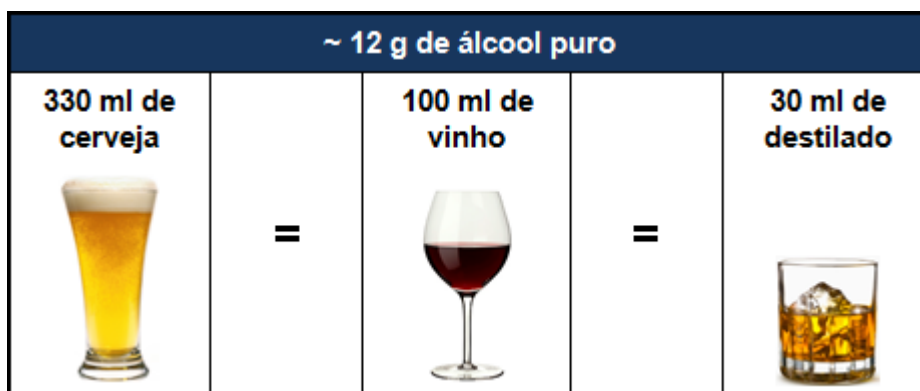


Figura 1: Dose padrão de etanol segundo a OMS. CISA, 2016.

1.2.2 Consumo de etanol na adolescência

Nota-se que o consumo episódico pesado de etanol é cada vez mais comum entre os adolescentes podendo contribuir para danos neurais, déficits cognitivos e mudanças comportamentais que podem se prolongar até a vida adulta (SCHAAFFHAUSEN et al., 2009; CIPPITELLI et al., 2012; LIU e CREWS 2015). Estudos mostram que ratos adolescentes, submetidos ao teste de preferência de etanol, apresentaram maior preferência pela solução etanólica de maior concentração em relação ao grupo controle adulto (BELL et al., 2003). Um provável esclarecimento a esse experimento pode estar associado à maturação do circuito inibitório, uma vez que os adolescentes possuem maior resistência aos efeitos sedativos do etanol (DOREMUS, VARLINSKAYA e SPEAR, 2010; VANDENGERG et al., 2015). Conseqüentemente, a exposição ao etanol na adolescência, período em que acontecem modificações e alterações significativas na organização encefálica (CREWS et al., 2006), contribui, possivelmente, para uma maior vulnerabilidade aos efeitos de recompensa (FUMAGALLI et al., 2007; FLEMING et al., 2012; RODRIGUEZ-ARIAS et al., 2016).

1.2.3 Conseqüências do consumo de etanol em *binge* durante a adolescência

O consumo crônico de etanol durante a adolescência favorece a diminuição do peso e volume encefálico, e o aparecimento de doenças neurodegenerativas (SCHAAFFHAUSEN et al., 2009; KOSS et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014). Como conseqüências dos danos nas estruturas encefálicas afetadas temos hipertrofia dos astrócitos, presença de marcadores inflamatórios que promovem ativação microglial, e comprometimento da neurogênese hipocampal (MORRIS et al., 2010; MCCLAIN et

al., 2011; SCHIAVONE, 2013; TEIXEIRA et al., 2014). Indivíduos expostos ao etanol sofrem alterações nos sistemas gabaérgico, dopaminérgico, glutamatérgico, serotoninérgico e opióide, e conseqüentemente, apresentam alterações comportamentais (WONG et al., 2008; PEDRELLI et al., 2013). Essas alterações comportamentais ocorrem, possivelmente, devido aos danos permanentes no sistema nervoso central, em distintas estruturas encefálicas como hipocampo, CPF e cerebelo (PASCUAL et al., 2007; VETRENO e CREWS, 2015). No âmbito das mudanças comportamentais, é notável a associação entre o consumo excessivo de etanol e os sintomas de depressão, ansiedade, déficit de memória, aumento do risco de abuso de drogas, impulsividade entre outros (SCHULTEIS et al., 2008; BRIONES e WOODS, 2013; PASCUAL et al., 2014).

1.2.4 Ação do etanol no Sistema Nervoso Central

O consumo do etanol é largamente prejudicial à saúde, uma vez que tal substância é capaz de promover diversas alterações nos principais sistemas neuroquímicos existentes no SNC (WONG et al., 2008; PEDRELLI et al., 2013). Tal substância atua sobre a neurotransmissão gabaérgica, glutamatérgica, dopaminérgica, serotoninérgica, opioide e endocanabinoide e em diversos receptores (CAMARINI e PAUTASSI, 2016). Entretanto, os efeitos do etanol são distintos de acordo com a sua exposição aguda ou crônica (LINDEMEYER et al., 2014).

Em linhas gerais, o etanol influencia um desequilíbrio entre as vias encefálicas inibitórias e excitatórias e como consequência, promove ataxia, efeito ansiolítico e sedação (GROBIN et al., 1998; COSTARDI et al., 2015). Tais efeitos são decorrentes de alteração da neurotransmissão inibitória ou antagonismo da neurotransmissão excitatória, ou seja, após a ingestão aguda, o etanol se liga ao receptor inibitório GABA_A e, assim, favorece um maior tempo de abertura do canal de íons cloreto, o que contribui para o aumento do influxo destes íons para o neurônio pós-sináptico (FÖRSTERA et al., 2016). Além disso, a exposição aguda ao etanol é capaz de provocar o aumento da liberação de GABA na fenda sináptica (BREESE et al., 2006; VALENZUELA e JOTTY, 2015). No entanto, no consumo crônico, o etanol age de forma diferente sendo capaz de estimular a síntese de novas subunidades de receptores GABA (LINDEMEYER et al., 2014).

O etanol modula os receptores ionotrópicos glutamatérgicos, os quais são divididos em duas classes: receptores NMDA e receptores não NMDA. Os receptores não NMDA, por sua vez, são subdivididos em receptores AMPA e cainato. O efeito antagonista do etanol se dá pela inibição pós-sináptica dos receptores NMDA e inibição dos receptores cainato. O consumo crônico gera uma hiper-regulação de subunidades dos receptores NMDA em estruturas encefálicas inclusive em ratos adolescentes (SWARTZWELDER et al., 2016).

Outro sistema que o etanol exerce influência é o dopaminérgico, que está envolvido no aprendizado modulado por reforço positivo (SCHULTZ, 2015). A ingestão aguda de etanol induz o aumento de dopamina (DA) sináptica no núcleo accumbens, e a administração repetitiva está associada às alterações dos receptores D₂ e D₄ (GILPIN; RICHARDSON; KOOB, 2008; LÜSCHER e MALENKA, 2011). O núcleo accumbens, estrutura inervada pela via dopaminérgica mesolímbica, também possui receptores opioides que, quando são expostos agudamente ao etanol, liberam endorfinas (JOB et al., 2007). Em consequência disso, ocorre a ativação do receptor opioide μ presente tanto no tegmento ventral quanto no núcleo accumbens e isso favorece a liberação de DA. Desta forma, os efeitos existentes do etanol no sistema mesolímbico dopaminérgico de recompensa, e as possíveis alterações com o SNC reagentes ao etanol podem estar associados com possíveis alterações dos sistemas opioides (PASTOR e ARAGON, 2006). A atuação do etanol é vasta em diversos sistemas neuronais, inclusive no sistema serotoninérgico, em que o uso crônico de etanol provoca hiper-regulação dos receptores serotoninérgicos. Além disso, o etanol parece atuar no sistema colinérgico refletindo na diminuição da expressão da acetilcolinesterase (VETRENO et al., 2014). Possivelmente, as alterações existentes do sistema dopaminérgico também estão relacionadas com as alterações dos níveis de receptores serotoninérgicos (PIVOVARCHIK, 2004; BOUTROS et al., 2015).

O sistema endocanabinoide também é afetado pela ação do etanol, em que este promove a ativação dos receptores CB1 alterando as atividades da DA, GABA e glutamato, bem como os circuitos de gratificação encefálica (COSTARDI et al., 2015; VARODAYAN et al., 2016). Além de todos os sistemas citados, o etanol é capaz de atuar no sistema endócrino através da indução do aumento da liberação de CRH no sistema nervoso central e no sangue (KOOB e KREEK, 2007).

1.2.4.1 Indução do estresse oxidativo

Sabe-se que o etanol promove alterações nos mecanismos pré e pró-oxidantes. Estudos sugerem que tais mudanças estejam relacionadas com o aumento da concentração de EROs que, conseqüentemente, promove a diminuição das atividades nos mecanismos antioxidantes existentes no organismo (TURCATEL; FUNCHAL e GOMES, 2012). O mecanismo pelo qual o etanol promove o estresse oxidativo é através do seu metabolismo pela CYP2E1, uma outra via metabólica, que converte o etanol em um composto instável que se decompõe a acetaldeído e posteriormente é metabolizado a acetato pela aldeído desidrogenase mitocondrial (CRABB et al., 2004; DINIS-OLIVEIRA, 2016). Tal processo ocorre a partir do consumo de níveis elevados de NADPH, que é convertido para NADP⁺, e isto limita a disponibilidade deste para regenerar a glutathiona reduzida (GSH), logo, a ativação desta via metabólica pelo etanol torna o sistema de defesa antioxidante mais vulnerável aos efeitos dos ERO (CARO e CERDEBAUM, 2004; FERGUSON e BRIDGE, 2016; DINIS-OLIVEIRA, 2016).

Devido à elevada taxa de atividade oxidativa da CYP2E1, o metabolismo do etanol pode chegar a produzir indiretamente a formação de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio, desta forma, contribui para o aumento da formação de EROs (GORSKY, KOOP, COON, 1984; FEIERMAN, WINSTON, CEDERBAUM, 1985; DICKER e CEDERBAUM, 1987). Embora haja um mecanismo de defesa antioxidante no organismo, como o sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, a produção excessiva de EROs juntamente com a diminuição das defesas antioxidantes caracteriza o quadro de estresse oxidativo capaz de gerar diversos danos ao organismo (HITCHON e EL-GABALAWY, 2004; FILIPPIN et al., 2008; SCHIAVONE, COLAIANNA, CURTIS, 2015). Os possíveis danos estão relacionados com neurotoxicidade e neurodegeneração que culmina na diminuição de proliferação e morte neuronal, no aumento da peroxidação lipídica e de processos oxidativos indicadores de danos na membrana neuronal (ENACHE et al., 2008; KOSS et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014; GUEST et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2016). Como consequência, observa-se que o consumo de etanol em *binge* contribui para o aparecimento de outras complicações e comprometimento da saúde, como aumento da vulnerabilidade a doenças infecciosas, intoxicação, câncer, cirrose hepática e doenças cardiovasculares (WHO, 2014). Sabe-se que o consumo de etanol, em *binge*

está cada vez maior entre os adolescentes, e muitos autores afirmam que o abuso desta droga é a entrada principal para o abuso de outras substâncias ilícitas. Tal consumo abusivo pode ser agravado por eventos estressantes, incluindo aqueles ocorridos durante o período neonatal. É importante reiterar que o abuso de drogas é a causa de grandes problemas de saúde que desencadeiam impactos nos sistemas de saúde, tanto o público quanto o privado, na economia do país e, principalmente, contribui para o aumento da violência na sociedade. Diante do exposto, nota-se a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que venham a ampliar o entendimento dos efeitos da separação maternal sobre as consequências do consumo de etanol na adolescência.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetiva avaliar, através da análise dos parâmetros bioquímicos e comportamentais, os efeitos do consumo agudo e crônico de altas doses de etanol (consumo em “*Binge*”) em ratos adolescentes submetidos à separação maternal nos primeiros momentos de vida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos dos tratamentos, crônico e agudo, sobre o comportamento animal, por meio da análise da memória declarativa e flexibilidade comportamental.
 - Através do Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) para avaliar a memória declarativa de curta e de longa duração;
 - Através do protocolo do labirinto em Y para avaliar a memória declarativa espacial e a flexibilidade comportamental.
- Avaliar os parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo no CPF e hipocampo através da medida de:
 - Produção de radicais livres pela oxidação química da diclorodifluoresceína (DCFH);
 - Atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD;
 - Níveis de peroxidação lipídica através da produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
 - Dosagem de tióis totais.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para obtenção das ninhadas, 36 ratas fêmeas Wistar virgens, e 10 ratos machos fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo foram colocados em caixas de polipropileno (49cm x 34cm x 16cm) para a realização do cruzamento, seguindo a proporção, de 3 ratas para cada macho. As ratas ficaram no cruzamento durante 15 dias e, após este período, foram isoladas, individualmente, em caixas individuais de polipropileno (30cm x 20cm x 13cm). Toda gestação destas fêmeas foi acompanhada até o nascimento dos filhotes. No segundo dia após o nascimento, foi realizada a padronização das ninhadas, as quais ficaram restritas ao número máximo de oito filhotes machos por rata. Todos os animais foram submetidos ao ciclo claro-escuro de 12 horas sincronizadas por timer, com a temperatura ambiente mantida entre $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com comida e água *ad libitum*. As ninhadas foram organizadas em dois grupos: ninhadas não manipuladas (que permaneceram nas caixas junto com as respectivas mães durante todo o período de amamentação) e ninhadas submetidas à separação maternal. Toda a manipulação, os cuidados e experimentos realizados nos animais estiveram em conformidade com os princípios éticos da pesquisa em animais estabelecidos pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo sob nº do protocolo UFES - CEUA 26/2015.

3.2 SEPARAÇÃO MATERNAL

O protocolo da separação maternal foi realizado com os filhotes a partir do 2º dia de vida até o 15º dia, ininterruptamente, sempre na fase clara do ciclo, iniciando às 12h00 e com duração de 180 minutos. Para tanto, as mães foram removidas e alocadas individualmente em outra caixa de polipropileno e (30cm x 20cm x 13cm) forrada com maravalha e com água e comida à vontade. Em seguida, os filhotes foram alocados em caixas de polipropileno (49cm x 34cm x 16cm) forradas com algodão e maravalha e divididas em 8 espaços individuais, sendo colocados isoladamente cada um em um dos espaços (figura 2). A separação foi realizada em uma sala distinta da qual se encontravam as progenitoras. Após a finalização da SM, os filhotes retornaram para as respectivas mães. O grupo controle não foi manipulado durante os 15 primeiros dias de vida, exceto para os procedimentos necessários para manutenção

da higiene. Todos os animais sofreram o desmame a partir do 21º dia de vida e, no 35º dia de vida foram randomicamente organizados em seis grupos experimentais, submetidos ou não à administração de etanol em *binge*.



Figura 2: Caixa de separação maternal.

3.3 EXPOSIÇÃO AO ETANOL EM *BINGE* AGUDO

O protocolo de *binge* agudo teve início quando os animais atingiram o 35º PN, ou seja, na adolescência. A administração intragástrica (IG) da solução etanólica nas concentrações 10% e 20 % v/v para as doses de 3g/kg e 6g/kg, respectivamente, foi realizada uma vez ao dia durante três dias consecutivos, tendo como controle a administração de solução salina. Antes de iniciar a gavagem, a água e a comida dos animais foram suspensas durante 30 minutos (tal procedimento foi necessário a fim de evitar possíveis transtornos ao animal, como vômitos). É importante ressaltar que o volume para cada dose foi dividido em duas porções de mesma concentração e volume sendo administrados com um intervalo de 30 minutos entre elas. A gavagem foi realizada durante a fase clara do ciclo, às 12h00min. Vinte e quatro horas após a última dose de etanol, os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

3.4 EXPOSIÇÃO AO ETANOL EM *BINGE* CRÔNICO

O protocolo de *binge* crônico teve início quando os animais atingiram o 35^o PN e foi realizado durante 20 dias com a utilização de 10 doses (etanol 3g/kg ou 6g/kg) no total (dois dias com administração de etanol seguidos por dois dias de intervalo), tendo como controle a administração de solução salina. Tal qual no *binge* agudo, a administração do etanol foi feita por gavagem e foi precedida pela suspensão de água e comida nos 30 minutos anteriores ao procedimento. O volume para cada dose foi dividido pela metade, gerando duas administrações de mesma concentração e volume dados com intervalo de 30 minutos entre elas. A gavagem foi realizada durante a fase clara do ciclo, às 12h00min. E 24 horas após a última dose de etanol, os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

Tanto no protocolo de *binge* agudo quanto no de crônico, os animais foram expostos a duas concentrações distintas de etanol. Para tanto, foram preparadas duas soluções, uma solução a 10% v/v de etanol e outra solução a 20% v/v para as doses de 3g/kg e 6g/kg, respectivamente.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram formados dois grandes grupos de ratos: o primeiro grande grupo foi constituído por animais submetidos à Separação Maternal (SM). Tal grupo, foi dividido em *binge* agudo (BA), subdividido em 3 grupos, de acordo com a dose de etanol (3g/kg e 6g/kg) e salina, e *binge* crônico (BC), também subdividido em 3 grupos (3g/kg e 6g/kg) e salina. Já o outro grande grupo foi constituído por animais controle, ou seja, aqueles que não sofreram a separação maternal (NS), no qual foi dividido em BA e BC, e subdividido conforme descrito anteriormente para os animais submetidos à SM. O “n” de cada grupo variou entre 9 e 15 ratos (figuras 3 e 4).

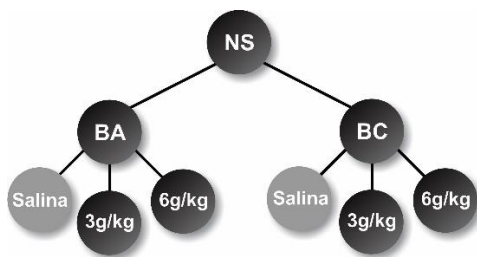


Figura 3: Delineamento experimental do grupo controle (NS).

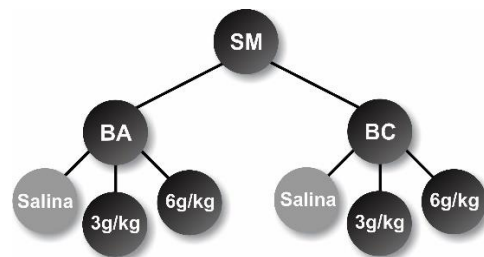


Figura 4: Delineamento experimental do grupo submetido à SM.

Todos os procedimentos realizados neste trabalho seguiram a ordem representada na linha cronológica (figura 5).

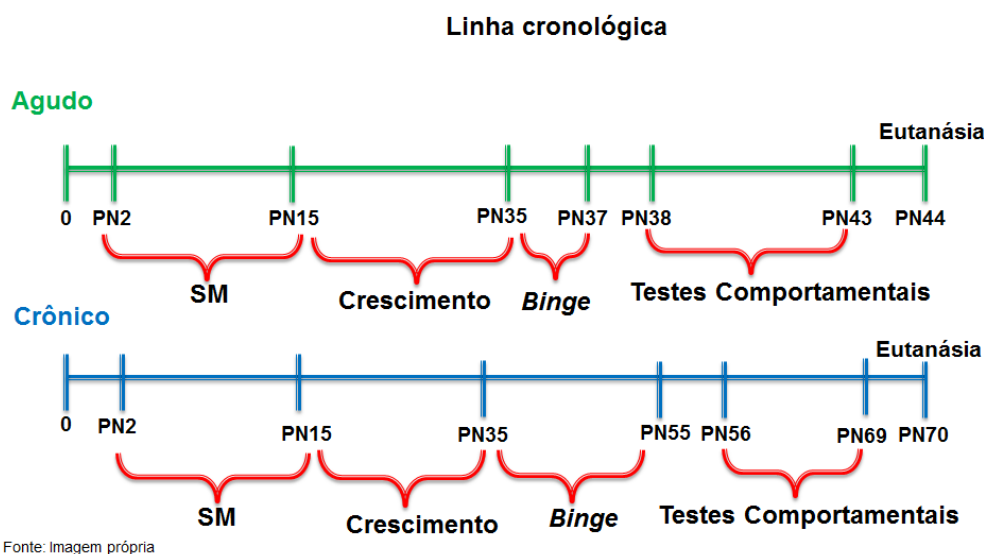


Figura 5: Linha cronológica durante o período pós-nascimento (PN) dos animais submetidos aos protocolos.

3.6 CONCENTRAÇÃO DO ETANOL NO SANGUE

Foi conduzido um grupo adicional de 12 ratos machos Wistar, no qual sofreu gavagem com doses únicas de etanol a 3g/kg (n = 4) e a 6g/kg (n = 4) e salina, para avaliação da alcoolemia. Uma hora após a gavagem, os animais foram decapitados e o sangue coletado e analisado no equipamento de cromatografia gasosa Varian 450-GC/FID com detector de ionização em chama. As análises foram realizadas em colaboração com o Departamento Médico Legal da Superintendência de Polícia Técnico-Científica do estado do Espírito Santo.

3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.7.1 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)

O teste de reconhecimento de objetos foi executado e adaptado conforme proposto por ENNACEUR; DELACOUR, 1988 e IZQUIERDO et al., 1998. Utilizou-se uma arena retangular de polipropileno de cor branca (86,5cm x 55cm x 47,5cm) e os objetos foram colocados equidistantes na caixa, a 15cm das paredes laterais. Os procedimentos foram realizados durante o ciclo claro, iniciando as 08h00min e a limpeza do aparato e objetos foi realizada com a solução de álcool a 70% entre um animal e outro. O procedimento foi dividido em quatro etapas.

Habituação: No primeiro dia, 24 horas após a exposição à última dose de etanol, os animais foram expostos ao aparato, no qual foi realizado o TRO, por um período de 5 min. Nesta fase não havia a presença de nenhum objeto e o objetivo era apenas habituar os animais ao aparato em questão.

Treino: No segundo dia os animais foram colocados na mesma caixa que na fase de habituação, porém a caixa continha dois objetos idênticos de mesmo material e a atividade exploratória dos animais em relação aos objetos foi avaliada por 5 min (figura 6).

Teste 1: Avaliação da memória de curta duração (MCD) - Ainda no segundo dia, 1,5h após a primeira exposição aos objetos, os animais foram expostos novamente ao aparato, que desta vez continha um objeto familiar (usado na sessão treino) e um segundo objeto com características semelhantes (objeto novo) (figura 6).

Teste 2: Avaliação da memória de longa duração (MLD) - No terceiro dia, 24 horas após a primeira exposição dos animais aos objetos, os animais foram avaliados novamente no aparato, sendo expostos ao objeto familiar e a um terceiro objeto de cor, forma, dimensões e textura totalmente distintas dos anteriores (figura 6).

Os animais submetidos ao *binge* agudo iniciaram o TRO no 38º PN, enquanto que os animais submetidos ao *binge* crônico iniciaram o teste no 56º PN. O ato de cheirar e tocar os objetos foram considerados como atividade exploratória do animal. Os mesmos grupos de animais foram submetidos a todas as etapas do TRO. Todos os testes de reconhecimento de objetos foram gravados em vídeo e posteriormente analisados. O tempo de exploração de cada um dos objetos foi cronometrado durante os períodos de exposição ao aparato e para a análise dos resultados, utilizou-se o índice de reconhecimento de objetos (IRO), o qual é calculado pela fórmula $Tb2 / (Ta1 + Tb2)$ onde Ta1 é o tempo gasto para explorar o objeto familiar e Tb2 é o tempo gasto para explorar o novo objeto. O IRO foi multiplicado por 100 para melhor evidenciar as diferenças encontradas no IRO, desta forma, os dados do TRO foram expressos em porcentagem.

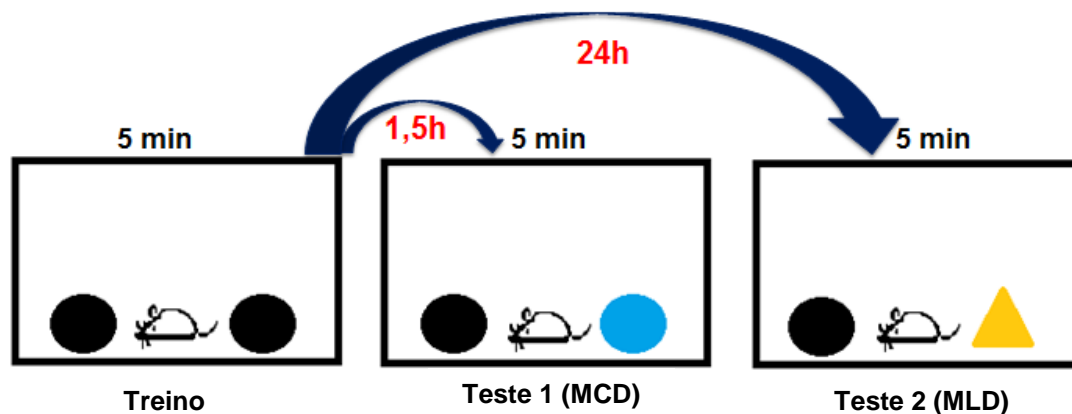


Figura 6: Esquematização do Teste de reconhecimento de objetos e suas respectivas fases: treino, teste 1 e teste 2.

3.7.2 Restrição alimentar

Antes de iniciar o protocolo do labirinto em Y, os animais foram submetidos à restrição alimentar, com objetivo de aumentar a saliência da recompensa oferecida durante a tarefa de aprendizado. Foi realizado o acompanhamento diário do peso corporal, e a restrição alimentar foi aplicada objetivando manter o peso dos animais em 80% do peso inicial. Este acompanhamento foi necessário uma vez que, os animais precisam manter 80% do peso corporal inicial durante a aplicação do protocolo do labirinto em Y. Durante o período de restrição, cada caixa de animais recebeu em torno de 10 gramas de ração padrão, e, além disso, foram acrescentados à dieta 3 pellets de ração Royal Canin® por rato. A ração Royal Canin® foi usada como reforço positivo durante o treinamento no labirinto em Y, e foi oferecida aos animais durante o período de restrição alimentar para familiarização ao reforço. À medida que os dias de restrição alimentar iam aumentando, houve um acréscimo de ração padrão e ração Royal Canin®, na tentativa de manter em equilíbrio o peso corporal dos animais durante toda a execução do protocolo. No segundo dia de restrição alimentar, os animais iniciaram a habituação no labirinto em Y.

3.7.3 Labirinto em Y

O teste nesse aparato permite avaliar a memória declarativa espacial do animal e sua flexibilidade comportamental. Para tanto, foi utilizado um aparato de acrílico transparente em formato de Y, com assoalho de cor preta, com as seguintes medidas: 50cm x 10cm x 20cm para cada braço do labirinto. A extremidade distal dos braços apresentava receptáculos onde eram adicionados 10 pellets da ração Royal Canin®,

porém em apenas um dos braços o receptáculo era acessível ao animal. Esse teste se baseia no reforço positivo gerado pelo alimento oferecido em um dos braços do labirinto, e, portanto, os animais testados se encontravam em restrição alimentar. Durante a exposição ao aparato, os animais deviam encontrar o braço correto, ou seja, aquele contendo a ração Royal Canin® acessível no interior do receptáculo e o aprendizado baseado no reforço positivo foi observado ao longo das sessões de exposição, em todos os grupos experimentais. O aparato era limpo com a solução de álcool a 70% após cada exposição dos animais ao labirinto. Os testes foram realizados nas fases iniciais do ciclo claro e o início do teste ocorreu, sistematicamente, às 08h00min. Além disso, foram utilizadas dicas espaciais para permitir a orientação dos animais. O teste para os animais submetidos ao *binge* agudo e ao *binge* crônico teve duração de 6 e 11 dias respectivamente.

Este teste comportamental foi realizado em três etapas, conforme proposto HAGEWOUD et al., 2010:

Habituação: No primeiro dia de exposição ao aparato o animal foi submetido duas vezes ao labirinto. Na primeira exposição, o reforço estava presente somente em um braço e o segundo braço vazio foi fechado com porta guilhotina. Na segunda exposição houve a inversão da recompensa, ou seja, a recompensa se encontrava no braço não visitado anteriormente e, conseqüentemente, o primeiro braço visitado foi fechado com a porta guilhotina. Assim sendo, ocorreu alternância da recompensa em cada braço do labirinto nas duas repetições da habituação, levando o animal a explorar ambos os braços (figura 7). É importante lembrar que o animal passava somente para a etapa seguinte do protocolo quando entrava no braço e comia a recompensa acessível e que o tempo necessário para isso variou entre 10 a 30 minutos em cada braço do aparato.

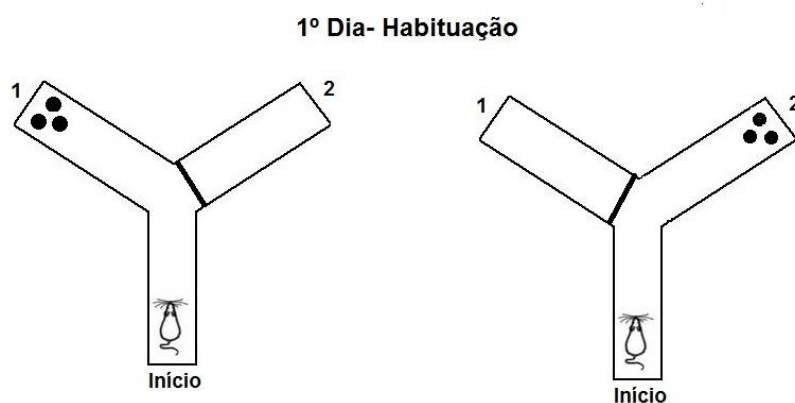


Figura 7: Labirinto em Y durante a fase de habituação.

Treino: Durante o treino, a recompensa foi colocada em um braço pré-estabelecido do aparato. A recompensa acessível permaneceu neste braço fixo durante todo o período de treinamento, enquanto o outro braço continha a recompensa não acessível, ou seja, foi utilizada uma tela em alumínio no recipiente em que o reforço foi acondicionado, a qual permitia ao animal sentir o cheiro do reforço sem que este estivesse acessível para ingestão. O uso da tela foi feito para que o rato se orientasse, no aparato, por meio da memória espacial, e não por influência do cheiro que o reforço emitia.

Uma vez submetido ao labirinto, o animal poderia escolher qual braço seria visitado. Assim que o animal escolhia um braço, o outro braço era fechado com a porta guilhotina e apenas as visitas dos animais ao braço contendo o reforço eram consideradas como acertos, sendo que após cada escolha acertada era permitido ao animal comer a recompensa disponível no receptáculo.

O treino foi realizado em 6 repetições durante uma sessão ao dia para cada rato, e esta etapa foi repetida durante 3 dias para os animais submetidos ao *binge* agudo, e 6 dias, para os animais submetidos ao *binge* crônico. Este foi o período necessário para que os animais atingissem uma taxa de acertos entre 85-90% em cada sessão (figura 8). Após atingir tal taxa de acerto, os animais seguiram para etapa de Teste/Treino reverso.

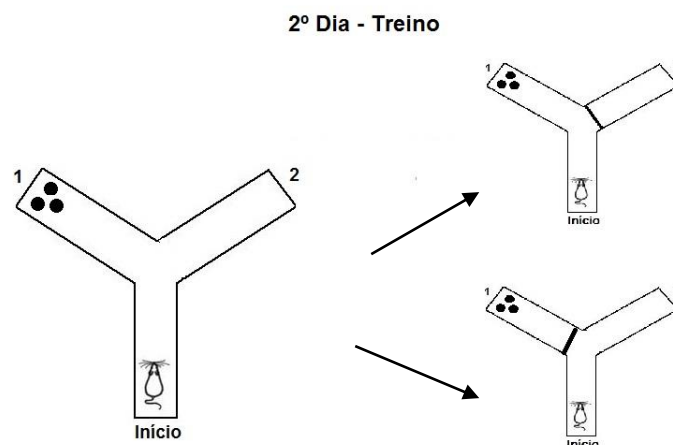


Figura 8: Labirinto em Y durante a de fase treino.

Teste/Treino reverso: Nesta etapa, a recompensa foi alterada para outro braço em relação à fase de treino, ou seja, foi colocada no braço oposto. O animal, novamente, tinha que escolher qual braço seria visitado. Ao escolher um braço, o outro era fechado com a porta guilhotina (figura 9). Foram considerados acertos quando os animais visitaram os braços nos quais se encontravam os reforços acessíveis. Este processo foi realizado em 6 repetições, durante uma sessão ao dia até que cada animal atingisse a taxa de acerto entre 85-90%. A etapa de Teste/Treino-reverso foi finalizada após atingir tal taxa de acerto. Houve a formação de um grupo distinto de animais para cada teste comportamental executado neste trabalho.

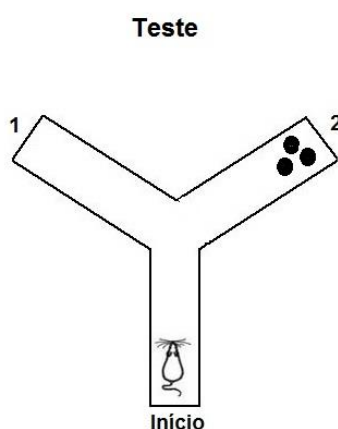


Figura 9: Labirinto em Y durante a de fase teste/treino reverso.

3.8 EUTANÁSIA

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica de tiopental (90mg/kg) via injeção intraperitoneal. Um grupo adicional de animais submetidos ao *binge* crônico foi conduzido exclusivamente para o recolhimento de estruturas encefálicas como CPF e hipocampo. Tais animais foram decapitados, e as estruturas foram acondicionadas em eppendorfs, devidamente identificadas, congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas no freezer a - 80°C para posterior análise.

3.9 PREPARO DAS AMOSTRAS

As estruturas foram retiradas do freezer - 80°C e ficaram acondicionadas em banho de gelo no escuro. Em seguida foram retirados vasos sanguíneos que poderiam influenciar na pesagem das estruturas encefálicas, e assim, cada estrutura foi pesada

com o auxílio da balança analítica Shimadzu® modelo AUY. Após a pesagem, cada estrutura teve o acréscimo da solução tampão de fosfato de potássio a 0,05 M, contendo 1mM EDTA e inibidor de proteases a 0,25M, com pH ajustado a 7,4. Cada amostra foi acrescida dessa solução na proporção de 1:10 p:v. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas a 0°C e, posteriormente, centrifugadas a 13.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Após esta etapa, retirou-se o sobrenadante, o qual foi armazenado a - 80°C para posteriores análises bioquímicas.

3.10 ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

O CPF e o hipocampo dos animais submetidos ao *binge* crônico, foram analisados com o objetivo de mensurar parâmetros de estresse oxidativo. Os seguintes testes bioquímicos foram conduzidos: avaliação da produção de radicais livres pela oxidação da diclorodifluoresceína (DCFH), determinação da atividade enzimática da catalase (CAT), da glutatona peroxidase (GPx) e da superóxido dismutase (SOD), além da dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e tióis totais.

3.10.1 Avaliação da produção de radicais livres pela oxidação química do diclorodifluoresceína (DCFH)

Foram pipetados 20µL do sobrenadante de cada amostra, previamente centrifugada, e diluiu-se em 980µL de solução tampão de fosfato de potássio a 50mM, EDTA 1mM em pH = 7,4, respeitando a concentração 1:50 (v/v). Desta solução, retirou-se 20µL de cada amostra diluída e pipetou-se na placa de ELISA em duplicata, em seguida pipetou-se 80 µL de solução tampão mais 100µL de solução de diacetato 2,7-diclorodifluoresceína (DCFH-DA) com a concentração final de 1mM. Foi adicionado somente a solução tampão de homogeneização no volume de 200 µL para o branco. Após esta etapa, a placa de ELISA, juntamente com as amostras, foi incubada em banho-maria por 30 minutos à temperatura de 37°C. O DCFH-DA sofre ação das esterases celulares, produzindo DCFH, que é oxidado pelas espécies reativas de oxigênio/nitrogênio presentes no tecido.

A formação de derivados fluorescentes de diclorodifluoresceína (DCF) foi monitorada pela excitação e emissão nos comprimentos de onda em 488 e 525 nm, respectivamente, com o auxílio do espectrofotômetro de fluorescência (SpectraMax®). A formação de espécies oxidadas de oxigênio/nitrogênio foi

quantificada usando a curva padrão de DCF e os resultados foram expressos em nmol de DCF formado por mg de proteína (SRIRAM, 1997).

3.10.2 Atividade enzimática da catalase (CAT)

Foram pipetados 10µL do sobrenadante de cada amostra, previamente centrifugada e pipetou-se na placa de ELISA em duplicata seguida da adição de 225µL de solução tampão de fosfato de potássio a 10mM e pH 7,0 com peróxido de hidrogênio a 16mM. Na mesma placa foram separadas duas colunas, nas quais foram pipetados 225µL de solução tampão da CAT e 10µL de cada amostra em duplicata. Foi adicionado 225µL de solução tampão da CAT com peróxido de hidrogênio para compor o branco. O branco sem amostra serviu para controlar a degradação independente da CAT e o branco sem peróxido de hidrogênio, para descontar a absorbância inespecífica da substância presente na solução de homogeneização. Após a adição de amostra, branco e solução tampão misturou-se as soluções existentes nos poços da placa e posteriormente, a placa foi incubada no interior do espectrofotômetro de ELISA SpectraMax® i3, durante 3 minutos à 25°C. Após o período de incubação, a leitura cinética foi programada com tempo de 3 minutos e 10 segundos, intervalo de 54 segundos entre cada leitura com o total de 4 leituras em 240nm a 25°C. A avaliação da atividade da CAT baseia-se na taxa de degradação de peróxido de hidrogênio pela análise espectrofotométrica, conforme descrito por Aebi (1987). A atividade da CAT foi calculada em micromoles de H₂O₂ consumido por minuto por mg de proteína, usando um coeficiente de extinção molar de 43,6M⁻¹cm⁻¹ (AEBI, 1987).

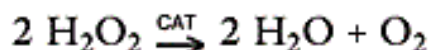


Figura 10: Reação enzimática da Catalase

3.10.3 Atividade enzimática da Glutathiona peroxidase (GPx)

Foram pipetados 30µL do sobrenadante em duplicata, numa placa de ELISA. Em seguida, foram pipetados 20µL de NADPH A 5mM mais 100 µL de solução tampão de incubação (fosfato de potássio a 20mM + 2mM de EDTA + azida a 0,8Mm, pH 7,7) em sequência, a placa de ELISA foi levada ao espectrofotômetro para o período de incubação durante 10 minutos à 37°C. Após este período, pipetou-se 10µL de

glutathiona redutase (40 U/mL) mais 10µL de glutathiona reduzida (40mM). Depois deste processo, as soluções foram misturadas e em seguida foi feita a primeira leitura cinética com o tempo de 4 minutos, intervalo de leitura de 60 segundos totalizando 5 leituras em 340nm a 37°C. Após a primeira leitura, pipetou-se 20µL de tert-butilhidroperóxido (5mM) em cada poço e a segunda leitura cinética foi realizada com o tempo de 4 minutos, intervalo de leitura de 60 segundos totalizando 5 leituras em 340nm a 37°C.

A atividade enzimática da GPx foi mensurada usando tert-butilhidroperóxido como substrato, e foi analisada pelo espectrofotômetro, SpectraMax® i3. A atividade enzimática da GPx foi expressa em nmol NADPH oxidado por minuto por mg proteína (WENDEL, 1981).

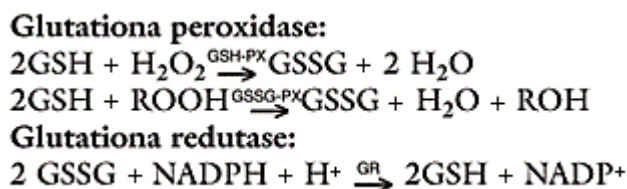


Figura 11: Reações enzimáticas do sistema glutathiona peroxidase e redutase.

3.10.4 Atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD)

A atividade enzimática da superóxido dismutase foi determinada através do uso do kit RANSOD (Randox Labs, USA), de acordo com o procedimento descrito por Delmas-Beauvieux *et al.*, 1995. Retirou-se 20µL do sobrenadante de cada amostra e diluiu-se em 980µL em tampão de homogeneização (fosfato de potássio a 50mM, EDTA 1mM em pH = 7,4), respeitando a concentração 1:50 (v/v). Desta solução, pipetou-se 10µL de cada amostra na placa de ELISA mais 170µL do substrato misto {xantina e cloreto 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio [INT]} sendo que o substrato misto também foi adicionado no branco e na curva padrão. Em seguida a placa foi incubada no interior do espectrofotômetro Spectramax® i3 durante 5 minutos à 37°C. Depois disso, pipetou-se 25µL de xantina oxidase nas amostras, no branco e na curva padrão, em seguida foi realizada a leitura cinética com tempo de 4 minutos, intervalo de 26 segundos, totalizando 10 leituras a 492nm a 37 °C. Tal método caracteriza-se pela xantina e xantina oxidase promoverem a geração de radicais de superóxido, os quais reagem com INT para formar um cromógeno vermelho, formazano, que foi quantificado por espectrofotômetro. A inibição da produção do

cromógeno é proporcional à atividade da SOD presente na amostra analisada. A atividade enzimática da SOD foi expressa em unidades da SOD/mg de proteína.

3.10.5 Avaliação da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foram pipetados 50µL do sobrenadante das amostras, previamente centrifugado, em seguida, adicionou-se 200µL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 1% em cada amostra no interior dos eppendorfs. Os eppendorfs, contendo a solução e amostra, foram incubados em banho-maria a 100°C sob agitação a cada 20 minutos durante 2 horas. A reação entre o TBA e derivados de peróxidos lipídicos, ou seja, TBARS, formam como produto um cromógeno de cor rósea. As amostras foram transferidas para a placa de ELISA, com 200µL por poço, e em seguida lidas no espectrofotômetro Varioskan em 532nm (VASCONCELOS et al, 2007). Os níveis de TBARS foram expressos em nmol/mg de proteína usando um coeficiente de extinção molar de 68,95 mM⁻¹cm⁻¹.

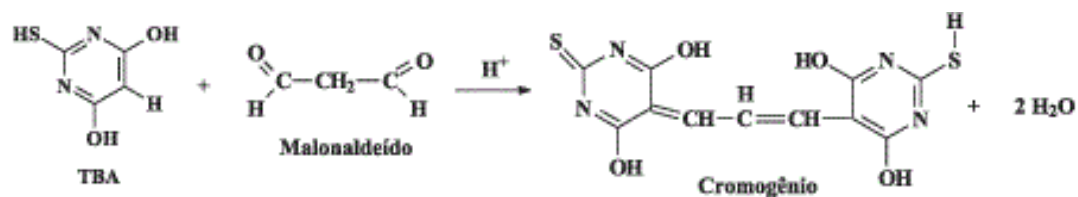


Figura 12: Reação entre o TBA e uma espécie reativa ao ácido tiobarbitúrico.

3.10.6 Determinação de Tióis totais

Foram pipetados 30µL do sobrenadante de cada amostra e pipetou-se na placa de ELISA em duplicata, em seguida, pipetou-se 200µL de solução tampão de fosfato de potássio a 0,2M e pH 8 nas amostras. Neste momento, foi realizada uma leitura no Spectramax® i3 em 412nm depois disso, pipetou-se 10 µL de DTNB nas amostras e no branco. Em seguida, a placa foi incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz, e após este processo foi realizada a segunda leitura no espectrofotômetro em 412nm. Este ensaio é baseado na redução do ácido 5, 5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) pelos grupos tióis presentes nas amostras, produzindo um composto amarelo (TNB) que absorve luz a 412 nm (AKSENOV e MARKESBERRY, 2001).

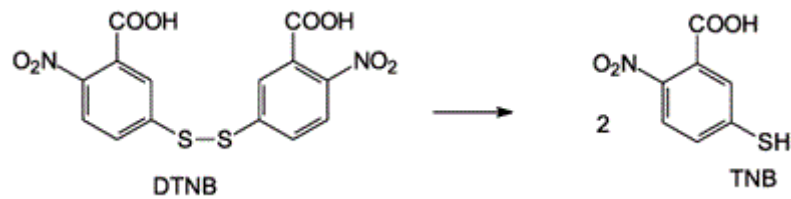


Figura 13: Reação entre o DTNB e os tióis presentes na amostra formando TNB.

3.10.7 Dosagem de proteínas totais

Foi feita uma curva padrão para a dosagem de proteínas totais de acordo como o reagente de Bradford preconiza. Para tanto, foi utilizada uma solução estoque de BSA a 1mg/mL e pipetou-se 4µL, 8µL e 32µL de solução de BSA na placa de ELISA em cada poço e em duplicata. Para completar o volume final de 40µL [entre BSA e solução tampão (solução de fosfato de potássio a 0,05M, EDTA 1Mm e pH = 7,4)], foi pipetado 36µL, 32µL, 8µL de solução tampão respectivamente nos poços anteriormente preenchidos com BSA. Em seguida, foram adicionados 98 µL de água Milli-Q e posteriormente, adicionou-se 250µL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich®) em todos os poços preenchidos. No branco foi pipetado 5µL de solução tampão de fosfato de potássio e 250µL do reagente de Bradford. A placa de ELISA teve um período de incubação de 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, foi realizada a leitura no espectrofotômetro Varioskan® a 595nm. Para fazer a dosagem de proteínas totais existentes nas amostras analisadas, foram pipetados 5µL de cada amostra, em duplicata na placa de ELISA mais 250µL do reagente de Bradford. Em seguida, a placa ficou no período de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, foi lida a 595 nm no espectrofotômetro Varioskan®. A dosagem de proteínas totais foi expressa em mg/mL.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida por teste de Bonferroni ou Tukey, ANOVA de duas vias, usando como fatores a Separação Maternal e Etanol, ou ANOVA de medidas repetidas, de acordo com os parâmetros analisados. O p-valor significativo adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NO SANGUE

O ensaio de dosagem de etanol no sangue mostrou uma diferença significativa entre as doses de etanol e salina [ANOVA de duas vias, $F(1,12) = 25,532$, $p < 0,001$]. O teste de Bonferroni indicou que a dose 3g/kg foi diferente da dose salina ($p < 0,05$) e a dose de etanol 6g/kg foi diferente da dose salina ($p < 0,05$) e da dose etanol 3g/kg ($p < 0,05$).

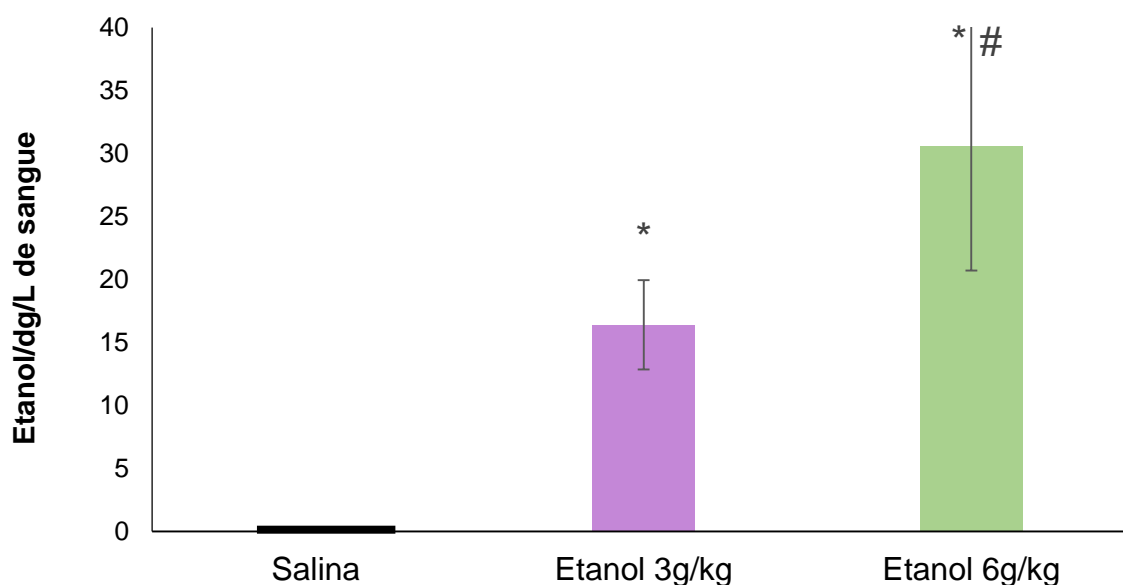


Figura 14: Comparação do teor de etanol no sangue dos animais após uma única exposição às doses de 3g/kg e 6g/kg de etanol e salina. Dados expressos como média \pm EPM. N = 4/grupo.

* : Diferente da dose salina (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

#: Diferente da dose etanol 3g/kg (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

4.2 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (TRO)

4.2.1 TRO – *binge* agudo

Não foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,58) = 0,094$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,58) = 0,007$, $p > 0,05$] e nem interação entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,58) = 0,19$, $p > 0,05$] em animais submetidos ao *binge* agudo durante a fase de treino do TRO (figura 15).

Não foi observado efeito significativo dos tratamentos da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,58) = 3,029$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,58) = 2,12$, $p > 0,05$] e nem interações entre os fatores estudados [ANOVA de duas vias, $F(1,58) = 0,385$, $p > 0,05$] na avaliação da MCD (figura 16). Entretanto, a ANOVA de uma via indicou

diferença significativa entre os animais submetidos ao binge agudo na MCD [ANOVA de uma via, $F(5,58) = 2,533$, $p < 0,05$], e o teste de Tukey indicou que o grupo SM 3g/kg é diferente do grupo controle salina ($p < 0,05$) (figura 16).

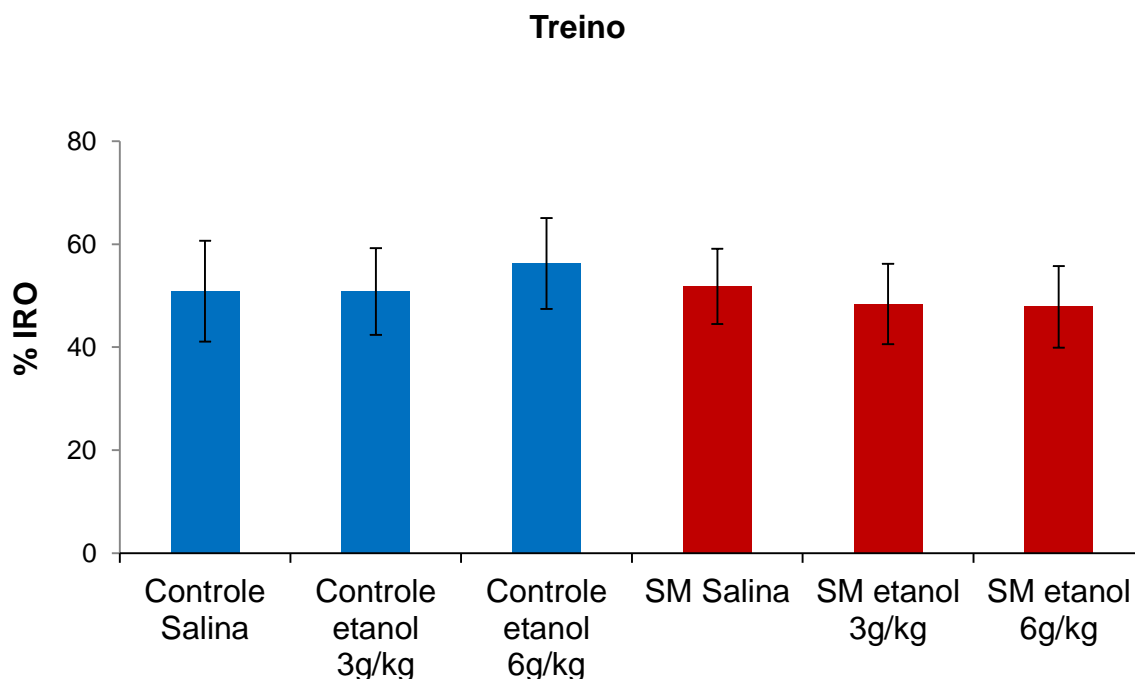


Figura 15: Avaliação da fase treino em animais submetidos ao *binge* agudo. Dados expressos como média \pm EPM. N = 9-10/grupo.

Foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,58) = 11,515$, $p < 0,05$] e do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,58) = 3,962$, $p = 0,05$] durante a avaliação da MLD. O teste de Bonferroni indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos SM 3g/kg e SM 6g/kg e o grupo Controle salina ($p < 0,05$). Não foi observado interação entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,58) = 0,333$, $p > 0,05$] (Figura 17).

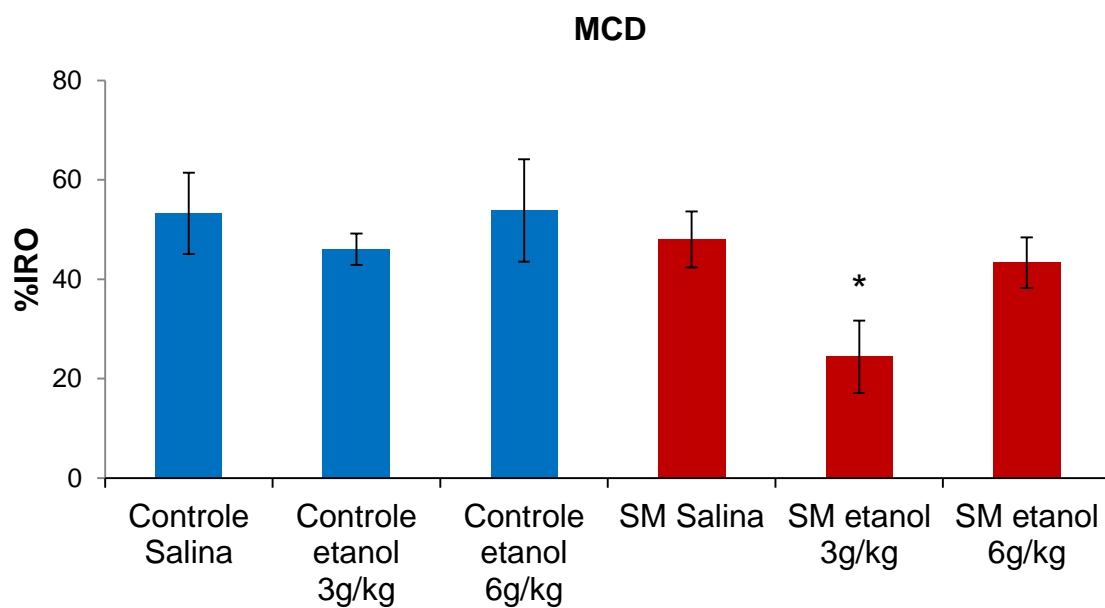


Figura 16: Avaliação da MCD em animais submetidos ao binge agudo. Dados expressos como média \pm EPM. N = 9-10/grupo. * Diferente do grupo controle salina.

Tempo de exploração de cada objeto no TRO durante a MCD

Grupos experimentais	n	Tempo de exploração ta_1 (s)	Tempo de exploração tb_2 (s)
Controle Salina	9	21,9044	26,2811
Controle etanol 3g/kg	10	22,3550	18,8350
Controle etanol 6g/kg	9	20,6767	22,2811
SM Salina	10	20,3230	21,8610
SM etanol 3g/kg	10	30,4090	20,117
SM etanol 6g/kg	10	25,3670	19,202
Total	58	23,5822	21,3312

Tabela 2: Tempo de exploração do objeto familiar (ta_1) (s) e objeto novo (tb_2) (s) de animais submetidos ao *binge* agudo na avaliação da MCD. Dados expressos como média.

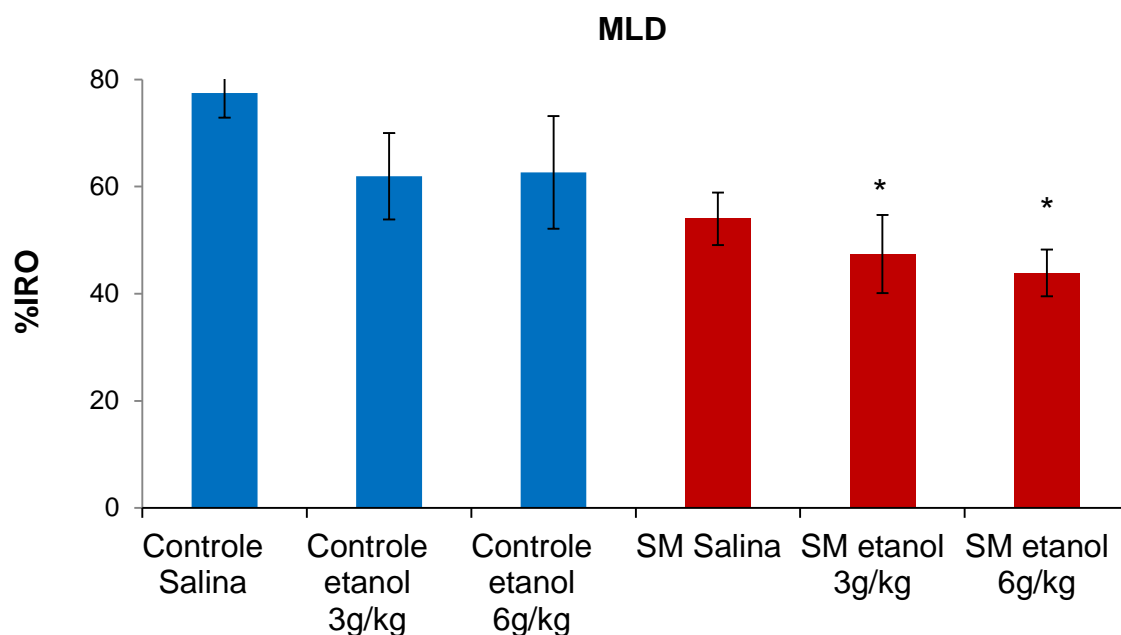


Figura 17: Avaliação da MLD em animais submetidos ao *binge* agudo. Dados expressos como média \pm EPM. N = 9-10/grupo.

*: Diferente do grupo Controle Salina.

Tempo de exploração de cada objeto no TRO durante a MLD

Grupos experimentais	n	Tempo de exploração ta_1 (s)	Tempo de exploração tb_2 (s)
Controle Salina	9	13,0967	46,8256
Controle etanol 3g/kg	10	12,9900	28,4910
Controle etanol 6g/kg	9	15,4922	24,1044
SM Salina	10	26,0640	27,0540
SM etanol 3g/kg	10	27,4680	22,2490
SM etanol 6g/kg	10	26,1010	21,4700
Total	58	20,4057	28,1209

Tabela 3: Tempo de exploração do objeto familiar (ta_1) (s) e objeto novo (tb_2) (s) de animais submetidos ao *binge* agudo na avaliação da MLD. Dados expressos como média.

4.2.2 TRO – *binge* crônico

Não foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,80) = 0,0825$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,80) = 2,860$, $p > 0,05$], e nem interações entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,80) = 0,673$, $p > 0,05$] durante a fase de treino do TRO em animais submetidos ao *binge* crônico (figura 18).

Não foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,80) = 0,033$, $p > 0,05$] e do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,80) = 0,045$, $p > 0,05$] durante a avaliação da MCD em animais submetidos ao *binge* crônico. Entretanto, foi observada interação significativa entre os dois fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,80) = 5,057$, $p < 0,05$] (figura 19).

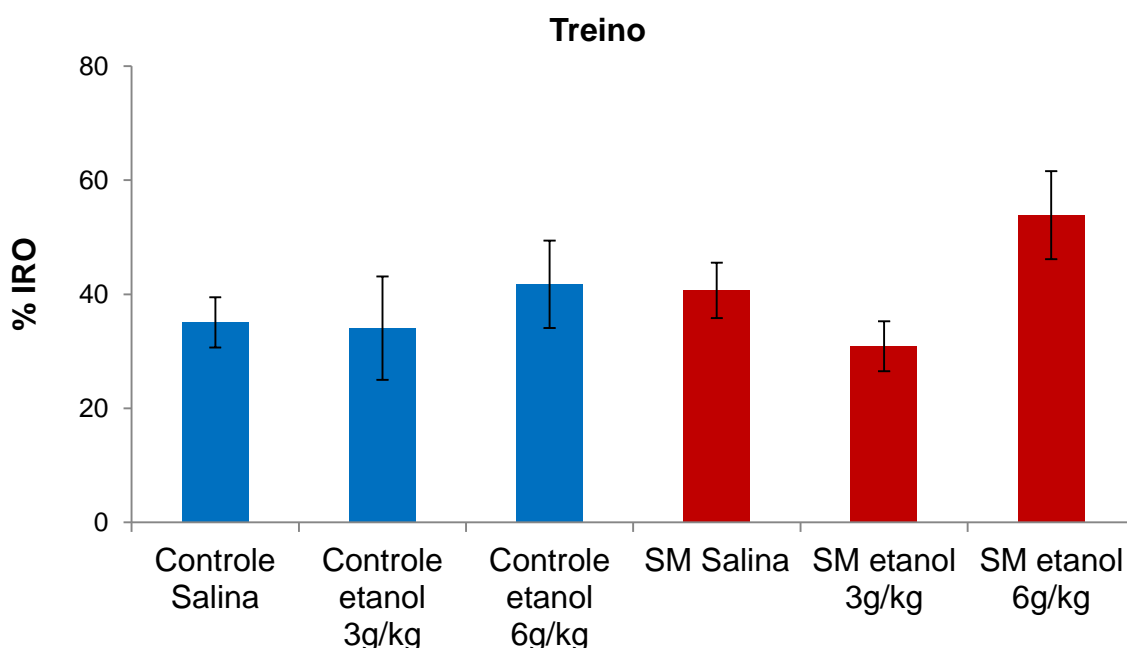


Figura 18: Avaliação do treino em animais submetidos ao *binge* crônico. Dados expressos como média \pm EPM. N=10-15/grupo.

Por fim, não foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,80) = 1,336$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,80) = 0,113$, $p > 0,05$] e nem interações entre fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,80) = 1,322$, $p > 0,05$] durante a avaliação da MLD em animais submetidos ao *binge* crônico (figura 20).

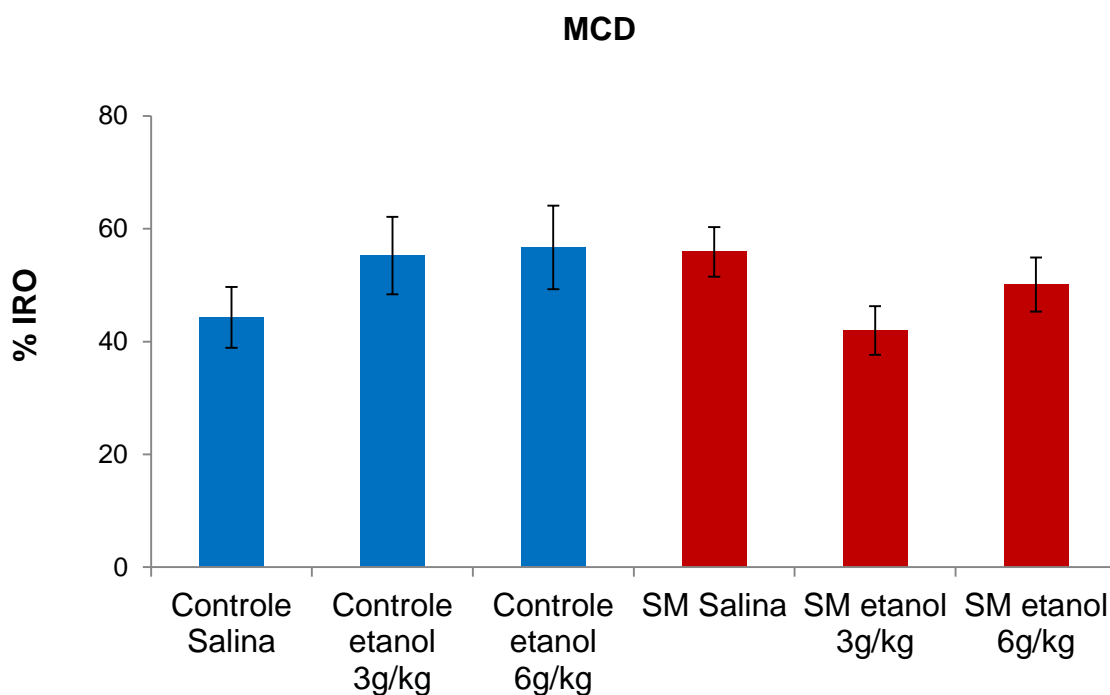


Figura 19: Avaliação da MCD em animais submetidos ao *binge* crônico. Dados expressos como média \pm EPM. N = 10-15/grupo.

Tempo de exploração de cada objeto no TRO durante a MCD

Grupos experimentais	n	Tempo de exploração ta_1 (s)	Tempo de exploração tb_2 (s)
Controle Salina	12	17,795	14,3167
Controle etanol 3g/kg	10	15,03	18,894
Controle etanol 6g/kg	14	14,6829	17,3729
SM Salina	15	20,7953	23,476
SM etanol 3g/kg	14	21,1957	16,6643
SM etanol 6g/kg	15	17,152	17,268
Total	80	17,9419	18,1053

Tabela 4: Tempo de exploração do objeto familiar (ta_1) e objeto novo (tb_2) de animais submetidos ao *binge* crônico na avaliação da MCD. Dados expressos como média.

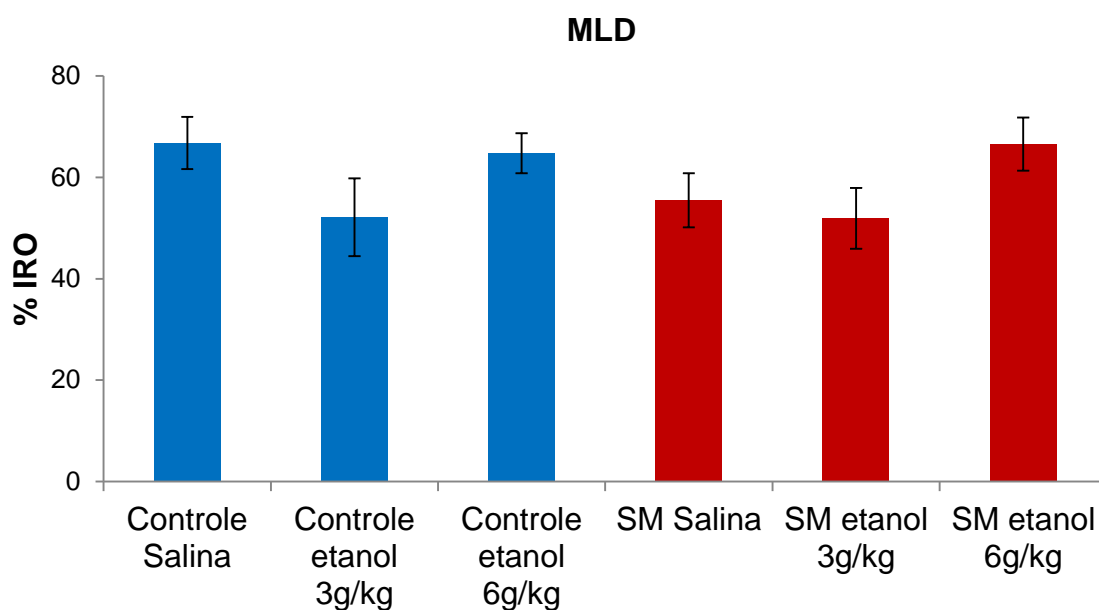


Figura 20: Avaliação da MLD em animais submetidos ao *binge* crônico. Dados expressos como média \pm EPM. N = 10-15/grupo.

Tempo de exploração de cada objeto no TRO durante a MLD

Grupos experimentais	n	Tempo de exploração ta_1 (s)	Tempo de exploração tb_2 (s)
Controle Salina	12	12,5925	27,9525
Controle etanol 3g/kg	10	22,447	28,577
Controle etanol 6g/kg	14	17,435	32,0514
SM Salina	15	22,3153	29,602
SM etanol 3g/kg	14	21,3	22,4514
SM etanol 6g/kg	15	13,684	26,2893
Total	80	18,2233	27,7826

Tabela 5: Tempo de exploração do objeto familiar (ta_1) (s) e objeto novo (tb_2) (s) de animais submetidos ao *binge* crônico na avaliação da MLD. Dados expressos como média.

4.3 CURVA DE CRESCIMENTO DOS ANIMAIS DURANTE O PERÍODO DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR

A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito da restrição alimentar sobre o ganho de peso dos animais [$F(3.57,210.647) = 128,697, p < 0,001$], bem como interação entre a restrição alimentar e SM [$F(3.57,210.647) = 11,787, p < 0,001$], sem demonstrar interação entre restrição, SM e etanol [$F(3.57,210.647) = 1,192, p > 0,05$] em animais submetidos ao *binge* agudo (figura 21).

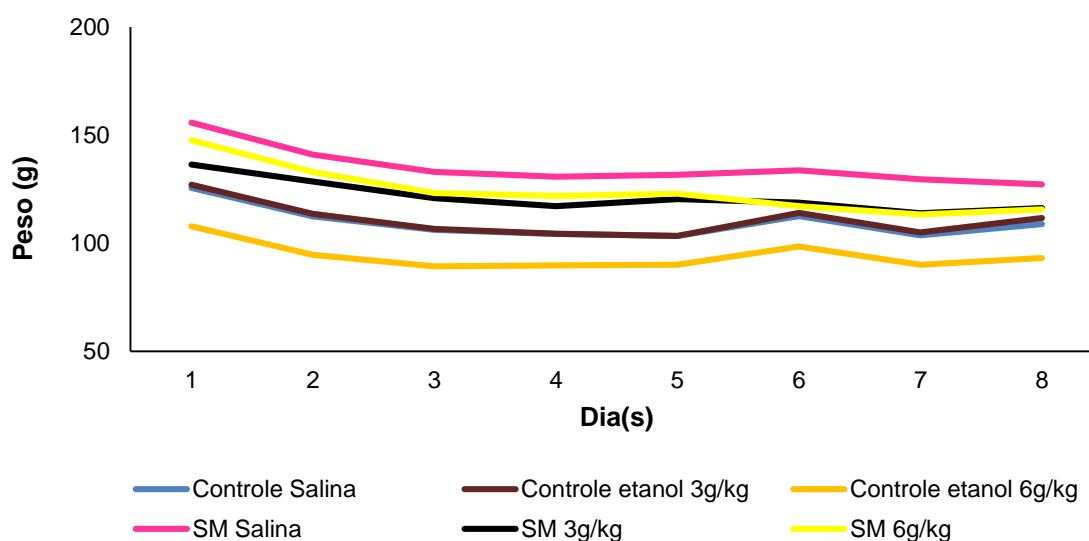


Figura 21: Curva de crescimento dos animais durante a restrição alimentar em animais submetidos ao *binge* agudo N=9-13/grupo.

A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito da restrição alimentar sobre o ganho de peso dos animais [$F(1.613,109,682) = 68,010, p < 0,001$], bem como interação entre a restrição alimentar e o tratamento com etanol [$F(1.613,109,682) = 4,176, p < 0,05$], sem demonstrar interação entre restrição e SM [$F(1.613,109,682) = 1,362, p > 0,05$] em animais submetidos ao *binge* crônico (figura 22).

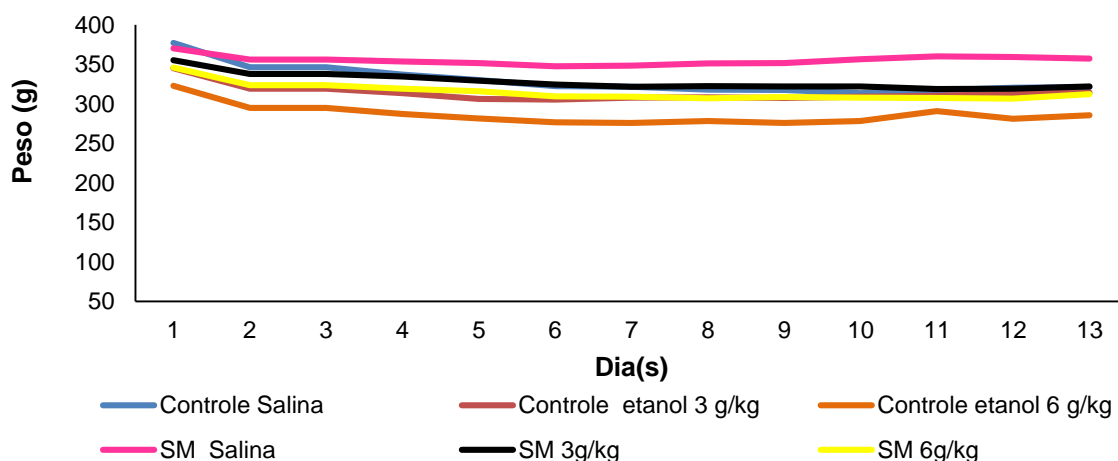


Figura 22: Curva de crescimento dos animais durante a restrição alimentar em animais submetidos ao binge crônico N=10-13/grupo.

4.4 LABIRINTO EM Y

A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito do tempo sobre o aprendizado e aprendizado reverso dos animais submetidos ao *binge* agudo no labirinto em Y [F(4.28, 243.693) = 71,712, $p < 0,001$], sem demonstrar interação entre o tempo e SM [F(4.28, 243.693) = 0,676, $p > 0,05$], interação entre tempo e etanol [F(4.28, 243.693) = 1,308, $p > 0,05$] nem interação entre tempo, etanol e SM [F(4.28, 243.693) = 1,21, $p > 0,05$] (figura 23).

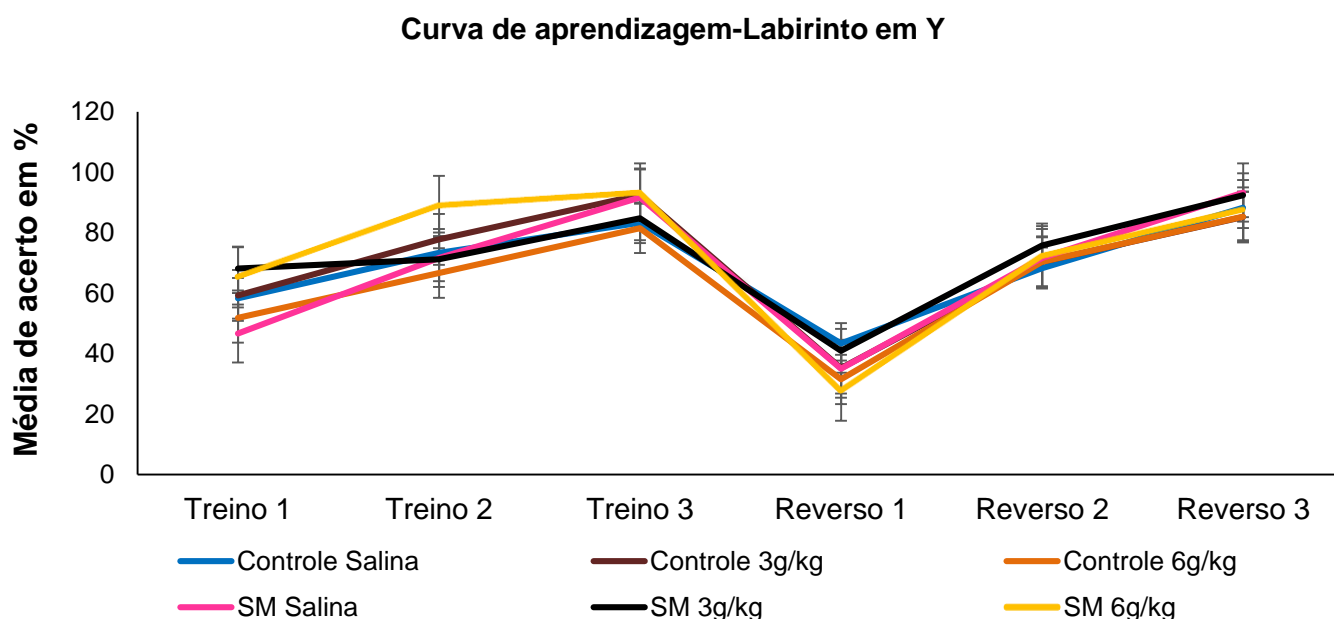


Figura 23: Curva de aprendizagem do labirinto em Y em animais submetidos ao *binge* agudo. Dados expressos como média \pm EPM N = 9-12/grupo.

A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito do tempo sobre o aprendizado e aprendizado reverso dos animais submetidos ao *binge* crônico no labirinto em Y [F(7.868, 527.189) = 69,556, $p < 0,001$], bem como interação entre o tempo e SM [F(7.868, 527.189) = 3,722, $p < 0,001$], sem demonstrar interação entre tempo e etanol [F(7.868, 527.189) = 0,675, $p > 0,05$] nem interação entre tempo, etanol e SM [F(7.868, 527.189) = 0,188, $p > 0,05$] (figura 24).

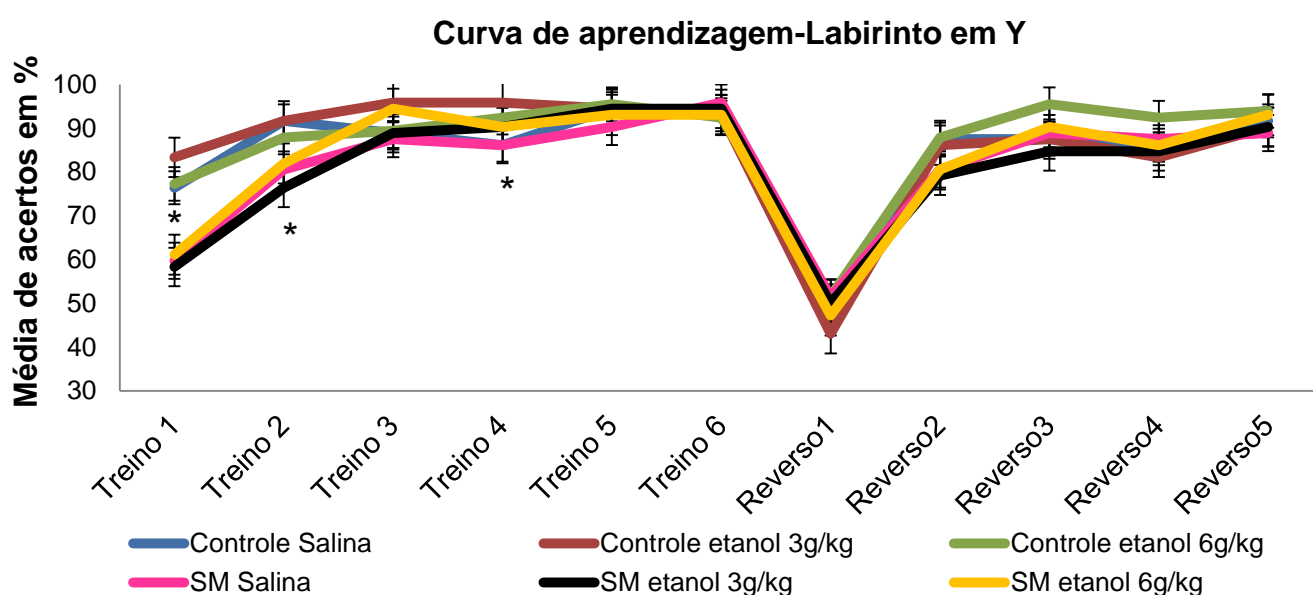


Figura 24: Curva de aprendizagem do labirinto em Y em animais submetidos ao *binge* crônico. Dados expressos como média \pm EPM N = 11-12/grupo.

Foi observado efeito significativo da SM durante o primeiro dia de treino [ANOVA de duas vias, $F(1,71) = 19,985$, $p < 0,05$] e segundo dia de treino [ANOVA de duas vias, $F(1,71) = 7,764$, $p < 0,05$], do etanol durante o quarto dia de treino [ANOVA de duas vias, $F(1,71) = 4,186$, $p < 0,05$]. Entretanto, não foram observadas interações significantes no primeiro dia de treino [ANOVA de duas vias, $F(1,71) = 0,234$, $p > 0,05$], segundo dia de treino [ANOVA de duas vias, $F(1,71) = 0,003$, $p > 0,05$] nem no quarto dia de treino [ANOVA de duas vias, $F(1,71) = 0,43$, $p > 0,05$] (figura 25).

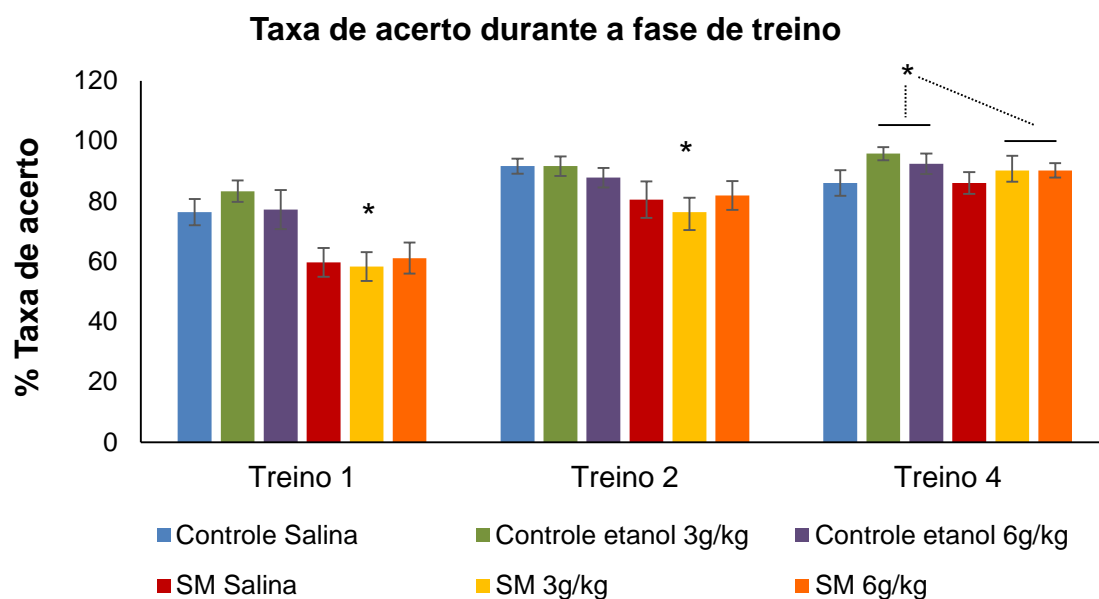


Figura 25: % da taxa de acerto durante a fase de treino do labirinto em Y em animais submetidos ao *binge* crônico. Dados expressos como média \pm EPM. N= 11-12/grupo.

4.5 ANÁLISES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

4.5.1 Produção de radicais livres pela oxidação química do diclorodifluoresceína (DCFH)

Não foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 2,072$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,482$, $p > 0,05$] nem interações entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,494$, $p > 0,05$] na oxidação do DCFH no CPF (figura 26).

Foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 7,422$, $p < 0,05$], sobre a oxidação do DCFH no hipocampo. Entretanto, não foi observado efeito significativo do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 2,493$, $p > 0,05$] nem interações entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 1,469$, $p > 0,05$] (figura 27).

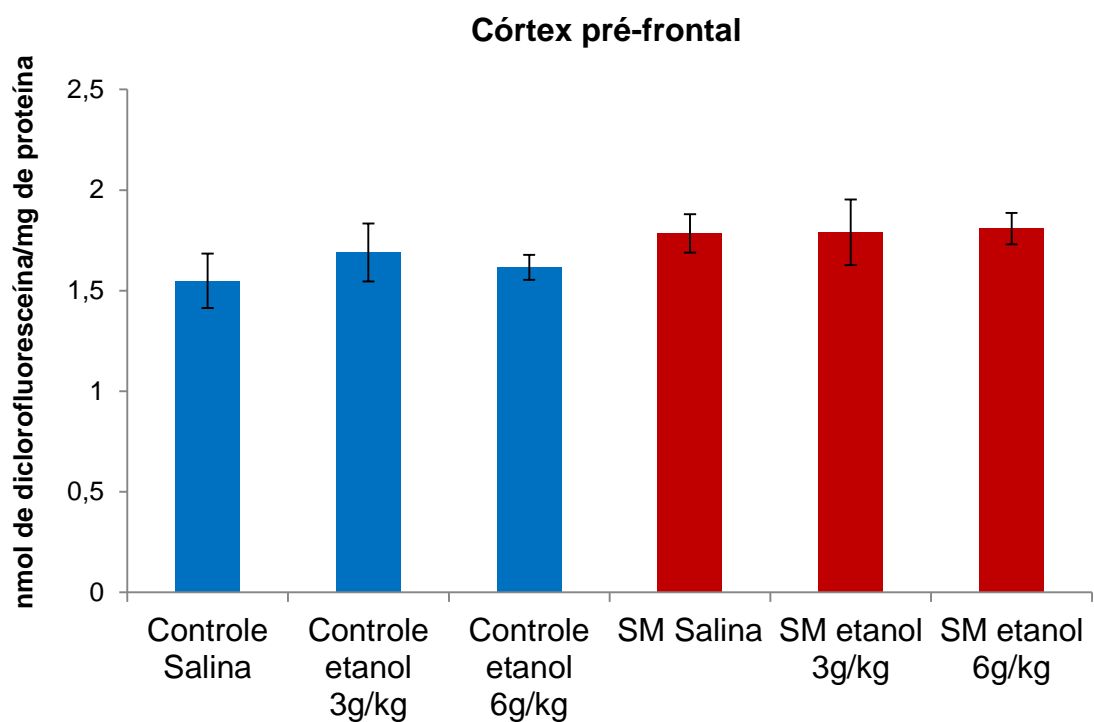


Figura 26: Dosagem de diclorofluoresceína no CPF. Dados expressos como média \pm EPM. N = 4-6/grupo.

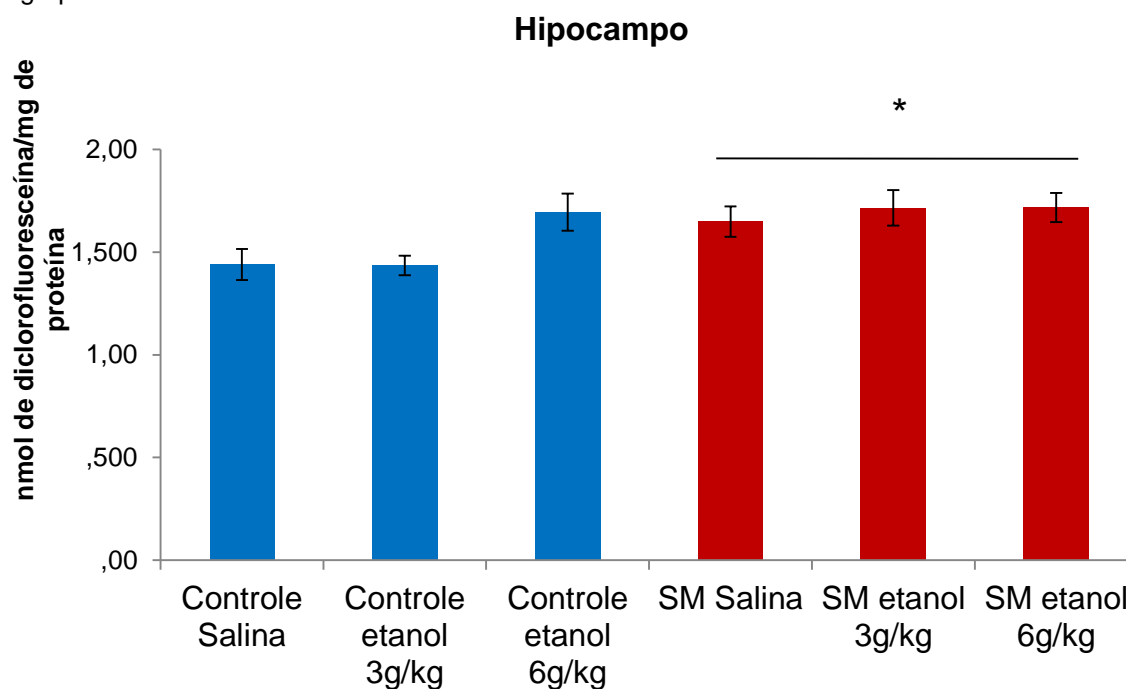


Figura 27: Dosagem de diclorofluoresceína no hipocampo. Dados expressos como média \pm EPM. N = 5-6/grupo.

4.5.2 Atividade enzimática da catalase (CAT)

Não foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 0,565$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,32) = 1,096$, $p > 0,05$], nem interações entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 1,398$, $p > 0,05$] na atividade enzimática da CAT no CPF (figura 28).

Não foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 2,802$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 1,756$, $p > 0,05$]. No entanto, foi observada interação significativa entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 4,252$, $p > 0,05$] na atividade enzimática da CAT no hipocampo. O teste de Tukey mostrou que o grupo SM 6g/kg foi diferente do grupo Controle etanol 6g/kg ($p = 0,051$) e do grupo Controle Salina ($p < 0,05$) (figura 29).

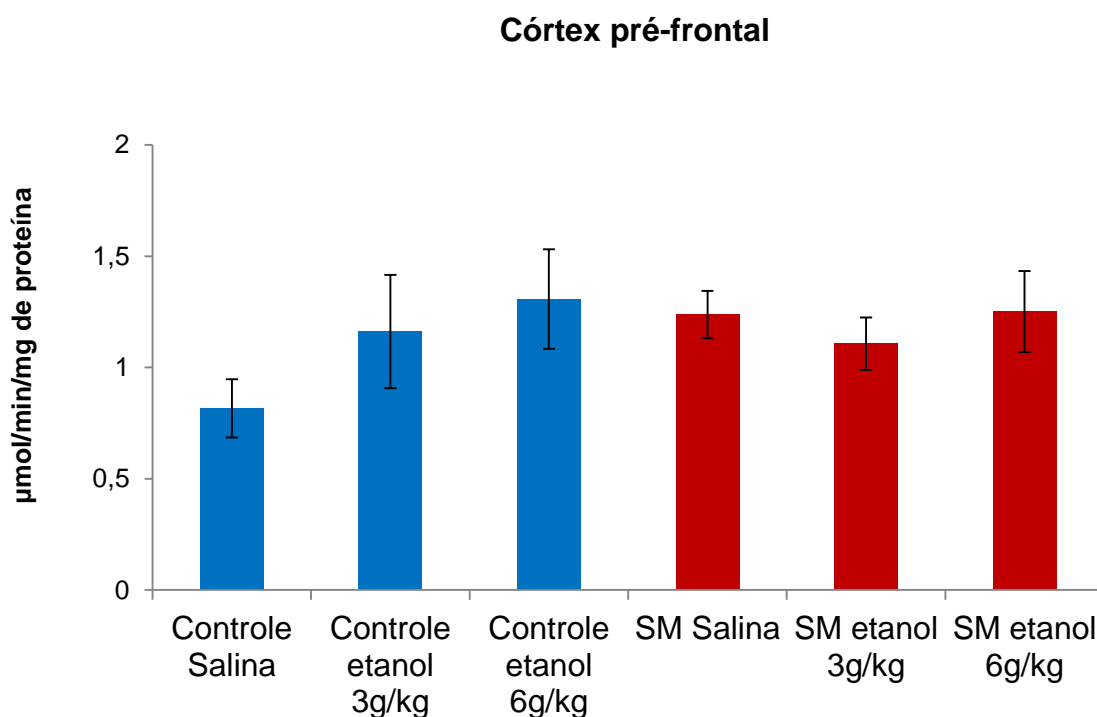


Figura 28: Avaliação da atividade enzimática da CAT no CPF. Dados expressos como média \pm EPM. N = 4-6/grupo.

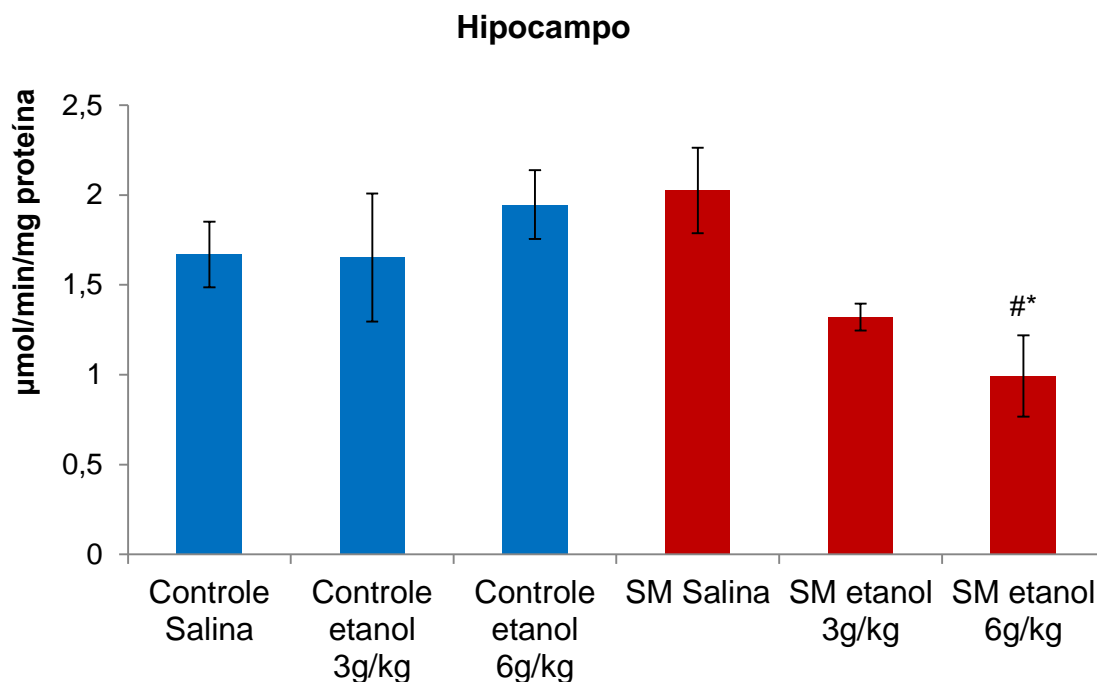


Figura 29: Avaliação da atividade enzimática da CAT no hipocampo. Dados expressos como média \pm EPM. N = 4-6/grupo.

*: Diferente do grupo SM Salina (Teste de Tukey $p < 0,05$)

#: Diferente do grupo Controle 6g/kg (Teste de Tukey $p=0,05$)

4.5.3 Atividade enzimática da glutathiona peroxidase (GPx)

Foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 30,575$, $p < 0,001$], e interação entre fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 11,332$, $p < 0,05$]. Além disso, o teste de Bonferroni mostrou que o grupo SM 3g/kg ($p < 0,05$), e o grupo SM Salina ($p < 0,001$) foram significativamente diferentes do grupo controle salina. Não houve efeito significativo do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,084$, $p > 0,05$] na atividade enzimática da GPx no CPF (figura 30).

Foi observado efeito significante da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 5,635$, $p < 0,05$]. Entretanto, não foi observado efeito do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 8,907$, $p > 0,05$] nem interações entres os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 8,907$, $p > 0,05$] na atividade enzimática da GPx no hipocampo (figura 31).

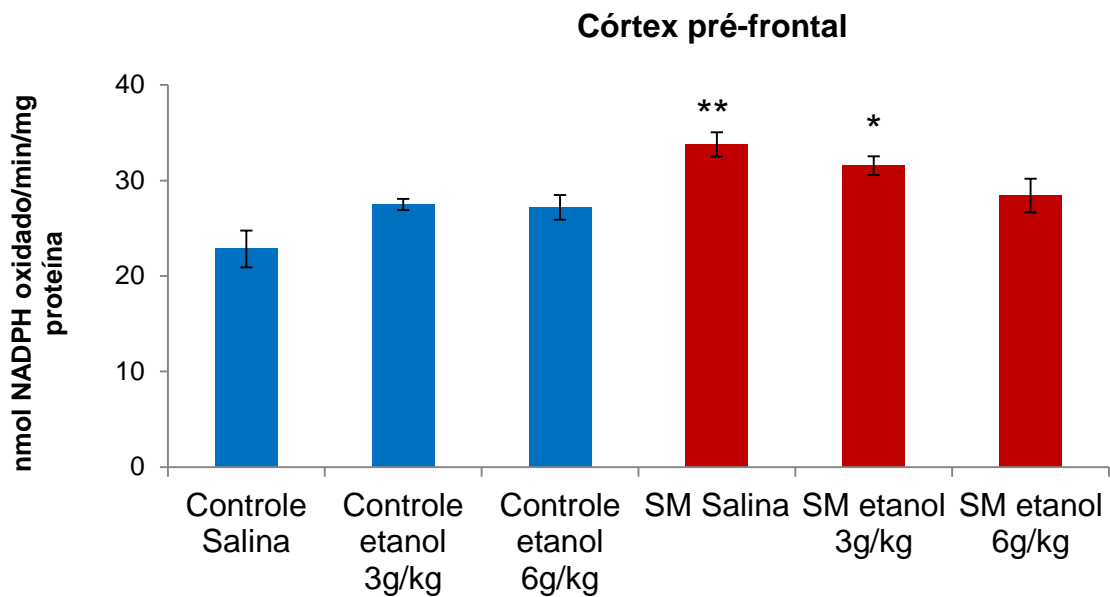


Figura 30: Avaliação da atividade da GPx no CPF. Dados expressos como média \pm EPM. N = 4-6/grupo.

** : Diferente do grupo Controle Salina (Teste de Bonferroni, $p < 0,001$).

*: Diferente do grupo Controle Salina (Teste de Bonferoni, $p < 0,05$).

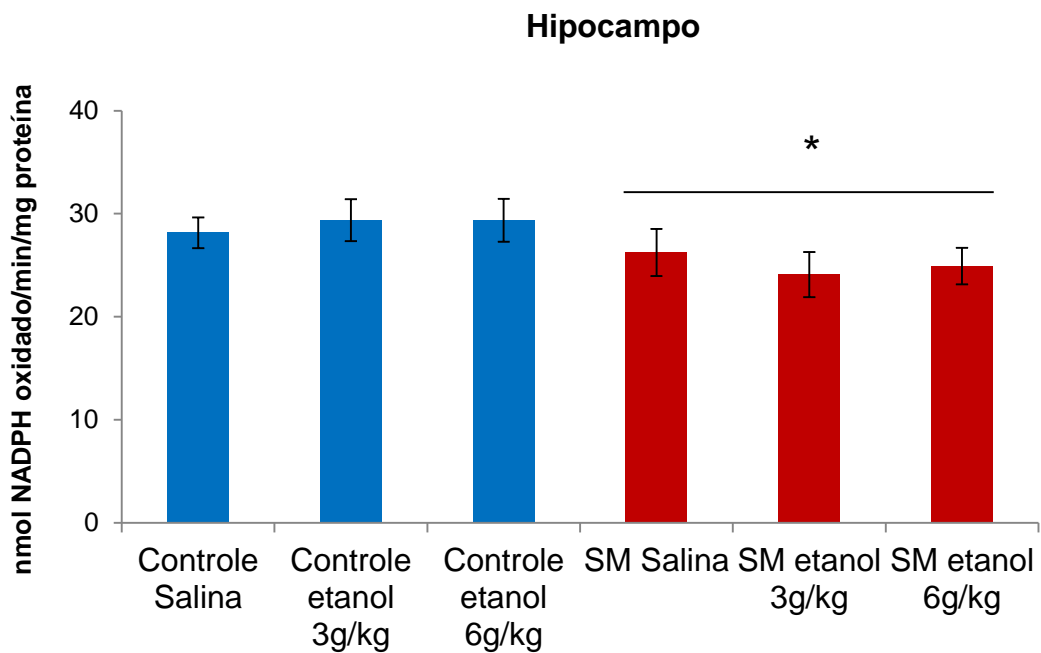


Figura 31: Avaliação da atividade da GPx no hipocampo. Dados expressos como média \pm EPM. N=5-6/grupo.

4.5.4 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

Não foi observado efeitos significativos da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 1,622$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,094$, $p > 0,05$] nem interações entre fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,613$, $p > 0,05$] na atividade enzimática da SOD no CPF (figura 32).

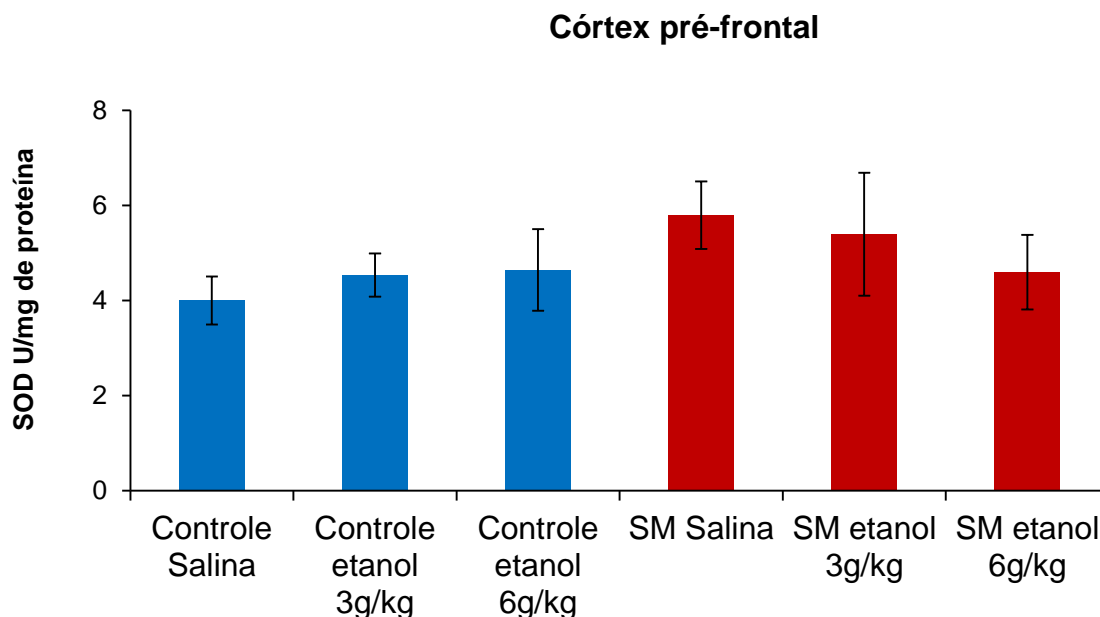


Figura 32: Avaliação da atividade enzimática da SOD no CPF. Dados expressos como média \pm EPM. N = 5-6/grupo.

Foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 6,647$, $p < 0,05$]. Entretanto, não foi observado efeito significativo do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,038$, $p > 0,05$] nem interação entre fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,532$, $p > 0,05$] na atividade enzimática da SOD no hipocampo (figura 33).

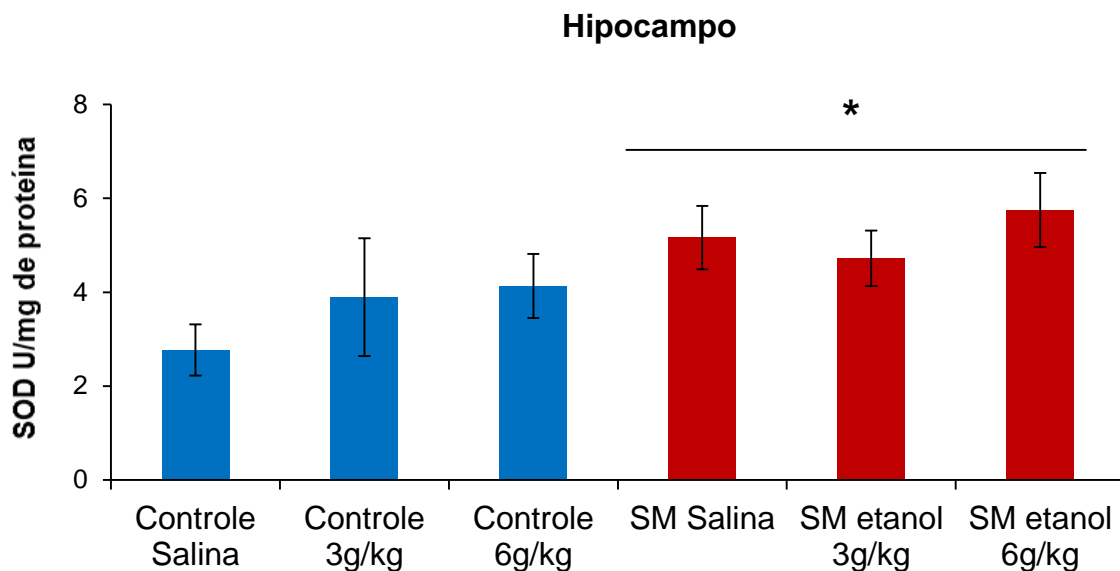


Figura 33: Avaliação da atividade enzimática da SOD no hipocampo. Dados expressos como média \pm EPM. N = 5-6/grupo.

4.5.5 Relações enzimáticas entre a CAT, GPx e SOD

Considerando que o sistema de defesa antioxidante enzimático se complementa, torna-se necessário avaliar as razões entre as enzimas capazes de produzir ERO e as capazes de degradá-los. Neste contexto, temos a avaliação de razões entre a enzima capaz de degradar ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (SOD) e as enzimas capazes de degradar peróxido de hidrogênio em água e/ou oxigênio (GPx, CAT). As relações entre as atividades das enzimas antioxidantes são utilizadas para avaliar algum possível efeito não identificado na dosagem unitária de cada enzima.

A primeira razão analisada foi entre a SOD e a CAT. Não foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 0,54$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 1,039$, $p > 0,05$] nem interações entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 0,334$, $p > 0,05$] no CPF (figura 34).

Foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 4,305$, $p < 0,05$]. Entretanto, não foi observado efeito do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 2,119$, $p > 0,05$] nem interação entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 1,745$, $p > 0,05$] na razão entre a SOD/CAT no hipocampo (figura 35).

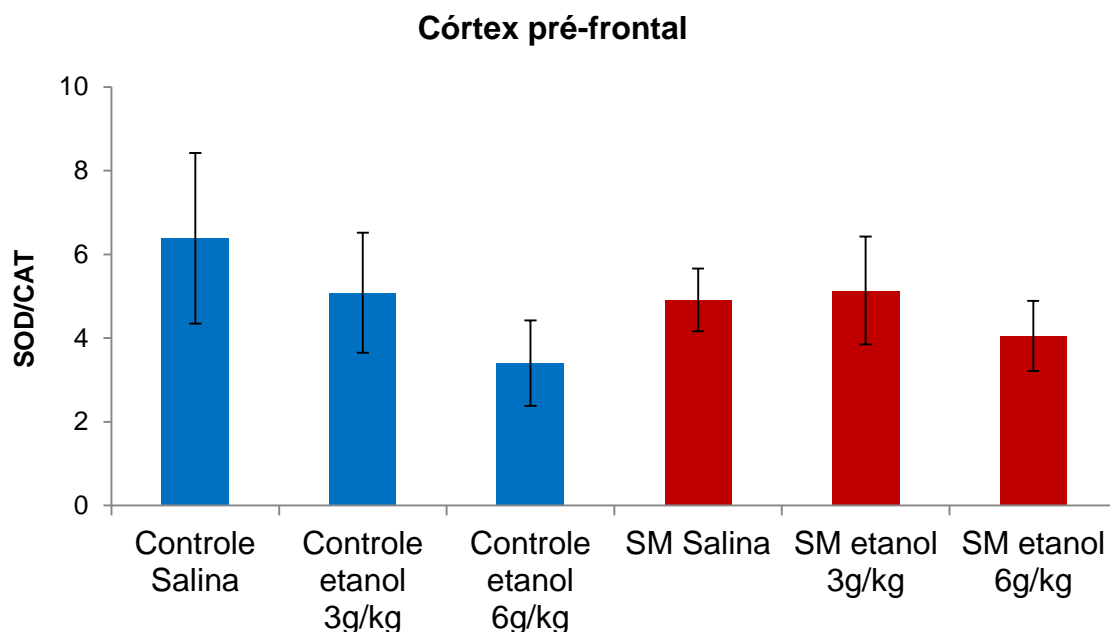


Figura 34: Avaliação da razão enzimática entre a SOD e a CAT no CPF. Dados expressos como média \pm EPM. N= 4-6/grupo.

A segunda razão analisada foi entre a SOD e a GPx. Não foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,031$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,392$, $p > 0,05$] nem interações entre fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,352$, $p > 0,05$] na razão SOD/GPx no CPF (figura 36).

Foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 13,885$, $p < 0,05$]. Entretanto, não foi observado efeito significativo do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 1,180$, $p > 0,05$] nem interações entre fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,34) = 0,206$, $p > 0,05$] sobre a razão SOD/GPx no hipocampo (figura 37).

A última razão enzimática analisada foi entre a SOD e o somatório da GPx e CAT (SOD/GPx+CAT). Foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 9,141$, $p < 0,05$]. Entretanto, não foi observado efeito do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 0,045$, $p > 0,05$] nem interação entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 0,569$, $p > 0,05$] na razão SOD/GPx+CAT no CPF (figura 38).

Hipocampo

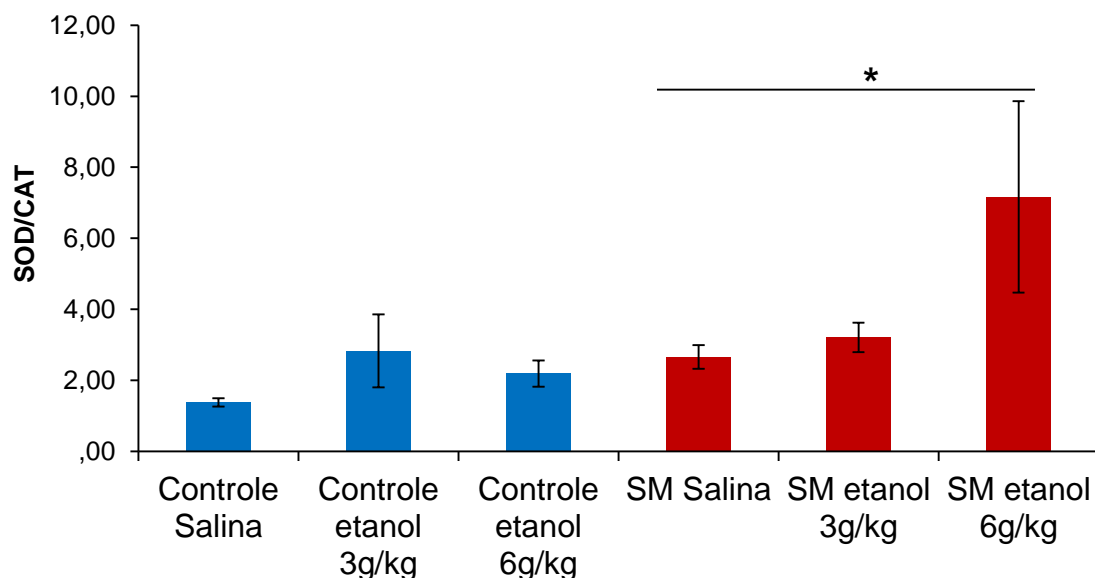


Figura 35: Avaliação da razão enzimática entre a SOD e a CAT no hipocampo. Dados expressos como média ± EPM. N=5-6/grupo.

Foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 15,316$, $p < 0,05$]. Entretanto, não foi observado efeito significativo do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 1,662$, $p > 0,05$] nem interações entre fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 0,368$, $p > 0,05$] na razão SOD/GPx+CAT no hipocampo (figura 39).

Córtex pré-frontal

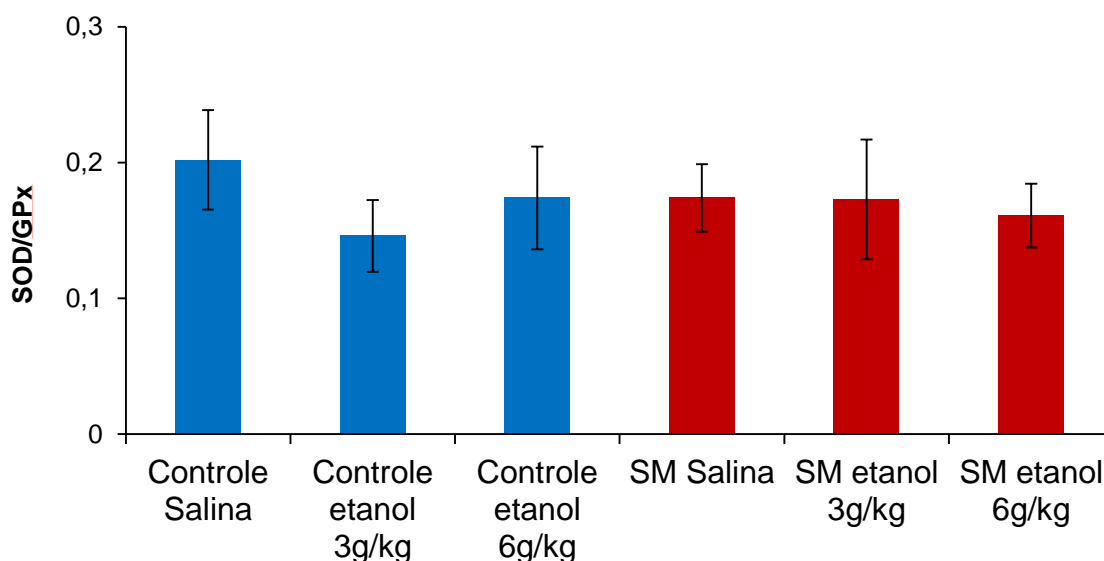


Figura 36: Avaliação da razão enzimática entre a SOD e a GPx no CPF. Dados expressos como média ± EPM. N = 5-6/grupo.

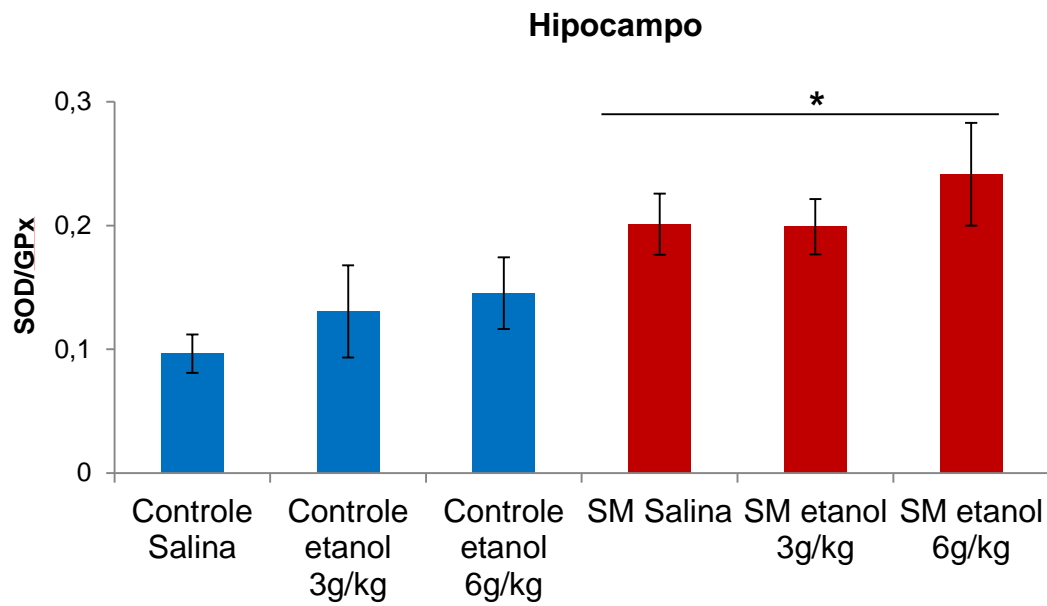


Figura 37: Avaliação da razão enzimática entre a SOD e a GPx no hipocampo. Dados expressos como média ± EPM. N=5-6/grupo.

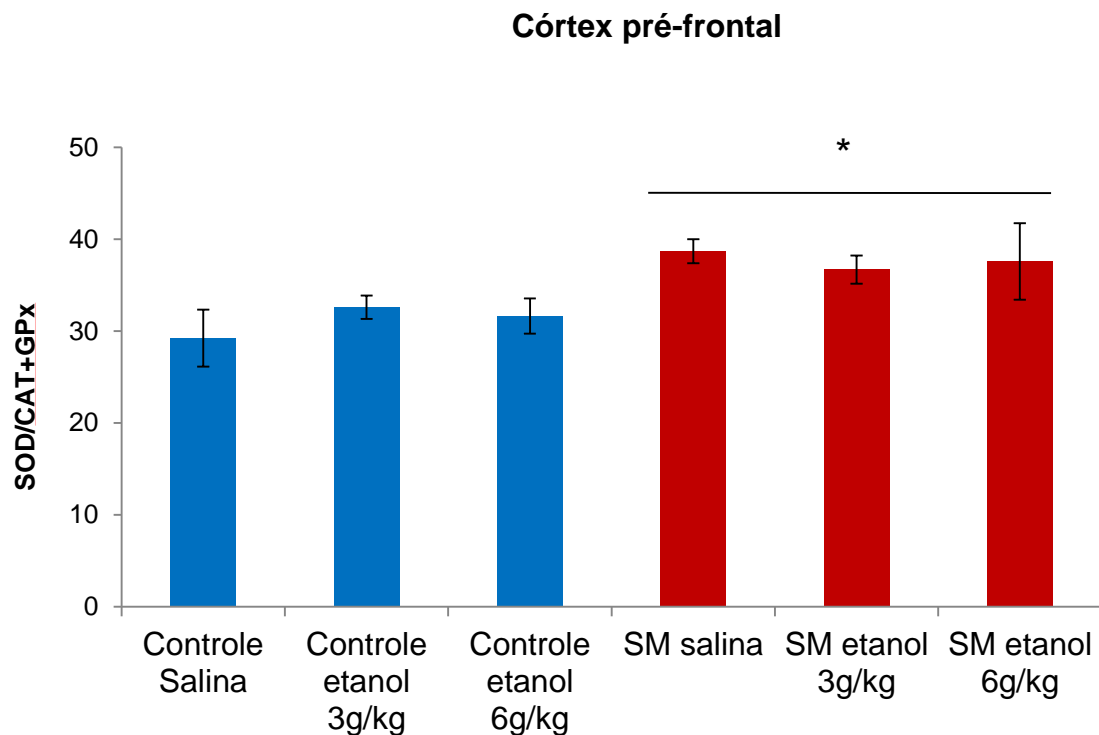


Figura 38: Avaliação da razão entre a SOD e o somatório da GPx e CAT no CPF. Dados expressos como média ± EPM. N = 4-6/grupo.

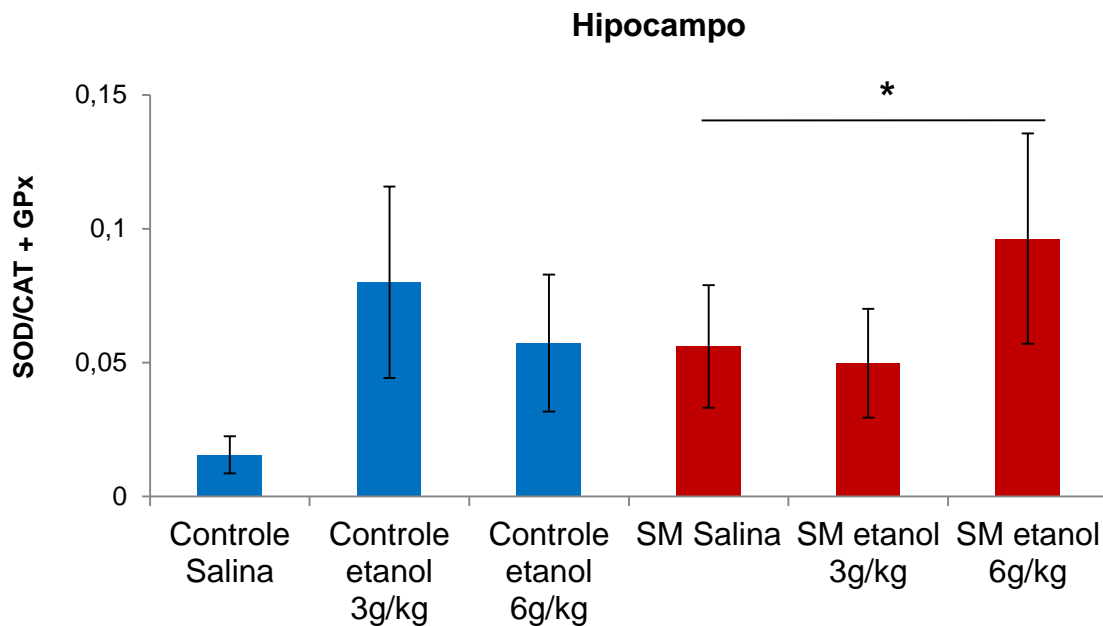


Figura 39: Avaliação da razão entre a SOD e o somatório da GPx e CAT no hipocampo. Dados expressos como média ± EPM. N=5-6/grupo.

4.5.6 Dosagem da formação de espécies reativas ao ácido tiobabitérico (TBARS)

Foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 107,803$, $p < 0,001$], e o teste de Bonferroni, mostrou que todos os grupos submetidos à separação materna foram diferentes dos grupos controle. Não houve efeito do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 0,712$, $p > 0,05$] nem interações entre os fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,33) = 0,003$, $p > 0,05$] de TBARS no CPF (figura 40).

Foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 8,926$, $p < 0,05$]. E o teste de Tukey mostrou que o grupo SM etanol 6g/kg foi diferente do grupo Controle Salina ($p < 0,05$) e do grupo Controle etanol 6g/kg ($p < 0,05$). Entretanto, não foi observado efeito do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 3,461$, $p > 0,05$] nem interações entre os fatores ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 0,029$, $p > 0,05$] nos níveis de TBARS no hipocampo (figura 41).

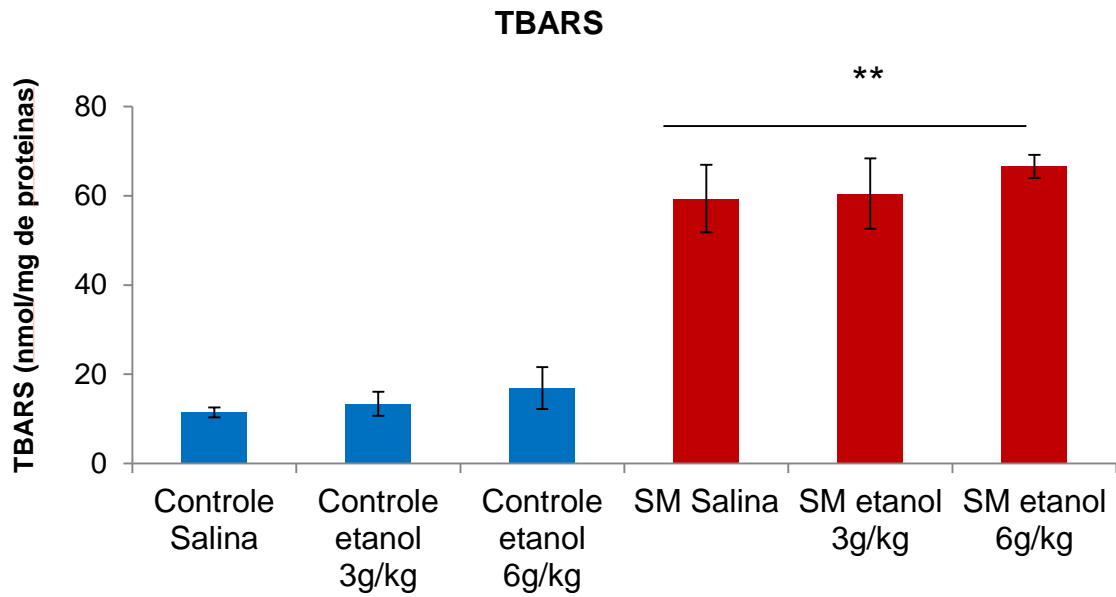


Figura 40: Avaliação dos níveis de TBARS no CPF. Dados expressos como média \pm EPM, N=5-6/grupo.

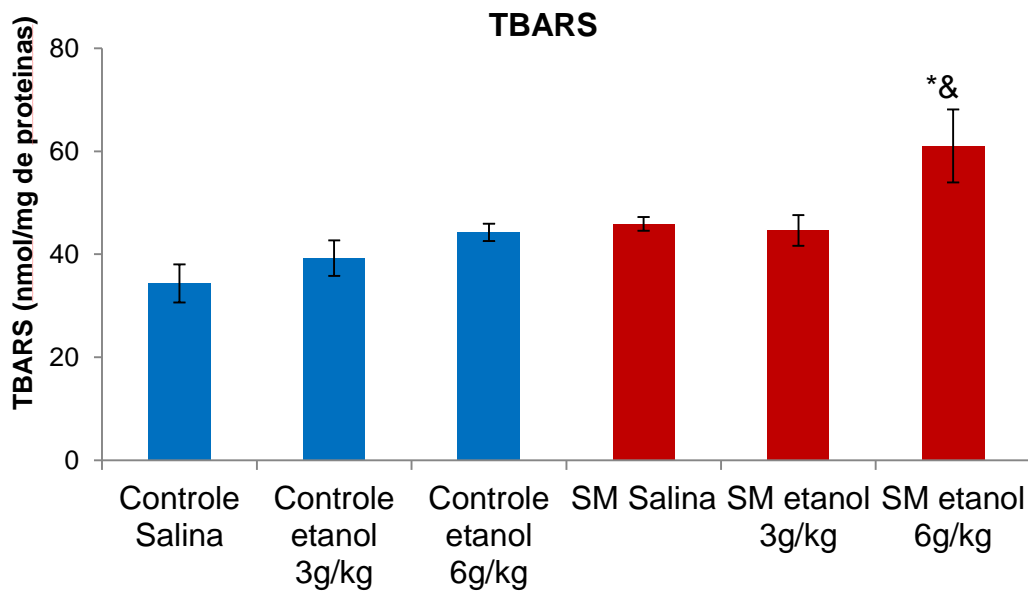


Figura 41: Avaliação dos níveis de TBARS no hipocampo. Dados expressos como média \pm EPM. N=5-6/grupo.

*: Diferente do grupo Controle Salina (Teste de Tukey, $p < 0,05$)

&: Diferente do grupo Controle etanol 6g/Kg (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

4.5.7 Dosagem de Tióis totais

Outro ensaio realizado foi a dosagem de tióis totais. Foi observado efeito significativo do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 3,457$, $p < 0,05$]. Entretanto, não foi observado efeito da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 0,678$, $p > 0,05$] nem

interação entre fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 1,711$, $p > 0,05$] nos níveis de tióis totais no CPF (figura 42).

Não foi observado efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 0,114$, $p > 0,05$], do etanol [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 1,620$, $p > 0,05$] nem interações entre fatores [ANOVA de duas vias, $F(1,31) = 0,226$, $p > 0,05$] nos níveis tióis totais no hipocampo (figura 43).

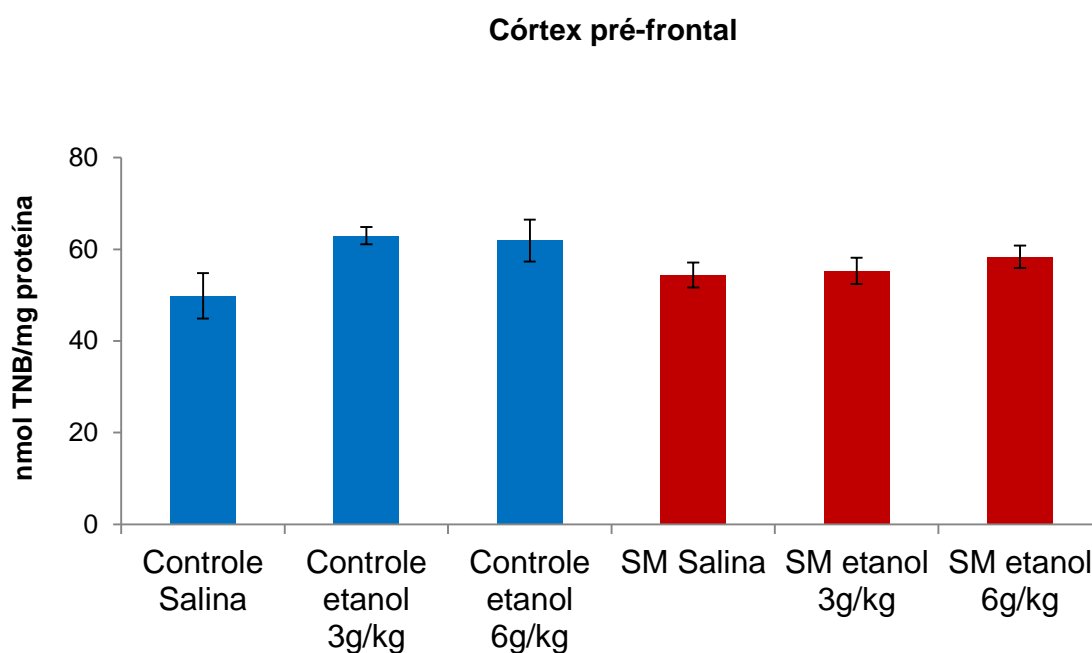


Figura 42: Avaliação de tióis totais no CPF. Dados expressos como média \pm EPM. N=5-6/grupo.

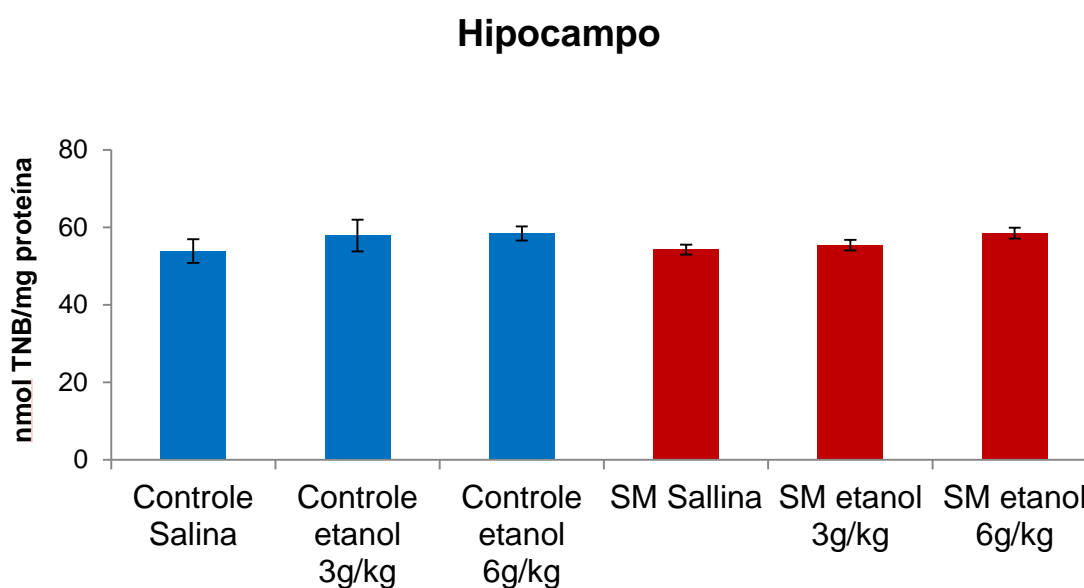


Figura 43: Avaliação de tióis totais no hipocampo. Dados expressos como média \pm EPM. N = 5-6/grupo.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou importantes resultados em relação aos efeitos da SM, um modelo de estresse neonatal, capaz de promover alterações comportamentais e bioquímicas. Tal procedimento foi capaz de induzir alterações na memória, bem como alterações nos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo na idade adulta. Mais especificamente, esta dissertação mostrou que a SM promoveu prejuízos na MLD (tratamento agudo de etanol em *binge*), e na fase da aquisição da memória (tratamento crônico de etanol em *binge*), sem ter apresentado alterações no aprendizado, no aprendizado reverso e memória espacial para ambos os tipos de tratamento em etanol em *binge*. Além disso, foi visto interação entre a SM e o etanol promovendo prejuízos na MCD (tratamento crônico de etanol em *binge*).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, no qual foi realizado somente nos animais submetidos ao tratamento crônico de etanol em *binge*, observamos que a SM promoveu o aumento da atividade enzimática da GPx, da relação SOD/CAT+GPx e aumento de TBARS no CPF. O etanol, por sua vez, foi capaz de promover o aumento de tíóis totais nessa estrutura. A SM também promoveu o aumento de ERO, diminuiu a atividade enzimática da GPx, aumentou a atividade enzimática da SOD, da razão SOD/CAT, SOD/GPx e SOD/CAT+GPx, e de TBARS. Além disso, observamos que a interação entre SM e etanol favoreceu a diminuição da atividade enzimática da CAT. Tais efeitos foram encontrados no hipocampo de ratos adultos expostos ao tratamento crônico. Em relação ao exposto acima, fica evidente que a SM e o etanol afetaram os parâmetros avaliados neste trabalho, produzindo alterações que se mantiveram até a vida adulta do animal, e que tais efeitos são dependentes da estrutura encefálica analisada.

Diversos trabalhos publicados apontam que eventos estressantes após o nascimento estão associados com o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na fase adulta, tais como ansiedade, esquizofrenia, autismo e alterações cognitivas como mudanças na atenção, no controle da impulsividade, no sono e na atividade motora (ANDERSEN, 2003; SWANSON e WADHWA, 2008; AISA et al., 2009; HART e RUBIA, 2012; ARNSTEN e RUBIA, 2012). A SM é um modelo de estresse neonatal que promove alterações em estruturas encefálicas, durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) contribuindo para o aparecimento de alterações comportamentais, neuroquímicas, hormonais e moleculares na vida adulta

(FUMAGALLI et al., 2007; AISA et al., 2009; TATA et al., 2014). Tais mudanças vêm sendo relacionadas ao possível efeito de longa duração na neuroplasticidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) causado pelo estresse neonatal, uma vez que a SM promove a ativação do eixo HHA durante o seu período hiporresponsivo, culminado na produção e liberação exacerbada de glicocorticoides, como corticosterona em roedores e cortisol em humanos, em resposta ao estresse na vida adulta (SPIGA et al., 2011; SCHIAVONNE et al., 2015). A alteração no eixo HHA foi vista em estudos realizados com a SM durante 180 minutos no PND2 ao PND14, no qual o eixo apresentou uma alta resposta ao estresse agudo quando estes animais estavam na fase jovem (UCHIDA et al., 2010).

Evidências mostram que o aumento da liberação de glicocorticoides, pela glândula adrenal está relacionado com a inibição do sistema de defesa antioxidante, gerando danos neurais em função do aumento do estresse oxidativo (SATO et al., 2010; SPIERS et al., 2015). Complementa-se ainda que a administração de corticosterona exógena durante 14 dias aumentou os níveis de indicadores oxidativos em células hipocâmpais. Em outros estudos, também foram vistos os mesmos efeitos quando houve a exposição à dexametasona, tanto em vivo quanto em células neuronais, e em culturas de células expostas à corticosterona por 24 horas, aumentando a susceptibilidade neuronal ao estresse oxidativo (YOU et al., 2009; MCINTOSH e SAPOLSKY, 1996; SATO et al., 2010; RACITI et al., 2016). Níveis elevados de glicocorticoides promove aumento das ERO, o que favorece o aumento da susceptibilidade encefálica aos danos ocasionados pela ativação de várias cascatas de reações celulares, promovendo aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, alterações morfológicas encefálicas, neuroinflamação e morte neuronal (GU, DEE e SHEN, 2011). Autores sugerem que algumas regiões do hipocampo apresentariam maior vulnerabilidade ao estresse crônico e ao agudo, bem como o córtex pré-frontal e amígdala de roedores (SPIERS et al., 2013), sendo as possíveis alterações observadas na neurogênese e no remodelamento de dendritos e sinapses (MCEWEN, 2007).

Neste trabalho foram observadas alterações no sistema enzimático antioxidante de ratos que sofreram a SM. Tais alterações estão associadas aos efeitos danosos que os glicocorticoides em excesso promovem no SNC pelo papel modulatório direto e indireto do estresse oxidativo mitocondrial e na fosforilação

oxidativa desencadeando o aumento da produção de ERO e conseqüentemente, alterações no sistema de defesa antioxidante (DU et al., 2009; YOU et al., 2009; SPIERS et al., 2015). Nossos resultados sugerem que o hipocampo apresentou uma maior susceptibilidade aos efeitos da SM, bem como alterações na atividade enzimática antioxidante.

As mitocôndrias são organelas que apresentam maior capacidade em produzir ERO (POYTON, BALL e CASTELLO, 2009), uma vez que durante o processo de metabolismo aeróbico tal organela utiliza o oxigênio como acceptor final de elétrons durante a fase final do processo de respiração celular (YONUTAS, VEKARIA e SULLIVAN, 2016). Em situações de homeostase, a reação entre o oxigênio e o recebimento de elétrons formam ânions superóxido na matriz mitocondrial, onde sofrem dismutação enzimática via SOD e, assim, geram peróxidos de hidrogênio, que por sua vez podem ser reduzidos a água pelas enzimas GPx, presente na matriz mitocondrial, e CAT, presente nos lisossomos (LIU et al., 2002; MULLER; LIU e VANREMMEN, 2004; BARYCK et al., 2007; CASH et al., 2007; PAITAL et al., 2013).

Aproximadamente 1 a 2% do oxigênio consumido na respiração celular, em condições fisiológicas, são convertidos em superóxidos, o que ocorre quando os elétrons saem prematuramente da cadeia transportadora e são transferidos irregularmente para o oxigênio molecular. No entanto, sob condições de estresse oxidativo, um número maior de elétrons pode sair precocemente da cadeia transportadora e, assim, promover um aumento de ânions superóxidos na matriz mitocondrial (ORRENIUS, GOGVADZE, e ZHIVOTOVSKY, 2007).

Em nosso trabalho foi visto um aumento da atividade da SOD pela SM no hipocampo. Autores afirmam que tal alteração está relacionada diretamente com o aumento de ERO, mais especificamente de ânions superóxido, que por sua vez induziriam alterações no perfil da atividade de enzimas antioxidantes e, assim, promoveriam o aumento da expressão da SOD, conforme foi visto em nossos resultados (WARNER et al., 1996; YOO, CHANG e RHO, 1999). Muitos estudos que envolvem modelos de estresse, como SM, privação do sono e isolamento social, apresentam aumentos da atividade da SOD nos animais estudados (SCHIAVONE et al., 2013).

Além dos ânions superóxido, o peróxido de hidrogênio também poderia atuar como um importante indutor da transcrição da SOD durante o estado de estresse

oxidativo (DELL'ORCO et al., 2016). Em nosso trabalho observamos um aumento na oxidação do DCFH, o qual apresenta grande sensibilidade à ação de peróxido de hidrogênio. Assim sendo, é plausível supor a presença de níveis aumentados de peróxido de hidrogênio no hipocampo de animais separados, o que poderia contribuir para o aumento na atividade da SOD.

Foram encontradas alterações da atividade enzimática da GPx. Tal enzima também é responsável pelo processo de degradação de peróxido de hidrogênio, reação na qual fornece pares de elétrons do grupamento tiol, presente na molécula de cisteína, para redução à duas moléculas de água (ROVER-JÚNIOR, HÖEHR e VELLASCO, 2001). A resposta mediante o estresse prolongado afeta as vias celulares antioxidantes, tornando as células mais vulneráveis aos danos oxidativos (SCHIAVONE, COLAIANNA e CURTIS, 2015).

Um potente regulador para a detoxificação de drogas e ERO é o fator nuclear derivado do eritroide 2 (Nrf2) (VARGAS e JOHNSON, 2009; ITOH et al., 2010; ZHANG et al., 2013; ITOH et al., 2015; LOBODA et al., 2016). Sua importância como regulador deve-se ao conjunto de regulações positivas na detoxificação enzimática e no aumento da expressão de proteínas antioxidantes. Em condições homeostáticas, o Nrf2 encontra-se associado à proteína inibidora Keap-1 que promove a ubiquitinação do fator e, conseqüentemente, a sua degradação (VILLENEUVE, LAU e ZHANG, 2010). O aumento intracelular de ERO promove a oxidação do resíduo de cisteína presente em Keap-1, permitindo a translocação de Nrf2 para o núcleo celular, onde dimeriza-se com proteínas e liga-se aos elementos de resposta antioxidante (ARE), promovendo a transcrição gênica da glutationa redutase e sintetase, tioredoxina, peroxiredoxina, entre outros elementos necessários para a manutenção do equilíbrio do redox celular (ITOH et al., 2003; NGUYEN, SHERRATT e PICKETT, 2003; KASPAR, NITURE e JAISWAL, 2009; ITOH, MIMURA e YAMAMOTO, 2010; SPIERS et al., 2015).

A exposição contínua a fatores de estresse oxidativo pode contribuir para a exaustão deste sistema e, assim, perda na sua capacidade antioxidante protetora. Estudos relatam que tanto os modelos de estresse, reproduzidos em animais, quanto a exposição ao etanol são capazes de promover depleção de GSH e, conseqüentemente, redução da atividade da GPx em estruturas encefálicas como o hipocampo e CPF (NARASIMHAN et al., 2011; ZLATKOVIC et al., 2014;

DJORDJEVIC et al., 2015). Além disso, estudos confirmam a diminuição da atividade da GPx, bem como redução de GSH, em hipocampo de animais que sofreram isolamento social e privação do sono (DJORDJEVIC et al., 2010; ALZOUBI et al., 2012). Tal resultado é interessante, uma vez que a depleção de GSH promove a ativação da apoptose seguida de morte neuronal (NARASIMHAN, MAHIMAINATHAN, RATHINAM, 2011).

Existem inúmeras vias de sinalização capazes que influenciar a resposta antioxidante perante as ERO, e estudos recentes indicam que a modulação de cálcio influencia tanto na geração de ERO quanto no processo de clearance com alteração do estado redox celular (ZHANG et al., 2015; SARDINA et al., 2012). O cálcio modula a produção de ERO através da ativação de enzimas como piruvato desidrogenase, oxoglutarato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e ATPase, que por sua vez culminam no aumento da produção de tais espécies reativas (LEWIS et al., 2014). Além disso, o íon cálcio parece modular o clearance de ERO através da modulação do sistema de defesa antioxidante, por meio da ativação direta de enzimas como CAT, glutathione redutase, indução do aumento dos níveis da SOD e liberação da glutathione mitocondrial através da indução transitória de permeabilidade na abertura do poro mitocondrial (GORDEEVA, ZVYAGILSKAYA e LABAS, 2003). Contudo, ERO podem regular a concentração citosólica de cálcio por promover alterações na atividade de canais dependentes de cálcio, inclusive nos canais do tipo L, receptores ou bombas de cálcio, através, por exemplo, da oxidação de grupos tióis presentes em sua estrutura (TOUYZ, 2005; YAN et al., 2006; NISHIDA et al., 2013).

As bombas de cálcio são inibidas devido à oxidação de resíduos de cisteína (BOGESKI e NIEMEYER, 2014), e isso promove o influxo de íons cálcio do citoplasma para o retículo endoplasmático. A depleção de cálcio intracelular pode estar associada com a diminuição da atividade da CAT, a qual é ativada somente na presença de calmodulina e do cálcio, ou seja: a depleção de cálcio, juntamente com o aumento de ânions superóxido produzidos durante o quadro de estresse oxidativo, são possíveis fatores contribuintes para a diminuição da atividade da CAT, corroborando o observado em nossos resultados (NORDBERG e ARNER, 2001; GORDEEVA, ZVYAGILSKAYA e LABAS, 2003).

O hipocampo apresentou vulnerabilidade aos efeitos da separação maternal sobre o estresse oxidativo. Há fortes evidências de que o aumento de ERO, tal qual o

observado nos resultados do ensaio de DCF, esteja associado à maior produção de peróxidos de hidrogênio no hipocampo, espécies às quais este teste possui maior sensibilidade (SEN e PARKER, 2002; SILVEIRA, 2004; MAO et al, 2012). O estresse oxidativo hipocampal ficou caracterizado pelo desequilíbrio entre o aumento de ERO, (possivelmente peróxidos de hidrogênio), e a diminuição das atividades enzimáticas antioxidantes, resultando, por exemplo, na peroxidação lipídica, o que corrobora achados da literatura (MIURA, MURAOKA e OGISO, 1996; UYSAL et al., 2005). O quadro de estresse oxidativo no hipocampo pode estar envolvido nas alterações na memória de longa duração dos animais, observada no teste de reconhecimento de objetos em animais submetidos ao *binge* agudo. O hipocampo é conhecido, primordialmente, como a estrutura encefálica capaz de realizar o processamento da memória de curta duração para a memória de longa duração (IZQUIERDO e MEDINA, 1997), e diversos estudos sugerem que o hipocampo seja a estrutura que apresenta maior vulnerabilidade aos efeitos da SM e do etanol, como foi evidenciado em nosso estudo (ARBEL et al., 1994; SAPOLSKY, 1996; SPIERS et al., 2015). Assim, possíveis alterações no estado redox de tal estrutura poderiam culminar em déficits cognitivos. Embora não tenham sido realizadas análises bioquímicas dos grupos submetidos ao *binge* agudo, muitos dos efeitos observados sobre o estresse oxidativo são devidos apenas à separação materna, sendo plausível que estes efeitos já estejam manifestos durante a adolescência dos animais.

Já nos grupos submetidos ao *binge* crônico, observamos alterações comportamentais tanto na memória de curta duração no TRO, na qual houve uma interação entre SM e etanol, quanto na fase da aquisição da memória no protocolo do labirinto em Y, a qual foi influenciada somente pela SM. Tais resultados distintos entre os tratamentos agudo e crônico já era esperado, uma vez que houve diferença na idade dos animais durante a execução do TRO em que os animais submetidos ao *binge* agudo eram mais jovens (35 PN) que em relação ao grupo submetido ao tratamento crônico (55 PN). Quando comparam-se os resultados de todos os testes comportamentais realizados neste trabalho, vê-se que são compatíveis com os encontrados na literatura, em que houve prejuízos cognitivos na memória tanto em animais que sofreram estresse neonatal quanto aqueles que foram expostos ao etanol em *binge* (SILVERS et al., 2003; AISA et al., 2009; DIEHL et al., 2012). Diversos mecanismos celulares podem estar envolvidos nos efeitos diferenciados dos

protocolos de *binge* agudo e crônico, como, por exemplo, alterações diferenciadas sobre alguns sistemas neurotransmissores.

Um sistema neurotransmissor importante para os mecanismos de memória é o sistema glutamatérgico. Os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA apresentam função essencial para o desenvolvimento do SNC, bem como em processos de neurotoxicidade (PAOLETTI, BELLONE e ZHOU, 2013). Eles estão localizados na membrana pós-sináptica, sendo constituído de sete subunidades, dentre elas GluN1 e GluN2 (LEE et al., 2007). A ativação dos receptores NMDA está associada a mecanismos celulares de potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD), juntamente com a memória e o aprendizado. A exposição aguda ao etanol pode promover a internalização da subunidade GluN2 presente nos receptores NMDA (SUVARNA et al., 2005), diminuindo o influxo intracelular de cálcio através do receptor de NMDA e, assim, contribuindo para o impedimento da potenciação de longa duração (LTP) (VAN DONGEN, 2009). Esses efeitos podem ter contribuído para o prejuízo no processo de conversão da MCD para MLD pelo hipocampo, favorecendo déficit na MLD dos animais submetidos à SM e ao etanol em *binge* agudo, conforme foi visto no presente trabalho. Além disso, a literatura relata que o estresse crônico, e consequente elevação de glicocorticoides, também induz a internalização das subunidades GluN2 no hipocampo (PICKERING et al., 2006).

A exposição ao *binge* crônico, contudo, gerou resultados diferentes no TRO. Estudos mostram que a exposição crônica do etanol, por até duas semanas, seguido por períodos de abstinência, produz aumento das subunidades GluN1 e GluN2 do receptor NMDA (FOLLESA e TICKU, 1996; ROBERTO et al., 2004; KUMARI, 2001; NAGY et al., 2003). O aumento de receptores de NMDA nas sinapses pode contrabalancear o efeito inibitório que o etanol possui quando está ligado ao receptor em questão, promovendo uma resposta adaptativa para a exposição prolongada ao etanol (CARPENTER-HYLAND, WOODWARD e CHANDLER, 2004). Além disso, o TRO do tratamento crônico foi realizado com animais mais velhos. Tal fator também pode ter influenciado no desempenho cognitivo.

Outra influência no desempenho cognitivo pode ser mediada através da modulação do sistema colinérgico, o qual está envolvido com funções cognitivas como memória, aprendizado, atenção, respostas emocionais, e inclusive na modulação do estresse (GU, 2002; VENTURA et al., 2010). Modelos de estresse neonatal mostram

que a modulação do sistema colinérgico torna o CPF mais vulnerável aos efeitos negativos deste processo (GULLEDGE et al., 2009). É importante ressaltar que os resultados de déficit cognitivo na MCD já eram esperados, uma vez que o CPF é uma estrutura altamente vulnerável aos efeitos de fatores externos devido a sua maturação tardia (HUTTENLOCHER e DABHOLKAR, 1997; SOWELL et al., 2001; GOGTAY et al., 2004).

Neste trabalho não foi visto efeito do etanol e da SM sobre a curva de aprendizado e aprendizado reverso. É possível que o labirinto em Y não tenha sensibilidade suficiente para demonstrar danos na memória espacial induzidos pelos protocolos aplicados, visto que vários trabalhos demonstram prejuízos cognitivos tanto em animais que sofreram estresse neonatal quanto nos expostos ao etanol em *binge* (SILVERS et al., 2003; AISA et al., 2009; DIEHL et al., 2012), em especial através da utilização do Labirinto Aquático de Morris. No entanto, nossos resultados apontam a fase de aquisição da memória como a mais susceptível aos efeitos da SM, conforme observado também em outros trabalhos (HUOT et al., 2002; NOSCHANG et al., 2010; DIEHL et al., 2012).

Os tióis apresentam a maior capacidade protetora antioxidante das proteínas plasmáticas, possuindo um importante papel na regulação da atividade enzimática, em fatores de transcrição e da proteção antioxidante (COSTA, SANTOS e LIMA, 2006; WLODEK, 2002), devido ao grupamento tiol funcionar como doador de elétrons. O grupo tiol está presente na cisteína, que realiza uma ligação peptídica com a glicina e glutamato formando um tripeptídeo linear conhecido como glutathione. O sistema glutathione-glutathione peroxidase, em presença de peróxidos de hidrogênio, permitem a oxidação destes ERO pela ativação do grupo tiol, presente na cisteína da glutathione, favorecendo a degradação de uma molécula de peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água (BARYCKI et al., 2007). Acrescentando a isso, sabe-se que são conhecidos 4 tipos de glutathione peroxidase, entretanto, uma forma muito conhecida é a fosfolipídeo hidropéroxido glutathione peroxidase na qual utiliza como substrato fosfolipídeos-hidropéroxidos (LEHMANN et al., 1998). Tal enzima é responsável pela redução de fosfolipídeos-hidropéroxidos originários de complexos lipídicos como colesterol presentes em membranas celulares.

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, acredita-se que o aumento da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, no CPF, é um indicativo

do aumento da peroxidação lipídica, levando ao aumento da atividade enzimática da hidróxido glutaciona peroxidase como um mecanismo de defesa antioxidante no CPF. Embora o ensaio para dosagem da GPx não tenha sido analisado especificamente para o tipo hidroperóxido glutaciona peroxidase, a ausência de alterações nas dosagens de DCF, SOD e CAT nos direcionam a suspeitar que o aumento da atividade enzimática da GPx poderia estar relacionado ao aumento da peroxidação lipídica.

Apesar da literatura relatar diminuição da GPx em animais que sofreram estresse neonatal, o aumento da atividade desta enzima foi evidenciado, em outros estudos, no CPF (ANSARI, BIGELOW e KAPLAN et al., 2003; HUANG e RHILBERT, 1995). Além disso, o estresse neonatal e a exposição crônica ao etanol em *binge*, também indutor na formação de ERO durante a adolescência, influenciaram o aumento da atividade da GPx no CPF. O aumento na dosagem de tióis encontrado no presente trabalho, no CPF, sugere relação com o aumento da peroxidação lipídica, talvez por uma resposta antioxidante compensatória.

Outro fator encontrado em nosso trabalho foi o aumento da razão SOD/GPx+CAT, que sugere que a atividade da SOD estaria elevada em relação às enzimas GPx e CAT. Como a SOD é uma enzima com capacidade de produzir peróxidos de hidrogênio, a sua atividade elevada está associada com o aumento destes, e, como consequência, temos reações entre o excesso de peróxidos de hidrogênio com fosfolípidos de membrana, influenciando no aumento espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. Estudos propõem que exposição a GCs contribua para o aumento da peroxidação no CPF (ZAFIR e BANNU, 2009). As alterações encontradas nos resultados do CPF podem estar relacionadas ao déficit cognitivo na fase de aquisição da memória dos animais submetidos ao labirinto em Y. Tal resultado corrobora estudos que indicam que a SM promove alterações comportamentais como perda cognitiva na aquisição da memória (HOUT et al., 2002).

O presente trabalho evidenciou, por meio dos resultados, que a SM e o consumo de etanol em *binge* durante a adolescência, são capazes de promover alterações comportamentais bem como modificações nos parâmetros de estresse oxidativo analisados.

6 CONCLUSÕES

- A SM induziu o aumento da peroxidação lipídica no CPF, o que pode ter prejudicado a MCD no labirinto em Y;
- O etanol induziu o aumento de tióis no CPF, possivelmente como uma resposta adaptativa do sistema de defesa antioxidante;
- No hipocampo, a SM induziu o aumento da formação de ERO e da atividade da SOD, bem como diminuição da atividade da GPx, e esses efeitos não se refletiram em alterações na MLD;
- Observamos interação entre SM e etanol promovendo a diminuição da atividade da CAT, que pode contribuir para aumento da vulnerabilidade aos efeitos de estresse oxidativo no hipocampo diante destes dois tratamentos;
- Os resultados demonstraram uma interação entre a SM e o etanol como fatores contribuintes para o déficit cognitivo na MCD e MLD, sugerindo alterações funcionais no hipocampo e CPF;
- Perspectivas deste trabalho:
 - Avaliação de dosagens bioquímicas de estresse oxidativo em estruturas encefálicas (CPF e hipocampo) em animais submetidos ao tratamento agudo de etanol em *binge*;
 - Dosagem plasmática de corticosterona;
 - Dosagem de cálcio intracelular.
- Este trabalho fornece resultados inéditos capazes de contribuir para o desenvolvimento de futuras investigações sobre a influência do estresse neonatal e o consumo de etanol em *binge* em parâmetros de estresse oxidativo.

7 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**. v. 105, s/n, p. 121–126, 1984.
- AISA, B.; ELIZALDE, N.; TORDERA, R.; LASHERAS, B.; DEL RI'Ó, J.; RAMIREZ, J. M. Effects of Neonatal Stress on Markers of Synaptic Plasticity in the Hippocampus: Implications for Spatial Memory. **Hipocampus**. v.19, n.12, p.1222–1231, 2009.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**. v. 302, n. 2-3, p. 141–145, 2001.
- ALZOUBI, K. H.; KHABOUR, O. F.; RASHID, B. A.; DAMAJ, I. M.; SALAH, H. A. The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment: the role of oxidative stress. **Behavioral brain research**. v. 226, s/n, p.205-210, 2012.
- ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience behavioral. Review**. v. 27, n. 1-2, p. 3-18, 2003.
- ANSARI, K. A.; BIGELOW, D.; KAPLAN, E. Glutathione peroxidase activity in surgical and autopsied human brains. **Neurochemical research**, v. 10, n.5, p. 703–711, 1985.
- ARBEL. I.; KADAR. T.; SILBERMAN. M.; LEVY, A. The effects of long-term corticosterone administration on hippocampal morphology and cognitive performance of middle-aged rats. **Brain Research**. v. 657, p. 227–235, 1994.
- ARNSTEN. A. F.; RUBIA K. Neurobiological circuits regulating attention, cognitive control, motivation, and emotion: disruptions in neurodevelopmental psychiatric disorders. **Journal american academic child adolescent psychiatry**. v. 51, s/n, p. 356-367, 2012.
- BARZDO, M.; GLOC, E.; JURCZYK, A. P.; MEISSNER, E.; JANKOWSKA, B.; BERENT, J.; SZRAM, S. Oxidative stress parameter analysis in rat brains during long-term ethanol intoxication. **Archiwum medycyny sadowej kryminol**. v. 55, n. 2, p. 134-7, 2005.
- BARYCKI, J. J.; ASARD, H.; STONE, J. M.; WILSON, M. A.; BANERJEE, R.; BECKER, D. F. Antioxidant Molecules and Redox Cofactors. **Redox biochemistry**. s/v, s/n, s/p, 2007.
- BEAR, MARK. F.; CONNORS, BARRY, W.; PARADISO, MICHAEL, A. Desvendando a neurociência. Ed. 2ª, Porto Alegre: **ARTMED**, 2002.
- BELL, R. L.; ROOD-HERINKS, Z. A.; KUC, K. A.; LUMENG, L.; LI, T. K.; MURPHY, J. M.; MCBRIDE, W.J. Effects of concurrent access to a single concentration or multiple concentrations of ethanol on the intake of ethanol by male and female periadolescent alcohol-preferring rats. **Alcohol**. v. 29, p. 137-148, 2003.

BOGESKI, I.; NIEMEYER, B. A. Redox regulation of ion channels. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 21, n. 6, p. 859-862, 2014.

BORROW, A. P.; STRANAHAN, A. M.; SUCHECKI, D.; YUNES, R. Neuroendocrine regulation of anxiety: Beyond the HPA axis. **Journal neuroendocrinology**. s/v, s/n, s/p, 2016.

BREESE, G. R., CRISWELL, H. E., CARTA, M., DODSON, P. D., HANCHAR, H. J., KHISTI, R. T.; MAMELI M.; MING Z.; MORROW, A.L.; OLSEN, R. W.; OTIS, T. S.; PARSONS, L.H.; PENLAND, S. N.; ROBERTO, M. SIGGINS, G. R.; VALENZUELA, C. F.; WALLNER, M. Basis of the gabamimetic profile of ethanol. *Alcoholism: clinical and experimental research*. v. 30, s/n, p. 731–744, 2006. doi: 10.1111/j.0145-6008.2006.00086.x

BRIONES, T. L.; WOODS, J. Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis. **Neuroscience**. v. 254, s/n, p. 324–334, 2013.

BOUTROS, N.; SEMENOVA, S.; LIU, W.; CREWS, F. T.; MARKOU, A. Adolescent intermittent ethanol exposure is associated with increased risky choice and decreased dopaminergic and cholinergic neuron markers in adult rats. **International journal of neuropsychopharmacology**. s/n, s/v, p. 1–9, 2015.

CAMARINI, R.; PAUTASSI, R. M. Behavioral sensitization to ethanol: Neural basis and factors that influence its acquisition and expression. **Brain research bulletin. Review**. v. 16, n.125, p. 53-78, 2016.

CARO, A. A.; CEDERBAUM, A. I. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. **Annual review pharmacology and toxicology**. v. 44, s/n, p. 27–42, 2004.

CARPENTER-HYLAND, E. P.; WOODWARD, J. J.; CHANDLER, L. J. Chronic ethanol induces synaptic but not extrasynaptic targeting of NMDARs. **Journal neuroscience**. v. 24, p. 7859-7863, 2004.

CASH, T. P.; PAN, Y.; SIMON, M. C. Reactive oxygen species and cellularoxygensensing. **Free radical. Biology and medicine**. v. 43, s/n, p.1219–1225, 2007.

CHAN, T.; KYERE, K.; DAVIS, B. R.; SHEMYAKIN, A.; KABITZKE, P. A.; SHAIR, H. N.; BARR, G. A.; WIEDENMAYER, C. P. The role of the medial prefrontal cortex in innate fear regulation in infants, juveniles, and adolescents. **Journal neuroscience**. v. 31, p. 4991- 4999, 2011.

CHARMANDAR, E. I. C.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual review of physiology**. v. 67, s/n, p. 259–284, 2005.

CHITTY K, M.; LAGOPOULOS, J.; HICKIE, I. B.; HERMENS, D. F. A longitudinal proton magnetic resonance spectroscopy study investigating oxidative stress as a result of alcohol and tobacco use in youth with bipolar disorder. **Journal of affective disorders**. v.175C, p. 481- 487, 2015.

CIPPITELLI, A.; DAMADZIC, R.; HAMELINK, C.; BRUNNQUELL, M.; THORSELL, A.; HEILIG, M.; ESKAY, R. L. Binge-like ethanol consumption increases corticosterone levels and neurodegeneration whereas occupancy of type II glucocorticoid receptors with mifepristone is neuroprotective. **Addiction biology**. v. 19, s/n, p. 27- 36, 2012.

CISA, 2016. Centro de Informações sobre Saúde e Álcool. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/4503/definicao-dose-padrao.php>>. Acesso: 30 de junho de 2016.

COSTA, C. M.; DOS SANTOS, R. C. C.; LIMA, E. S. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**. v. 42, n.5, p. 345-350, 2006.

COSTANTINI, D.; MARASCO, V.; MOLLER, A. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. **Journal of comparative physiology. B, biochemical systemic, and environmental physiology**. v. 181, n.4, p. 447–456, 2011.

COSTARDI, J. V. V.; NAMPO, R. A. T.; SILVA, G. L.; RIBEIRO, M. A. F.; STELLA, H. J.; STELLA, M. B.; MALHEIROS, S. V. P. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. **Revista da associação médica brasileira**. v. 61, n. 4, p. 381 387, 2015.

CRABB, D. W.; MATSUMOTO, M.; CHANG, D.; YOU, M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. **Proceedings of the nutrition society**. v. 63, s/n, p. 49–63, 2004.

CREWS, F. T.; MDZINARISHVILI, A.; KIM, D.; HE, J.; NIXON, K. Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. **Neurosciencer**. v. 137, p. 437- 445, 2006.

DAVACHI, L.; DUBROW, S. How the hippocampus preserves order: the role of prediction and context **Trends in cognitive sciences**. v. 19, p. 92 - 99, 2015.

DE BELLIS, M. D.; KESHAVAN, M. S.; CLARK, D. B.; CASEY, J. B.; GIEDD, J. N.; BORING, A. M.; FRUSTACI, K.; RYAN, N. D. Developmental traumatology part II: brain development. **Biological psychiatry**. v. 45, p. 1271-1284, 1999.

DELMAS-BEAUVIEUX, M. C.; PEUCHANT, E.; DUMON, M. F.; RECEVEUR, M. C.; LE BRAS, M.; CLERC, M. Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. **Clinical biochemistry**. v 28, p.163–169, 1995.

DELL'ORCO, M.; MILANI, P.; ARRIGONI, L.; PANSARASA, O.; SARDONE, V.; MAFFIOLI, E.; POLVERACCIO, F.; BORDONI, M.; DIAMANTI, L.; CERONI, M.; PEVERALI, F. A.; TEDESCHI, G.; CEREDA, C. Hydrogen peroxide-mediated

induction of SOD1 gene transcription is independent from Nrf2 in a cellular model of neurodegeneration. **Biochimistry and biophys acta**. v.1859, n.2, p.315-323, 2016.

DERIN, N.; AYDIN, S.; YARGICOGLU, P.; AGAR, A. Changes in visual evoked potentials, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rats exposed to restraint stress: effects of l-carnitine. **International journal neuroscience**. v. 116, n.3, p. 205-221, 2006.

DE VASCONCELLOS, A. P.; NIETO, F. B.; CREMA, L. M.; DIEHL, L. A.; DE ALMEIDA, L. M.; PREDIGER, M. E.; DA ROCHA, E. R.; DALMAZ, C. Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. **Neurochemical research**. v. 31, n.9, p. 1141-1151, 2006.

DICKER E.; CEDERBAUM, A. I. Hydroxyl radical generation by microsomes after chronic ethanol consumption. **Alcoholism: Clinical and experimental research**. v. 11, n. 3, p. 309–314,1987.

DIEHL, L. A.; ALVARES, L. O.; NOSCHANG, C.; ENGELKE, D.; ANDREAZZA, A. C.; GONÇALVES, C. A.; QUILLFELDT, J. A.; DALMAZ, C. Long-lasting effects of maternal separation on an animal model of post-traumatic stress disorder: effects on memory and hippocampal oxidative stress. **Neurochemical research**. v. 37, p. 700-707, 2012.

DINIS-OLIVEIRA, R. J. Oxidative and non-oxidative metabolomics of ethanol. **Current drug metabolism**. v. 17, p. 327-335, 2016.

DJORDJEVIC, J.; DJORDJEVIC, A.; ADZIC, M.; RADOJCIC, M. Chronic social isolation compromises the activity of both glutathione peroxidase and catalase in hippocampus of male Wistar rats. **Cellular and molecular neurobiology**. v. 30, p. 693–700, 2010.

DJORDJEVI, J.; DJORDJEVIC, A.; MIROSLAV, A.; MILOS, M.; LUKICA, I.; RADOJCICA, M. B. Alterations in the Nrf2–Keap1 signaling pathway and its downstream target genes in rat brain under stress. **Brain research**. v. 30, p. 20-31, 2015.

DOREMUS, F.; VARLINSKAYA, T. L.; SPEAR, L. P. E. Motivational systems in adolescence: possible implications for age differences in substance abuse and risk-taking behaviors. **Brain and cognition**. v.72, p. 114 – 123, 2010.

DORN, S.; WASCHER, C. A.; MÖSTL, E.; KOTRSCHAL, K. Ambient temperature and air pressure modulate hormones and behaviour in Greylag geese (*Anser anser*) and Northern bald ibis (*Geronticus eremita*). **Behavioral processes**. v. 376, p. 194 - 196, 2014.

DU, J.; WANG, Y.; HUNTER, R.; WEI, Y.; BLUMENTHAL, R.; FALKE, C.; KHAIROVA, R.; ZHOU, R.; YUAN, P.; MACHADO-VIEIRA, R.; MCEWEN, B. S.; MANJI, H. K. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids.

Proceedings of the national academy of science of the United States of America. v. 106, n.9, p.3543–3548, 2009.

ENACHE, M.; VAN WAES, V.; VINNER, E.; LHERMITTE, M.; MACCARI, S.; DARNAUDÉRY, M. Impact of an acute exposure to ethanol on the oxidative stress status in the hippocampus of prenatal restraint stress adolescent male rats. **Brain research.** v.29, n.1191, p.55-62, 2008.

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

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

FEIERMAN, D. E.; WINSTON, G. W.; CEDERBAUM, A. I. Ethanol oxidation by hydroxyl radicals: role of iron chelates, superoxide, and hydrogen peroxide. **Alcoholism: Clinical and experimental research.** V. 9, s/n, p. 95–102, 1985.

FERGUSON, G.; BRIDGE, W. Glutamate cysteine ligase and the age-related decline in cellular glutathione: The therapeutic potential of gglutamylcysteine. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 593, s/n, p.12- 23, 2016.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; N. P. MARRONI.; XAVIER, R. M. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clinical and experimental immunology.** v. 152, n. 3, p. 415–422, 2008.

FLEMING, L. R.; ACHESON, K. S.; MOORE, D. S.; WILSON, A. W.; SWARTZWELDER, S. H. In the rat, chronic intermittent ethanol exposure during adolescence alters the ethanol sensitivity of tonic inhibition in adulthood. **Alcohol clinical experience research.** v. 36, p. 279 - 285, 2012.

FOLLESA, P.; TICKU, M. K. Chronic ethanol-mediated up-regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture. **The journal of biology chemistry.** v. 271, n. 23, p. 13297-13299, 1996.

FONTELLA, F. U.; SIQUEIRA, I. R.; VASCONCELLOS, A. P.; TABAJARA, A.S.; NETTO, C. A.; DALMAZ, C. Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. **Neurochemical research.** v. 30, n. 1, p. 105-111, 2005.

FÖRSTERA, B.; CASTRO, P. A.; MORAGA-CID, G.; AGUAYO, L. G. Potentiation of gamma aminobutyric acid receptors (GABA_{AR}) by ethanol: how are inhibitory receptors affected? **Frontiers in cellular neuroscience.**v.10, n. 114, p. 1-17, 2016. doi: 10.3389/fncel.2016.00114

FRANKLIN, T. B.; SAAB, B. J.; MANSUY, I. M. Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. Review. **Neuron.** v.75, n.5, p. 747-61, 2012.

FREEDOM, H.; HOLLANDA, P. G.; DAVID, N.; POTTERB, E. H.; CHARTOFFB, H. C.; BRENHOUSE, A. Early life stress disrupts social behavior and prefrontal

cortexparvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. **Neuroscience letters**. v. 566 p. 131–136, 2014.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**. v.43, n.1, p. 61-68, 1997.

FUMAGALLI, F.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; RIVA, M. A. Stress during development: Impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology. **Progress in neurobiology**. v.81, p.197- 217, 2007.

FUSTER, J. M.; BODNE, M. R.; KROGER, J. K. Cross-modal and cross-temporal association in neurons of frontal cortex. **Nature**. v. 405, p. 347-351, 2000.

GARDNER, E. L. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 81, n. 2, p. 263–284, 2005.

GILPIN, N. W.; RICHARDSON, H. N.; KOOB, G. F. Effects of CRF1-receptor and opioid-receptor antagonists on dependence-induced increases in alcohol drinking by alcohol-preferring (P) rats. **Alcohol clinical experience research**. v. 32, n.9, p.1535-1542, 2008. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00745.x.

GOGTAY, N.; GIEDD, J. N.; LUSK, L.; HAYASHI, K. M.; GREENSTEIN, D.; VAITUZIS, A. C.; NUGENT, T. F III.; HERMAN, D. H.; CLASEN, L. S.; TOGA, A. W.; RAPOPORT, J. L.; THOMPSON, P. M. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. **Proceedings of the national academy of science of the United States of America**. v.25, n. 101, p. 8174-8179, 2004.

GORDEEVA, A. V.; ZVYAGILSKAYA, R. A.; LABAS, Y. A. Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. Review. **Biochemistry**. v. 68, n. 10, p. 1077-1080, 2003.

GORSKY, L. D.; KOOP, D. R.; COON, M. J. On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. **The journal of biological chemistry**. v. 259, n. 68, p. 12–17,1984.

GROBIN, A. C.; MATTHEWS, D. B.; DEVAUD, L. L.; MORROW, A. L. The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol. **Psychopharmacology**. v.139, s/n, p. 2–19, 1998. doi: 10.1007/s002130050685

GU, Y.; DEE, C, M.; SHEN, J. Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. **Frontier bioscience**. v. 3, s/n, p. 1216-1231, 2011.

GU, Q. Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. **Neuroscience**. v. 111, n. 4, p. 815-835, 2002.

- GUEST, J.; GUILLEMIN, G. J.; HENG, B.; GRANT, R. Lycopene Pretreatment Ameliorates Acute Ethanol Induced NAD(+) Depletion in Human Astroglial Cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**: v. 2015, s/n, p. 1-8, 2015. doi: 10.1155/2015/741612.
- GULLEDGE, A. T.; BUCCI, D. J.; ZHANG, S. S.; MATSUI, M.; YEH, H. H. M1 receptors mediate cholinergic modulation of excitability in neocortical pyramidal neurons. **Journal neuroscience**. v. 29, n. 31, p.9888–9902, 2009.
- GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y. Effect of a novel 5-HT3 receptor antagonist 4i, in corticosterone-induced depression-like behavior and oxidative stress in mice. **Steroids**. v. 96, p. 95-102, 2015.
- HAGEWOUD, R.; HAVEKES, R.; TIBA, P. A.; NOVATI, A.; WEINREDER, K. P. H.; VAN DER ZEEE, A.; MEERLO, P. Coping with Sleep Deprivation: Shifts in Regional Brain Activity and Learning Strategy. **SLEEP**. v. 33, n. 11, p. 1465-1473, 2010.
- HART, H.; RUBIA, K. Neuroimaging of child abuse: a critical review. **Frontiers human neuroscience**. v. 6, n. 52, p.1-24, 2010.
- 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.15, n. 49, p. 1023-1039, 2001.
- HERNÁNDEZ, J. A.; ROSA C.; LÓPEZ-SÁNCHEZ.; RENDÓN-RAMÍREZ, A. Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. **Oxidative medicine and cellular longevity**. v. 16, s/n, p. 1-15, 2016.
- HITCHON, C. A & EL-GABALAWY, H. S. "Oxidation in rheumatoid arthritis," **Arthritis Research and Therapy**. v. 6, n. 6, p. 265–278, 2004.
- HOLLAND, F. H.; GANGULY, P.; POTTER, D. N.; CHARTOFF, E.H.; BRENHOUSE, H. C. Early life stress disrupts social behavior and prefrontal cortex parvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. **Neuroscience letter**. v. 30, n.566, p. 131-136, 2014.
- HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neuroscience research**. v. 68, n.4, p. 261–275, 2010.
- 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, n.1-2, p. 52–63, 2002.
- HUTTENLOCHER, P. R.; DABHOLKAR, A. S. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. **The Journal of comparative neurology**. v. 387, n. 2, p. 167–78, 1997.
- HUANG, J.; RHILBERT, M. A. Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. **Brain research**, v. 680, n. 1-2, p. 16–22, 1995.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (IBGE). Tabela 4365 - **Pessoas de 18 anos ou mais de idade com consumo abusivo de álcool nos últimos 30 dias anteriores à pesquisa, total, percentual e coeficiente de variação, por grupos de idade e situação do domicílio**, 2016.

ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; ISHII, T.; O'CONNOR, T.; YAMAMOTO, M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. **Genes cells**. v. 8, n.4, p. 379-391, 2003.

ITOH, K.; MIMURA, J.; YAMAMOTO, M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. **Antioxidant redox signal**. v. 1, n.13, p.1665-1678, 2010.

ITOH, K.; YE, P.; MATSUMIYA, T.; TANJI, K.; OZAKI, T. Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria. Review. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**. v. 56, n. 2, p. 91-97, 2015.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.M. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**. v. 68, n. 973799, p.285–316, 1997.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J.H.M. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635-636, 1998.

JAIMES-HOY, L.; GUTIÉRREZ-MARISCAL, M.; VARGAS, Y.; PÉREZ-MALDONADO, A.; ROMERO, F.; SÁNCHEZ-JARAMILLO, E.; CHARLI, J. L.; JOSEPH-BRAVO, P. Neonatal maternal separation alters, in a sex specific manner, the expression of TRH, of TRH-degrading ectoenzyme in the rat hypothalamus, and the response of the thyroid axis to starvation. **Endocrinology**. s/v, s/n, s/p, 2016.

JOB, M. O.; TANG, A.; HALL, F. S.; SORA, I.; UHL, G. R. ; BERGESON, S. E. ; GONZALES, R. A. Mu (mu)opioid receptor regulation of ethanol-induced dopamine response in the ventral striatum: evidence of genotype specific sexual dimorphic epistasis. **Biological psychiatry**. v. 62, n.6, p.627- 634, 2007.

JOHN, C. D.; SAHNI, V.; MEHET, D.; MORRIS, J. F.; CHRISTIAN, H. C.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J.; SOLITO, E.; BUCKINGHAM, J. C. Formyl peptide receptors and the regulation of ACTH 876 secretion: targets for annexin A1, lipoxins, and bacterial peptides. **FASEB Journal**. v.21, n.4, p. 1037-1046, 2007.

KAPLAN, P.; BABUSIKOVA, E. J.; LEHOTSKY.; DOBROTA, D. "Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum," **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 248, n. 1-2, p. 41-47, 2003.

KASPAR, J. W.; NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. "Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free radical biology and medicine**. v. 47, n.9, p. 1304–1309, 2009.

KLOET, E. R.; ROTS, N. Y.; COOLS, A. R. Brain-corticosteroid hormone dialogue: slow and persistent. **Cellular and molecular neurobiology**. v. 16, n.3, p. 345-356, 1996.

KLOET, E. R.; OTTE, C.; KUMSTA, R.; KOK, L.; HILLEGERS, M. H.; HASSELMANN, H.; KLIEGEL, D. JOËLS, M. STRESS and DEPRESSION a crucial role of the mineralocorticoid receptor. **Journal of neuroendocrinology**. 2016, doi: 10.1111/jne.12379.

KOLB, B.; MYCHASIUK, R.; MUHAMMAD, A.; LI, Y.; FROST, D. O.; GIBB, R. Experience and the developing prefrontal cortex. **Proceedings of the national academy of science of the United States of America. Review**. v. 16, n.109, p. 17186-17193, 2012.

KOOB, G.; KREEK, M. J. Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. **The american journal of psychiatry**. v.164, n. 8, p. 1149-1159, 2007.

KOSS, W. A.; SADOWSKI, R. N.; SHERRIL, L. K.; GULLEYI, J. M.; JURASKA, J. M.; Effects of ethanol during adolescence on the number of neurons and glia in the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala of adult male and female rats, **Brain research**. v. 23, n.1466, p. 24-32, 2012.

KUMARI, M. Differential effects of chronic ethanol treatment on N-methyl-D-aspartate R1 splice variants in fetal cortical neurons. **The journal of biology chemistry**. v. 276, n. 32, p. 29764-29771, 2001.

LAJUD, A.; ROQUE, A.; CAJERO, MARCO.; GABRIEL, B.; GUTIE´RREZ-OSPINA, C.; TORNER, L. A. 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. 410-420, 2012.

LEE, C. H.; LU, W.; MICHEL, J. C.; GOEHRING, A.; DU, J.; SONG, X.; GOUAUX, E. NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. **Nature**. s/v, s/n, s/p, 2014. doi:10.1038/nature13548.

LEHMANN, C.; WOLLENBERGER, U.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SCHELLER, F. W. Bioelectrocatalysis by a selenoenzyme. **Journal electroanalytical chemistry**. v.455, 259-263. 1998.

LEWIS, A.; HAYASHI, T.; SU, T. P.; BETENBAUGH, M. J. Bcl-2 family in inter-organelle modulation of calcium signaling; roles in bioenergetics and cell survival. **Journals of bioenergetics and biomembranes. Review**. v. 46, n. 1, p. 1-15, 2014.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **Journal neurochemical**. v. 80, s/n, p. 780–787, 2002.

LIU, W.; CREWS, F.T. Adolescent intermittent ethanol exposure enhances ethanol activation of the nucleus accumbens while blunting the prefrontal cortex responses in adult rat. **Neuroscience**. v. 293, s/n, p. 92–108, 2015.

LINDEMEYER, A. K.; LIANG, J.; MARTY, V. N.; MEYER, E. M.; SURYANARAYANAN, A.; OLSEN, R. W.; SPIGELMAN, I. Ethanol-induced plasticity of GABAA receptors in the basolateral amygdala. **Neurochemical research**. v. 39, n.6, p.1162-1170, 2014. doi: 10.1007/s11064-014-1297-z.

LOBODA, A.; DAMULEWICZ, M.; PYZA, E.; JOZKOWICZ, A.; DULAK, J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. Review. **Cellular and molecular life sciences**. s/v, s/n, s/p, 2016.

LUNA, B. A.; PADMANABHAN, K.; O'HEARN. What has fMRI told us about the development of cognitive control through adolescence? **Brain and cognition**. v. 72, n.1, p. 101-113, 2010.

LÜSCHER, C.; MALENKA, R. C. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. **Neuron**. v. 69, n. 4, p. 650-663, 2011.

MAO, W.; CHEN, X.; YANG, T.; YIN, Y.; GE, M.; LUO, M.; CHEN, D.; QIAN, X. A rapid fluorescent screening method for cellular sensitivity to anti-cancer compound. **Cytotechnology**. v. 64, n.4, p. 451-457, 2012.

MCCLAIN, J. A.; MORRIS, S. A.; DEENY, A. M. S.; MARSHALL, ALEX.; HAYES, D. M.; KISER, Z. M.; NIXON, K. Adolescent binge alcohol exposure induces long-lasting partial activation of microglia. **Brain behavior and immunity**. v.25, s/n, p.120–128, 2011. doi:10.1016/j.bbi.2011.01.006.

MCEWEN, B. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological reviews**. v. 87, n. 3, p. 873–904, 2007.

MCINTOSH, L. J.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. **Explore neurology**. v. 141, p. 201–206, 1996.

MCINTOSH, L. J.; CORTOPASSI, K. M.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. **Brain research**. v. 27, n. 791, p.215-222, 1998.

MELONI, J. N.; LARANJEIRA, R. Custo Social e de Saúde. **Revista brasileira de psiquiatria**. v. 26, s/n, p. 7-10, 2004.

MICZEK, K. A.; YAP, J. J.; COVINGTON III, H. E. Social stress, therapeutics and drug abuse: Preclinical models of escalated and depressed intake. **Pharmacology therapeutics**. v. 120, n.2, p. 102-128, 2008.

MIURA, T.; MURAOKA, S e OGISO, T. Inhibition of lipid peroxidation by estradiol and 2-hydroxyestradiol. **Steroids**, v. 61, p. 379–383, 1996.

MOORE, K. I. M.; GUNDY, P.; PASVOGEL, A.; MONTGOMERY, D.W.; TAYLOR, O. A.; KOERNER, K. M.; MCCARTHY, K.; HOCKENBERRY, M. J. Increase in oxidative stress as measured by cerebrospinal fluid lipid peroxidation during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal pediatric hematology/ oncology**. v. 37, n.2, p. 86-93, 2015.

MORRIS, S. A.; EAVES, D. W.; SMITH, A. R.; NIXON, K. Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. **Hippocampus**. v. 20, s/n, p.596–607, 2010.

MUHAMMAD, A.; KOLB, B. Mild prenatal stress-modulated behavior and neuronal spine density without affecting amphetamine sensitization. **Developmental neuroscience**. v. 33, n.2, p. 85-98, 2011.

MULLER, F. L.; LIU, Y.; VANREMMEN, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. **Journal biology chemistry**. v. 279, n.47, p. 49064–49073, 2004.

NAGY, J.; KOLOK, S.; DEZSO, P.; BOROS, A.; SZOMBATHELYI, Z. Differential alterations in the expression of NMDA receptor subunits following chronic ethanol treatment in primary cultures of rat cortical and hippocampal neurones. **Neurochemistry international**. v. 42, n.1, p.35-43, 2003.

NARASIMHAN, M.; MAHIMAINATHAN, L.; RATHINAM, M, L.; RIAR, A.K.; HENDERSON, G. I. Overexpression of Nrf2 protects cerebral cortical neurons from ethanol-induced apoptotic death. **Molecular pharmacology**. v. 80, n. 6, p. 988-999, 2011.

NEYLANDER, I.; ROMAN, E. Is the rodent maternal separation model a valid and affective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption? **Psychopharmacology**, v. 229, n.4, p.555-569, 2013.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A. I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **International journal neuropsychopharmacology**. v 11, n.6, p.851–876, 2008.

NGUYEN, T.; SHERRATT, P. J.; PICKETT, C. B. “Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidante response element,” **Annual review of pharmacology and toxicology**. v. 43, s/n, p. 233-260, 2003.

NISHI, M.; HORII-HAYASHI, N.; SASAGAWA, T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. **Frontiers in neuroscience**. v. 8, n.166, p. 1-6, 2014.

NISHIDA, M.; ISHIKAWA, T. S.; SAIKI, S.; SUNGGIP, C.; ARITOMI, S.; HARADA, E.; KUWAHARA, K.; HIRANO, K.; MORI, Y.; KIM-MITSUYAMA, S. Voltage-dependent Ntype Ca²⁺ channels in endothelial cells contribute to oxidative stress-related endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 434, n. 2, p. 210-216, 2013.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**. v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NOSCHANG, C.; KROLOW, R.; ARCEGO, D, M.; TONIAZZO, A, P.; HUFFELL, A, P.; DALMAZ, C. Neonatal handling affects learning, reversal learning and antioxidant enzymes activities in a sex-specific manner in rats. **International journal developmental neuroscience**. v. 30, n.4, p. 285-291, 2010.

ODEON, M. M.; SALATINO, E. A.; ACOSTA, G. B. Consequences of Postnatal Stress: Maternal Separation in Rats Induces Long-Lasting Changes on Glutamate Transporters. **Clinical and experimental pharmacology**. v. 3, n. 2-3, p. 1-7, 2013.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. **Annual review of pharmacology and toxicology**. v.47, s/n, p. 143-183, 2007.

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, s/n, p. 541–550, 2007.

PASCUAL, M.; PLA, A.; MIÑARRO, J.; GUERRI, C. Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. **Alcohol and Alcoholism**. v. 49, n. 2, p. 187–192, 2014.

PASTOR, R.; ARAGON, C. M. The role of opioid receptor subtypes in the development of behavioral sensitization to ethanol. **Neuropsychopharmacology**. v.31, n. 7, 1489-1499, 2006.

PAITAL, B.; KUMAR, S.; FARMER, R.; CHAINY, G, B. In silico prediction of 3D structure of Mn superoxide dismutase of *Scylla serrata* and its binding properties with inhibitors. **Interdiscipline science**. v. 5, n.1, p. 69-76, 2013.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature reviews. Neuroscience**. v.14, n.6, p. 383-400, 2013.

PEDRELLI, P.; BORSARI, B.; PALM, K. M.; DALTON, E.; FAVA, M. Combined MI + CBT for Depressive Symptoms and Binge Drinking Among Young Adults: Two Case Studies. **Journal of cognitive psychotherapy**. v. 27, p. 235 - 257, 2013.

PERVANIDOU, P.; CHROUSOS, G. P. Posttraumatic Stress disorder in children and adolescents: neuroendocrine perspectives. **Endocrinology**. v. 5, n.245, p.1-7, 2012.

PHANIENDRA, D. B.; JESTADI.; PERIYASAM, L. Y. "Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases," **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.

PICKERING, C.; GUSTAFSSON, L.; CEBERE, A.; NYLANDER, I.; LILJEQUIST, S. Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. **Brain research**. v. 1099, n. 1, p. 101-108, 2006.

PIVOVARCHIK, M. V. Change of dopamine, serotonin and opioid neuromediator systems in the brain of rats adapted to prolonged effect of ethanol. **Ukr biokhim zh**. v. 76, n.2, p 93-97, 2004.

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. **Brain research molecular brain research**. v. 18, n.3, p. 195-200, 1993.

POYTON, R. O.; BALL, K. A.; CASTELLO, P. R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends endocrinology metabolism. Review**. v. 20, n.7, p.332-40, 2009.

PRYCE, C. R.; RÜEDI-BETTSCHEIN, D.; DETTLING, A. C.; WESTON, A.; RUSSIG, H.; FERGER, B.; FELDON, J. Long-term effects of early life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. **Neuroscience biobehavioral reviews**. v. 29, n4-5 p. 649-674, 2005.

RACITI. M.; ONG. J.; WEIS. L.; EDOFF. K.; BATTAGLI. C; FALK. A.; CECCATELLI. S. Glucocorticoids alter neuronal differentiation of human neuroepithelial-like cells by inducing long-lasting changes in the reactive oxygen species balance. **Neuropharmacology**. v. 16, p. 1-40, 2016.

RAHMAN, T.; HOSEN, I. M.M.; ISLAM, T.; SHEKHAR, H.U. Oxidative stress and human health. **Advances in bioscience and biotechnology**. v. 3, s/n, p.997-1019, 2012.

RHEE, S. G.; CHAE, H.Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free radical biology and medicine. Review**. v. 38, n.12, p.1543-52, 2005.

ROBERTO, M.; SCHWEITZER, P.; MADAMBA, S. G.; STOUFFER, D. G.; PARSONS, L. H.; SIGGINS, G. R. Acute and chronic ethanol alter glutamatergic transmission in rat central amygdala: an in vitro and in vivo analysis. **Journal of neuroscience**. v. 24 n.7, p.1594-1603, 2004.

RODRIGUEZ-ARIAS, M.; NAVARRETE, F.; BLANCO-GANDIA, M. C.; ARENAS, M. C.; BARTOLL-ANDRÉS, A.; AGUILAR, M. A.; RUBIO, G.; MIÑARRO, J.; MANZANARES, J. Social defeat in adolescent mice increases vulnerability to alcohol consumption. **Addiction biology**. v. 21, n.1, p. 87-97, 2016.

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

ROVER-JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**. v. 24, n.1, p. 112-119, 2001.

SADEGHI, M.; PEERI, M.; HOSSEINI, M. J. Adolescent voluntary exercise attenuated hippocampal innate immunity responses and depressive-like behaviors following maternal separation stress in male rats. **Physiology and behavior**. v.13, n.163, p.177-1183, 2016.

SAPOLSKY, R. M. Why stress is bad for your brain. **Science**. v. 273, n. 5726, p. 749–750, 1996.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive suppressive, stimulatory and preparative actions. **Endocrine reviews**. v. 21, n.1, p. 55–89, 2000.

SARDINA, J. L.; LÓPEZ-RUANO, G.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, B.; LLANILLO, M.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A. Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? **Critical reviews oncology/ hematology**. v. 81, n. 3, p. 257-74, 2012.

SASAKI, T.; LEUTGEB, S.; LEUTGEB, K. J. Spatial and memory circuits in the medial entorhinal cortex. **Current opinion in neurobiology**, v.32, s/n, p. 16-23, 2015.

SATO, H.; TAKAHASHI, T.; SUMITANI, K.; TAKATSU, H.; URANO.S. Glucocorticoid generates ROS to induce oxidative injury in the hippocampus, leading to impairment of cognitive function of rats. **Journal clinical biochemistry nutrition**. v. 47, n.3, p. 224–232, 2010.

SCHAAFFHAUSEN, V.N.T.; OLIVEIRA, F. A.; CARVALHO, T. N.; OLIVEIRA, M. G.; RICHTZENHAIN, M. H.; SANTOS-JUNIOR, J. G. Intermittent ethanol binge exposure impairs object recognition but spares contextual and tone fear memory in adolescent rats. **Psychology and neuroscience**. v. 2, n.1, p. 75-81, 2009.

SCHIAVONE, S.; JAQUET, V.; TRABACE, L.; KRAUSE, K, H. Severe life stress and oxidative stress in the brain: from animal models to human pathology. **Antioxidants & redox signaling**. v. 18, n.12, p. 1475-1490, 2013.

SCHIAVONE, S.; COLAIANNA, M.; CURTIS, L. Impact of early life stress on the pathogenesis of mental disorders: relation to brain oxidative stress. **Current pharmaceutical design**. v.21,n.11, p. 404-412, 2015.

SCHULTEIS, G.; ARCHER, C.; TAPERT, S. F.; FRANK, L. R. Intermittent binge alcohol exposure during the periadolescent period induces spatial working memory deficits in young adult rats. **Alcohol**. v. 42, s/n, p. 459-467, 2008.

SCHULTZ, W. Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to date. Review. **American physiology society**. v. 5, n.3, p. 853-951, 2015.

SEN, C, K; PARCKER, S. **Methods in enzymology**. Local: California- USA: Academic press, v. 352 Redox cell biology and genetics, 2002.

SILBERMAN, D. M.; ACOSTA, G. B.; ZORRILLA, Z. M. A. Long-term effects of early life stress exposure: Role of epigenetic mechanisms. Review. **Pharmacology research**. v. 10, n. 9, p. 64-73, 2016.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia**. v.48, n.6, p.812-822, 2004.

SILVERS, J. M.; TOKUNAGA, S.; MITTLEMAN, G.; MATTHEWS, D. B. Chronic intermitente injections of high-dose ethanol during adolescence produce metabolic, hypnotic, and cognitive tolerance in rats. **Alcohol clinical expirience research**. v.27, n.10, p. 1606–1612, 2003.

SOWELL, E. R. THOMPSON, P. M.; HOLMES, C. J.; JERNIGAN, T. L.; TOGA, A. W. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. **Nature neuroscience**. v. 2, n. 10, p. 859 - 861, 1999.

SOWELL, E. R.; DELIS, D.; STILES, J.; JERNIGAN, T. L. Improved memory functioning and frontal lobe maturation between childhood and adolescence: A structural MRI study. **Journal international neuropsychological society: JINS**. v. 7, n.3, p. 312-322, 2001.

SPEAR, L. P. Adolescent alcohol exposure: Are there separable vulnerable periods within adolescence? **Physiology & behavior**. v. 148, s/n, p. 122-130, 2015.

SPIERS, J. G.; CHEN, H. J.; BRADLEY, A.J.; ANDERSON, S.T.; SERNIA, C.; LAVIDIS, N. A. Acute restraint stress induces rapidand prolonged changes in erythrocyteand hippocampal redoxs status. **Psychoneuroendocrinology**. v. 38, n.11, p. 2511–2519, 2013.

SPIERS, J, G.; CHEN, H, J.; SERNIA, C.; LAVIDIS, N, A. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. **Frontiers in neuroscience**. v.8, n.456, p. 1-6, 2015.

SPIGA, F.; WALKER, J. J.; TERRY, J. R.; LIGHTMAN, S. L. HPA axis rhythms. **Comprehensive physiology**. v. 4, n.3, p. 1273-1298, 2014.

SRIRAM, K.; PAI, K. S.; BOYD, M. R.; RAVINDRANATH. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. **Brain research**.v.749, n.1, p. 44-52, 1997.

SUVARNA, N.; BORGLAND, S. L.; WANG, J.; PHAMLUONG, K.; AUBERSON, Y. P.; BONCI, A.; RON, D. Ethanol alters trafficking and functional N-methyl-D-aspartate receptor NR2 subunit ratio via H-Ras. **The journal of biology chemistry**. v. 280, n. 36, p.31450-314509, 2005.

SWARTZWELDER, H. S.; RISHER, M. L.; MILLER, K. M.; COLBRAN, R. J.; WINDER, D. G.; WILLS, T. A. Changes in the adult glun2b associated proteome following adolescent intermittent ethanol exposure. **Plos one**. v. 11, n.5, p. 1-18, 2016.

SWANSON. J, D.; WADHWA. P, M. Developmental origins of child mental health disorders. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and alliened disciplines**. v. 49, p. 1009-19, 2008.

TATA. D, A.; MARKOSTAMOUA. I.; IOANNIDISA. A.; GKIOKAA. M.; SIMEONIDOU. C.; ANNOGIANAKISB. G.; SPANDOU. E. Effects of maternal separation on behavior and brain damage in adult rats exposed to neonatal hypoxia–ischemia. **Behavioural brain research**. s/v, p.1-11, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.033>.

TEIXEIRA, B. F.; SANTANA, DA S. L. N.; BEZERRA, R. F.; DE CARVALHO, S.; FONTES-JUNIOR, A. E.; PREDIGER, D. R.; CRESPO-LOPEZ, E. M.; MAIA, C. S. F.; LIMA, R. R. Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress. **Plos one**. v. 9. n.6, 2014.

THOMPSON, P. M. HAYASHI, K. M.; SIMON, S. L.; GEAGA, J. A.; HONG, M. S.; SUI, Y.; LEE, J.Y.; TOGA, A. W.; LING, W.; LONDON, E. D. Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. **The journal of neuroscience : the official journal of the society for neuroscience**. v. 24, n. 26, p. 6028-6036, 2004.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. **Antioxidant redox signal**. v.7, n. 9-10, p.1302-1314, 2005.

TRACTENBERG, S. G.; LEVANDOWSKI, M. L.; DE AZEREDO, L. A.; ORSO, R.; ROITHMANN, L. G.; HOFFMANN, E. S.; BRENHOUSE, H. GRASSI-OLIVEIRA, R. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. **Neuroscience biobehavioral reviews**. v. 68, n. 16, p. 489-503, 2016.

TURCATEL, E.; FUNCHAL, C. S.; GOMEZ, R. Behavioural changes and oxidative stress parameters by alcohol and tobacco in the central nervous system. **Revista neurociência**. v. 20, n.3, p. 444-454, 2012.

TWIGG, L.; MOON, G. The spatial and temporal development of binge drinking in England 2001-2009: an observational study. **Social science & medicine**. v. 9, s/n, p. 162-167, 2013.

UCHIDA, S.; HARA, K.; KOBAYASHI, A.; FUNATO, H.; HOBARA, T.; OTSUKI, K.; YAMAGATA, H.; MCEWEN, B. S.; WATANABE, Y. Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. **Journal neuroscience**. v. 30, n. 45, p. 15007-15018, 2010.

UYSAL, N.; GONENC, S.; ACIKGOZ, O.; PEK CETIN, C; KAYATEKIN, B, M.; SONMEZ, A.; SEMIN, I. Age-dependent effects of maternal deprivation on oxidative stress in infant rat brain. **Neuroscience letters**. v. 384, p.98–101, 2005.

VANDENBERG, A.; PIEKARSKI, D, J.; CAPORALE, N.; MUNOZ-CUEVAS, F, J.; WILBRECHT, L. Adolescent maturation of inhibitory inputs onto cingulate cortex neurons is cell-type specific and TrkB dependent. **Frontiers in neural circuits**. v.9, n.9, p. 1-10, 2015.

VAN DONGEN, Antonius. M. Biology of the NMDA Receptor. In: RON, D e WANG, J. **The NMDA receptor and alcohol addiction**. Ed. Carolina do Norte: CR press,2009. Capítulo 4.

VAN STRIEN, M, N.; CAPPAERT, N. L. M.; WITTE, M. P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. **Nature reviews neuroscience**. n. 10, s/n, p.272-282, 2009.

VALENZUELA, C. F.; JOTTY, K. Mini-review: effects of ethanol on GABAA receptor-mediated neurotransmission in the cerebellar cortex—recent advances. **Cerebellum**. v. 14, p. 438–446, 2015. doi: 10.1007/s12311-014-0639-3

VARGAS, M.R.; JOHNSON, J. A. The Nrf2–ARE cytoprotective pathway in astrocytes. **Expert reviews in molecular medicine**. s/v, s/n, p. 11-17, 2009.

VARODAYAN, F. P.; BAJO, M.; SONI, N.; LUU, G.; MADAMBA, S.G.; SCHWEITZER, P.; ROBERTO, M. Chronic alcohol exposure disrupts CB(1) regulation of GABAergic transmission in the rat basolateral amygdala. **Addiction biology**. 2016. doi: 10.1111/adb.12369.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v. 30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

VENTURA, A. L. M.; ABREU, P. A.; FREITAS, R. C. C.; PLÍNIO, C.; SATHLER, P. C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Colinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Arquives of clinical psychiatry**. v.37, n.2, p.66-72, 2010.

VETRENO, R. P.; B, MARGARET.; LIU, W.; SPEAR, L. P.; CREWS, F.T. Adolescent, but not adult, binge ethanol exposure leads to persistent global reductions of choline acetyltransferase expressing neurons in brain. V. 9, s/n, s/p. **Plos one**. 2007.

VETRENO, R. P.; CREWS, F.T. Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. **Frontiers in neuroscience**. v. 9, n.35, p. 1-12, 2015. doi: 10.3389/fnins.2015.00035

VILLENEUVE, N. F.; LAU, A.; ZHANG, D. D. Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. **Antioxidants & redox signaling**. v.13, n.11, p. 1699–1712, 2010.

WALKER, C.D.; ANAND, K.J.S.; PLOTSKY, P.M. Development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and the stress response. In: McEwen, B.S. **Coping with the environment: Neural and endocrine mechanisms**. ed. New York: Oxford University Press, p. 237–270, 2001.

WARNER, B. B.; STUART, L.; GEBB, S.; WISPE, J. R. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. **American journal of physiology**. v. 271, s/n, p.150–158, 1996

WEI, Y. H.; LU, C.Y.; WEI, C. Y.; MA, Y. S. LEE, H. C. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. **Chinese journal of physiology**. v 44, n.1, p. 1-11, 2001.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymology**. v.77, p. 325–333,1981.

WHITE, A. M. What happened? Alcohol, memory blackouts, and the brain. **Alcohol research & health : the journal of the national institute on alcohol abuse and alcoholism**. v. 27, n. 2, p. 186-96, jan. 2003.

World Health Organization (WHO). **Global status report on alcohol and health**. Switzerland, Genebra, 2014.

WLODEK, L. Beneficial and harmful effects of thiols. **Polish journal pharmacology**. v. 54, s/n, p. 215-23, 2002.

World Health Organization (WHO). **Global status report on alcohol and health**. Switzerland, Genebra, 2014.

WONG, D. V. T.; FERREIRA, J. R. D. O.; FONTELES, M. M. F.; VIANA, G. S. B.; DE SOUZA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M. Alcohol and Neurodevelopment:

pharmacologics and genetics aspects. **Revista eletrônica de farmácia**.v.1, s/n, p. 8-23, 2008.

YAN, Y.; WEI, C. L.; ZHANG, W. R.; CHENG, H. P.; LIU, J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. **Acta pharmacologica sinica**. v. 27, n.7, p. 821-6, 2006.

YOO, H. Y.; CHANG, M. S.; RHO, H. M. The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. **Journal biology chemistry**, v. 274, s/n, p. 23887–23892, 1999.

YONUTAS. H, M.; VEKARIA. H, J.; SULLIVAN. P, G. Mitochondrial specific therapeutic targets following brain injury. **Brain research**. v. 16, s/n, p. 30041-30045, 2016.

YOU, J. M.; YUN, S. J.; NAM, K. N.; KANG, C.; WON, R.; LEE, E. H. Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. **Canadian journal of physiology and pharmacology**. v. 87, n.6, p. 440–447, 2009.

ZAFIR, A.; BANNU, N. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. **Stress**. v.12, n.2, p. 167–177, 2009.

ZHANG, M.; AN, C.; GAO, Y.; LEAK, R. K.; CHEN, J.; ZHANG, F. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. Review. **Progress in neurobiology**. v. 100, s/n, p. 30-47, 2013.

ZIMMERBERG, B.; SAGESER, K. A. Comparison of two rodent models of maternal separation on juvenile social behavior. **Frontiers in psychiatry**. v. 2, n. 39, s/p, 2011.

ZLATKOVIĆ, J.; TODOROVIĆ, N.; BOŠKOVIĆ, M.; PAJOVIĆ, S. B.; DEMAJO, M.; FILIPOVIĆ, D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. **Molecular and cellular biochemistry**. v. 393, n. 1-2, p. 43-57, 2014.

ZOPPI, C. C.; ANTUNES-NETO, J.; CATANHO, F. O.; GOULART, L. F.; MOTTA, E.; MOURA, N.; MACEDO, D. V. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Revista paulista de educação física de São Paulo**. v.17, v.2, p. 119-130, 2003.