

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Priscila Almeida Costa

**Avaliação dos Efeitos da Abstinência
Alcoólica em Ratos Submetidos a um
Modelo de Preferência por Etanol**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2014

Priscila Almeida Costa

Avaliação dos Efeitos da Abstinência Alcoólica em Ratos Submetidos a um Modelo de Preferência por Etanol

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – Farmacologia e Toxicologia.

Orientadora: Dra. Helena M.T. Barros
Co-orientador: Dr. Maurício Schüller Nin

Porto Alegre

2014

Catalogação na Publicação

Costa, Priscila Almeida

Avaliação dos efeitos da abstinência alcoólica em ratos submetidos a um modelo de preferência por etanol. / Priscila Almeida Costa. -- 2014.

81 p. : il., graf. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Orientador(a): Helena Maria Tannhauser Barros ;
coorientador(a): Maurício Schüller Nin.

1. Etanol. 2. Abstinência alcoólica. 3. Autoadministração. 4. Manifestações comportamentais animais. 5. Dependência alcoólica. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, obrigada por fazer momentos difíceis virarem alegria e benção. Sei que ora por todos nós, amém!

Aos meus pais, irmãos e Verônica, por terem acreditado e sempre incentivado minhas escolhas acadêmicas mesmo que a quilômetros de distância, vocês são maravilhosos, amo muito vocês!

Ao meu noivo, amor, amigo, futuro marido, Fernando, pela força e o apoio diário durante esta trajetória de concentrações, estudos e estresses, muito obrigada, eu te amo por tudo isso e muito mais!

À minha orientadora, professora Helena Barros, exemplo de amor e dedicação a sua profissão, que abriu as portas para uma baiana em seu grupo de pesquisa, acreditando no meu crescimento e ajudando a todo o momento neste trabalho.

Ao meu co-orientador e amigo, Prof. Maurício Schüller Nin, que vem me ajudando a crescer cada vez mais como futura pesquisadora. Obrigada pela ajuda independente da hora!

Aos membros da relatoria e banca examinadora por aceitarem meu convite.

À minha família baiana e gaúcha, pelo carinho, compreensão e incentivo sempre.

Aos meus queridos amigos do Lab 317, ICs, pós-graduandos e a Prof.^a Rosane, que me apoiaram e me ajudaram desde o início, com trabalho e palavras de conforto quando era preciso. É um prazer trabalhar neste ambiente com vocês!

Aos grandes mestres Pedro Romão e Alessandra Peres, por me darem a oportunidade de crescer ainda mais na área acadêmica.

A todos meus amigos, em especial “minhas gordas”, que sempre estiveram me dando força de longe, acreditando em meu progresso. Amo todos.

A todos que contribuíram de alguma forma para elaboração deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A autoadministração contínua de etanol em animais pode manifestar alterações comportamentais exploratórias e no consumo, e repetidos episódios de abstinência ao álcool pode aumentar estes riscos. O principal objetivo do estudo foi avaliar alterações comportamentais durante períodos agudos de abstinência a doses baixas de álcool em ratos. Foram utilizados 58 ratos Wistar adolescentes (35-40 dias) alojados individualmente e submetidos a um modelo de autoadministração crônica de etanol (6-8% v/v) a partir de uma dieta forçada durante 21 dias. Após este período os animais seguiram com um modelo de ciclos de 24h entre abstinência aguda e reapresentação do álcool por 10 dias. As análises comportamentais foram obtidas somente nos dias de abstinência realizando os testes de campo aberto, labirinto em cruz-elevado e nado forçado, consecutivamente após 6-9h da retirada do álcool. Os ratos controles receberam a mesma dieta, mas sem etanol e com adição de sacarose durante todo período e realizaram todos os testes comportamentais. O modelo de ciclos repetidos de privação de etanol aumentou o consumo pela solução alcoólica e sua procura (média \pm erro padrão: $36,2 \pm 1,3g$; $P < 0,001$). Além disso, durante as primeiras horas de abstinência ao álcool houve uma diminuição significativa na atividade exploratória dos animais no campo aberto ($67,0 \pm 3,7s$; $P < 0,001$) e ainda eles esticaram menos no labirinto em cruz-elevado ($4,0 \pm 0,4s$; $P = 0,045$). Entretanto, no teste do nado forçado os ratos permaneceram menos tempo imóveis ($165,9 \pm 7,7s$; $P = 0,002$). As repetidas abstinências agudas de álcool induziram alterações comportamentais menores nos animais, dos quais estes curtos períodos de privação modelaram parcialmente as mudanças afetivas relacionadas a comportamentos tipo-ansiedade e depressão.

Palavras-chaves: Etanol, Abstinência ao álcool, Autoadministração, Manifestações comportamentais animais, Dependência alcoólica.

ABSTRACT

Continuous self-administration of ethanol in animals can manifest exploratory behavioral changes and consumption alteration, and repeated episodes of alcohol withdrawal may increase these risks. The aim of this study is to evaluate minor behavioral changes in acute withdrawal periods using a low dose of ethanol in rats. Fifty-eight male Wistar rats (35-40 days age) were subjected to an oral ethanol self-administration procedure for a forced diet, in which they were offered 6-8% (v/v) ethanol solution for a period of 21 days followed by 5 repeated 24-hours cycles between alcohol withdrawal and reinstatement of the treatment. Behavioral changes were analyzed on consecutive ethanol withdrawal days in the open field, elevated plus-maze and forced swim tests after 6-9 hours alcohol deprivation. Control animals received a control diet without ethanol adding sucrose for same periods and performed all behavior tests. The repeated intermittent ethanol access enhanced solution intake and alcohol-seeking (mean \pm SEM: 36.2 \pm 1.3 g; P <0.001). Decreased exploratory activity was observed in the open field test (67.0 \pm 3.7 s; P <0.001) and the animals stretched attempt more in the elevated plus-maze test (4.0 \pm 0.4 s; P =0.045). However, in the forced swim test the withdrawn rats spent less time of immobility (165.9 \pm 7.7 s; P =0.002). Repeated acute alcohol withdrawal induced minor behavioral changes in rats, in which these short periods of alcohol deprivation partially modeled the affective changes related to anxiety- and depression-like behaviors.

Key Words: Ethanol, Alcohol Withdrawal, Ethanol self-administration, Minor Behavioral Changes, Alcohol dependence.

LISTA DE ABREVIações

ADH – Álcool desidrogenase

ALDH – Aldeído desidrogenase

APA – Associação de Psiquiatria Americana

CA – Campo aberto

DSM – Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais

EtOH – Etanol

GABA – Ácido gama-aminobutírico

LCE – Labirinto em cruz-elevado

NMDA – Receptor N-metil-D-aspartato

OMS – Organização Mundial da Saúde

SAA – Síndrome de Abstinência Alcoólica

SNC – Sistema Nervoso Central

ADE – Alcohol deprivation effect

ANOVA – Analyses of variance

AWS – Alcohol Withdrawal Syndrome

CTR – Control animals

EPM – Elevated plus-maze test

ER – Ethanol reinstatement

EtOH – Ethanol

EW – Ethanol withdrawal

FST – Forced swim test/ teste do nado forçado

OF – Open field test

SEM – Standard error of mean

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	08
1.1	Etanol.....	08
1.1.1	Aspectos gerais.....	08
1.1.2	Toxicocinética.....	08
1.1.3	Toxicodinâmica.....	10
1.1.4	Efeitos comportamentais.....	11
1.2	Dependência alcoólica.....	13
1.3	Abstinência alcoólica.....	15
1.4	Modelos animais.....	19
1.4.1	Modelos de autoadministração ao etanol.....	19
1.4.2	Modelos de abstinência ao álcool.....	22
1.5	Avaliação comportamental de manifestações da SAA em animais.....	24
1.5.1	Teste de Campo Aberto.....	26
1.5.2	Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	26
1.5.3	Teste do Nado Forçado.....	27
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
4	RESULTADOS – ARTIGO.....	29
	“Behavioral evaluation during acute alcohol withdrawal periods in rats submitted to repeated intermittent ethanol access”.....	30
5	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXOS.....	63
	Anexo 1 Adendo à dissertação de mestrado: resultados adicionais.....	63
	Anexo 2 Normas da revista “Alcoholism: Clinical and Experimental Research”	74
	Anexo 3 Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 ETANOL

1.1.1 Aspectos gerais

O etanol (álcool etílico ou álcool) é uma molécula orgânica simples composta de um único grupo hidroxila e uma cadeia alifática curta, com dois carbonos e é representado pela fórmula molecular $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. Os radicais hidroxil e etil conferem propriedades tanto hidrofílicas quanto lipofílicas à molécula. É uma substância orgânica, obtida da fermentação de açúcares ou hidratação do etileno, encontrada em bebidas alcoólicas social e comercialmente aceitas, como a cerveja, vinho e destilados. Apesar de ser proibida por lei a venda de bebidas para menores de 18 anos no Brasil, ainda há um grande número de crianças e adolescentes que consomem livremente.

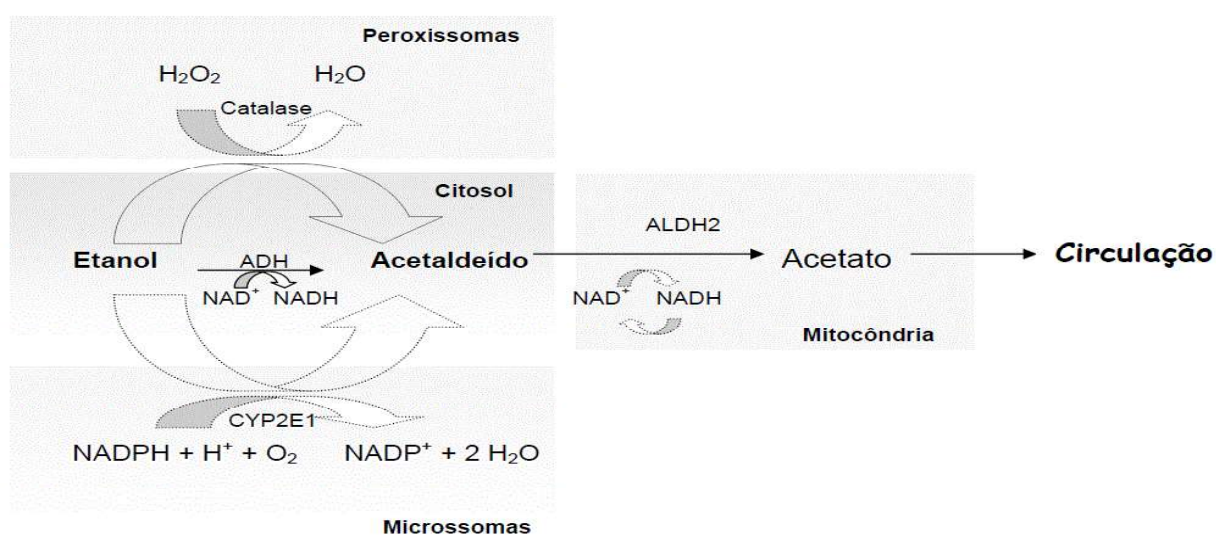
O consumo de bebida alcoólica e sua dependência são problemas que afetam a população mundial e proporcionam sérios riscos à saúde pública em diversos países, incluindo o Brasil. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a população brasileira se encontra entre os maiores consumidores de álcool, fato ainda mais agravante por serem representados principalmente por jovens no período da adolescência (WHO, 2004).

A dependência de álcool acomete de 10% a 12% da população mundial e na população brasileira em 2005 este número era de 11,2% (CARLINI et al, 2006), e é devido a isto que o tema tem recebido uma maior atenção dos pesquisadores. A idade e o gênero são umas das variáveis da população que podem influenciar no uso nocivo ou na dependência do álcool. Aproximadamente 52% dos brasileiros usam álcool e praticamente a metade destes (24%) consome álcool de maneira freqüente e pesada com alto risco para sua saúde, e a prevalência do alcoolismo ainda é maior entre os homens do que nas mulheres (LARANJEIRA et al, 2007). Fato mais preocupante de um estudo é a constatação de que, no Brasil, 5,2% dos adolescentes (12 a 17 anos de idade) e 15,5% dos adultos jovens (18 a 24 anos de idade) são dependentes do álcool (GALDURÓZ AND CAETANO, 2004).

1.1.2 Toxicocinética

O etanol atinge rapidamente a corrente sanguínea a partir da absorção pelo trato gastrointestinal. A velocidade da absorção é largamente determinada pela quantidade de etanol consumido, concentração de etanol na bebida, velocidade de consumo e composição do conteúdo gástrico. O tempo entre a última dose e as concentrações sanguíneas geralmente variam de 30 a 90 minutos. A distribuição do etanol ocorre de forma razoavelmente uniforme por todos os tecidos do organismo, afetando grande parte das funções vitais devido a sua solubilidade, tanto em água quanto em lipídeos, e também por ser uma molécula relativamente pequena, do ponto de vista molecular (LIEBER, 1992). Em órgãos com elevado fluxo sanguíneo, como o cérebro, fígado, pulmões e coração, o equilíbrio desta distribuição ocorre mais rapidamente, e apesar de não se ligar às proteínas plasmáticas, atravessa as barreiras hematoencefálica e placentária facilmente (RANG, DALE AND RITTER, 2001; SCIVOLETTO AND MALBERGIER, 2003).

Uma pequena quantidade ingerida de álcool sofre o metabolismo de primeira passagem pelas enzimas álcool desidrogenases (ADH) gástrica, entretanto, aproximadamente 95% do etanol é oxidado pelo fígado, sobrecarregando-o aos efeitos tóxicos. De 2 a 10% do etanol são excretados na urina, no ar expirado e no suor. Pelo metabolismo hepático, o etanol é convertido a acetaldeído principalmente pela ADH, e pelas vias acessórias das enzimas catalase e CYP 2E1 (GOODMAN *et al.*, 2006). Posteriormente, o acetaldeído é transformado em acetato na mitocôndria, pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (Figura 1).



Fonte: Adaptada de AGUIAR, 2008.

Figura 1 – Vias da metabolização hepática do etanol.

O acetaldeído, principal produto gerado do metabolismo do álcool, é um composto extremamente tóxico e altamente reativo, pois ele se liga covalentemente a grupos funcionais, reage com fosfolipídios formando aductos com proteínas, inibe enzimas e diminui o reparo no DNA (ISRAEL *et al.*, 1986). Ainda assim, o acetato não é um produto inerte ao organismo, pois está envolvido com a depressão do sistema nervoso central (SNC), além de afetar diversos processos metabólicos (ISRAEL *et al.*, 1994).

1.1.3 Toxicodinâmica

Embora a maioria dos órgãos do corpo humano seja afetada pela intoxicação alcoólica e pelo seu uso crônico, o abuso desta substância afeta mais notavelmente o fígado, o coração e o cérebro, desenvolvendo doenças nem sempre reversíveis.

A lesão hepática constitui a consequência, em longo prazo, mais grave do consumo excessivo de etanol. É representada por uma sequência de efeitos como esteatose hepática (acúmulo de gordura macrovesicular no citoplasma do hepatócito) que progride para hepatite alcoólica (processo inflamatório e danos às funções hepatocelulares), e finalmente evoluindo para cirrose hepática (deformação celular, hipertensão portal, necrose e fibrose hepática) (BOUNEVA *et al.*, 2003) (RALL, 1991; RANG, DALE AND RITTER, 2001). A ingestão regular de quantidades mais do que moderadas de álcool leva ao acúmulo crescente de acetaldeído, em parte pela atividade reduzida da ADH, o que pode causar vários efeitos deletérios, incluindo peroxidação lipídica aumentada e dano às membranas mitocondriais e outras membranas celulares, depleção de glutatona e depleção de vitaminas (RALL, 1991).

No sistema cardíaco, o álcool em altas doses provoca inflamação no músculo cardíaco (miocardiopatia), hipertensão e elevação do colesterol sérico. O uso abusivo de álcool está associado à maior frequência de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. Além disso, estudos correlacionam baixas doses de álcool com elevação do HDL (lipoproteína de alta densidade), o qual protege contra a formação de placas de ateroma e, conseqüentemente, reduz a probabilidade de doença cardiovascular (RANG, DALE AND RITTER, 2001; SCIVOLETTO AND MALBERGIER, 2003).

A neurofarmacologia do álcool não é simples e seus principais efeitos são observados a nível cerebral com ampla ação depressora no SNC, agindo em diversos neurotransmissores como o ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, e dopamina (ZALESKI *et al.*, 2004).

Os receptores GABA se subdividem basicamente em GABA_A e GABA_B, sendo o GABA considerado o principal neurotransmissor inibitório do SNC. Contudo, o etanol age principalmente nos receptores GABA_A, os quais são ionotrópicos e possuem três principais subunidades distintas (α , β , e γ) que se unem delimitando canais de cloreto (Cl⁻). Quando o álcool atinge este sistema, seu efeito é imediato potencializando a ação do GABA, o que permite o aumento da passagem do Cl⁻ para o interior da célula neuronal, hiperpolarizando-a e ativando seu efeito depressivo.

Além do sistema GABAérgico, o etanol inibe o sistema glutamatérgico, principal responsável pela neurotransmissão excitatória do SNC, e ainda influencia a liberação de dopamina, causando processos fisiológicos como a recompensa, em que o consumo de álcool se torna um hábito. Esta ampla ação do etanol pode desencadear o desenvolvimento de dependência alcoólica (KOOB *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2010).

1.1.4 Efeitos comportamentais

Apesar do álcool ser uma droga depressora do SNC ele apresenta efeitos bifásicos com relação ao tempo e dose consumida. No consumo de baixas doses e enquanto o nível de álcool no sangue está aumentando, o álcool tem efeitos estimulantes, provocando, por exemplo, sentimentos de euforia. Essa estimulação se expressa pela redução da inibição psicológica e social e é, muito provavelmente, resultado da depressão das vias inibitórias no cérebro, com liberação subsequente da atividade cortical. Em geral, concentrações até 20mg/dL de alcoolemia provocam pouco efeito na maioria dos indivíduos (NIEL AND SILVEIRA, 2008). Em concentrações farmacológicas efetivas, as ações depressoras do álcool assemelham-se às dos anestésicos voláteis (RANG, DALE AND RITTER, 2001).

Entretanto, com doses mais altas e enquanto o nível de álcool no sangue estiver diminuindo, seus efeitos sedativos aparecem. Colasanti and Martin (1994) listaram alguns efeitos psicológicos e comportamentais associados com diferentes concentrações sanguíneas de etanol (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeitos psicológicos e comportamentais do álcool associados com concentrações crescentes de etanol no sangue.

Concentração (mg/dL)	Natureza do efeito
< 50 mg/dL	Euforia, maior sociabilidade
50-100 mg/dL	Distúrbios da marcha Falta de concentração Tempo de reação aumentado Tendência à agressividade
100-150 mg/dL	Ataxia Capacidades motoras e mentais prejudicadas Prejuízo da memória recente Fala arrastada
200 mg/dL	Ausência de resposta ao estímulo sensorial
250 mg/dL	Coma
500 mg/dL	Morte

Fonte: Adaptado de COLASANTI AND MARTIN, 1994.

A OMS define como consumo moderado de álcool a ingestão de uma dose/dia para as mulheres e duas doses/dia para os homens (para dose, verificar Tabela 2). A ingestão de doses diárias acima deste padrão é considerada prejudicial e representa riscos para a saúde dos indivíduos (USDA, 2000).

Contudo, existe ainda o consumo excessivo de etanol em um curto espaço de tempo, conhecido internacionalmente como *binge drinking*, e é definido como a prática de beber 4 doses entre as mulheres e 5 doses entre os homens em uma mesma ocasião (NAIMI et al, 2003). Doses maiores que estas são consideradas como um consumo de risco (McKEON, FRYE AND DELANTY, 2008).

Tabela 2- Equivalência da quantidade da dose/bebida alcoólica com a sua alcoolemia.

Alcoolemia (mg/dl)	Equivalência de dose/bebida
20 – 30 mg/dl	1 copo de cerveja ou 1 cálice grande de vinho ou 1 dose de uísque ou outra bebida destilada
30 – 50 mg/dl	2 copos de cerveja ou 2 cálices grandes de vinho ou 2 doses de bebidas destiladas
51 – 80 mg/dl	3 - 4 copos de cerveja 3 cálices grandes de vinho 3 doses de bebidas destiladas

Fonte: Adaptada de NIEL AND SILVEIRA, 2008.

Deste modo, à medida que se aumenta a quantidade ingerida de doses de bebidas alcoólicas, o dano ao organismo pode ser proporcional e potencializado. A ingestão crônica excessiva do etanol também está associada com graves distúrbios mentais e neurológicos como lesão cerebral, perda de memória, distúrbios do sono, psicoses, e risco elevado de convulsões espontâneas (SCIVOLETTO AND MALBERGIER, 2003). Este comportamento frequente de consumo do etanol, cada vez com doses mais altas, pode ser o início do desenvolvimento de dependência alcoólica.

1.2 DEPENDÊNCIA ALCOÓLICA

A Associação de Psiquiatria Americana (APA) define dependência de drogas (ou adição) como um conjunto de sinais e sintomas que indica que o indivíduo continua a utilizar a substância, apesar dos problemas significativos que o seu consumo acarreta (APA, 2013). Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais (DSM-V), os principais critérios de diagnóstico da dependência ao álcool são tolerância (resistência aos efeitos do álcool); comportamento compulsivo e frequente de consumir etanol; uso contínuo da substância (mesmo conhecendo e sofrendo seus prejuízos); e os sintomas da abstinência alcoólica. A dependência se manifesta a partir de dois ou mais desses critérios expostos (APA, 2013).

Antes da exposição ao etanol o cérebro de um indivíduo saudável está em equilíbrio e o consumo agudo desta substância altera este equilíbrio neuroquímico. Se a exposição for contínua o cérebro institui uma adaptação das células nervosas para balancear o efeito do álcool, restaurando o equilíbrio. Em consequência a esta neuroadaptação o cérebro desenvolve uma tolerância à droga de abuso, manifestada pela procura de doses cada vez maiores para provocar os mesmos efeitos comportamentais. (PEREIRA AND OLIVEIRA, 1998). Essa tolerância pode ser farmacocinética, farmacodinâmica e/ou comportamental. A tolerância fisiológica envolve mecanismos compensatórios para manter o equilíbrio, como o aumento de determinadas enzimas que metabolizam o etanol acelerando sua eliminação (tolerância farmacocinética); e o aumento ou diminuição de determinadas moléculas receptoras, alvos para as drogas, servindo como um mecanismo de modulação dos efeitos produzidos pelas drogas quando interagem com estes alvos (tolerância farmacodinâmica). Já a tolerância comportamental é um processo de aprendizado que o indivíduo desenvolve na presença da droga, a qual pode ser adquirida após poucas exposições ao etanol e não necessita de um período de abstinência (privação do etanol) para ser extinta (VOGEL-SPROTT, 1997).

Os efeitos do etanol responsáveis por contribuir ou modular o comportamento de dependência são chamados de efeitos reforçadores. Estes efeitos fazem parte de um processo de aprendizado que envolve a motivação para consumir a substância, os quais podem ser positivos envolvendo estímulos prazerosos ou recompensadores, ou negativos, abrangendo estímulos desgostosos ou que tendem aliviar a dor ou um mal-estar. Acredita-se que os efeitos motivacionais, tanto positivos quanto negativos do álcool, influenciam no comportamento de procura da droga e, portanto, são importantes entre as muitas e diversas causas da dependência e abuso do álcool (CUNNINGHAM, FIDLER AND HILL, 2000).

Os efeitos reforçadores parecem depender de diversos sistemas neurotransmissores, entre eles o sistema GABAérgico. Há evidências de que este sistema esteja envolvido com a modulação de autoadministração de etanol em modelos animais, através de estímulos no circuito de recompensa. Este circuito é representado pela DA e neurônios de peptídeos opióides e por estruturas do sistema mesocorticolímbico, destacando-se particularmente, o córtex pré-frontal, núcleo *accumbens* e a área tegmentar ventral (DAVIES, 2003; GRAEFF AND GUIMARÃES, 2005). Já os elementos envolvidos no circuito de estresse são o fator liberador de

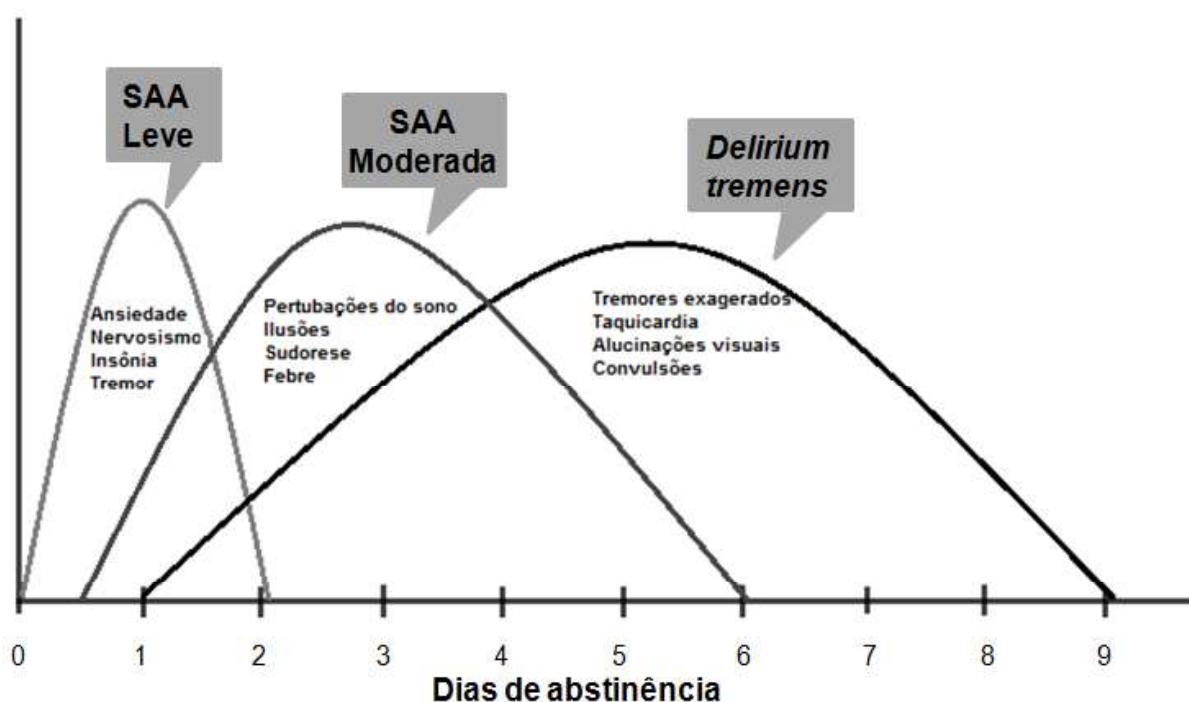
corticotrofina e neurônios noradrenérgicos que convergem para interneurônios GABAérgicos no núcleo central da amígdala e são ativados durante o desenvolvimento de dependência (KOOB AND LE MOAL, 2008).

A exposição ao estresse tem sido um importante fator no desenvolvimento da dependência ao álcool. Frequentemente indivíduos dependentes relatam que a exposição a estímulos aversivos e estados negativos de humor são justificativas para o início, manutenção e recaída do uso de substâncias psicoativas (SINHA, 2001; GOEDERS, 2003). Neste sentido, existem relatos de que o consumo precoce e o desenvolvimento de problemas relacionados ao abuso de etanol em humanos estão associados à exposição ao estresse (KAUFMAN et al, 2007; MULIA et al, 2008).

1.3 ABSTINÊNCIA ALCOÓLICA

A diminuição do consumo ou a retirada abrupta do álcool em indivíduos que bebem em excesso pode provocar a Síndrome de Abstinência Alcoólica (SAA). Esta síndrome tem sido definida pelo DSM-V e pela Classificação Internacional de Doenças (CID-10) como a interrupção total ou redução do uso pesado e prolongado do álcool (APA, 2013). Os critérios de diagnóstico da SAA são as manifestações de dois ou mais dos seguintes sintomas em desenvolvimento, dentro de algumas horas a alguns dias da retirada: hiperatividade autonômica (sudorese, taquicardia, hipertensão arterial sistólica), tremor das mãos, insônia, alucinações transitórias, náuseas ou vômitos, agitação psicomotora e/ou ansiedade (APA, 2013).

A SAA pode ser classificada quanto à intensidade e duração dos sintomas em pelo menos três níveis: leve, moderada ou grave (Figura 2). Alguns autores classificam em apenas leve ou severa (McKEON, FRYE AND DELANTY, 2008). Em geral, a SAA é autolimitada e tem uma duração média de 7 a 10 dias, dependendo dos casos.



Fonte: Adaptada de MARQUES et al, 2002.

Figura 2 – Intensidade e duração dos sinais e sintomas da Síndrome de Abstinência Alcoólica.

A síndrome de abstinência leve é caracterizada com estado nutricional preservado, boa hidratação, ausência de doenças físicas intercorrentes. Os pacientes descrevem nervosismo, irritabilidade, ansiedade, agitação, dificuldade para dormir, e pode apresentar tremores de extremidades, falta de apetite e sudorese. Esses sintomas mais leves podem ocorrer mesmo com níveis mensuráveis de álcool no sangue, e aparecem logo após 6 horas da retirada do álcool e geralmente desaparecem dentro de 48 horas (BARD et al, 2006).

Na moderada é mais marcante a perturbação do sono, com agitação noturna podendo ocorrer com alterações do sensório (ilusões auditivas e visuais), pesadelos, tremores e sudorese são mais proeminentes, bem como a instabilidade neurovegetativa, taquicardia, prejuízo da concentração e da memória, anorexia, náuseas, vômitos, irritabilidade e ansiedade.

Já na síndrome grave, o quadro é mais severo como um todo e o paciente apresenta febre, sudorese, taquicardia, delírios e tremores pronunciados, consagrando o termo *delirium tremens*. O estado nutricional fica comprometido em

graus variados, bem como a hidratação; apresenta confusão mental, desorientação no tempo e espaço, agitação, insônia, delírios ocupacionais, ilusões e alucinações visuais e convulsões. Crises convulsivas aparecem em 3% dos casos (MARQUES et al, 2002).

A maioria dos dependentes alcoólicos (70% a 90%) apresenta uma síndrome de abstinência entre leve a moderada e se manifesta de 6 a 36 horas após a última dose de álcool. Apenas assistências ambulatoriais, medicação oral e medidas de manutenção geral dos sinais vitais são aplicadas nesses casos (BARD et al, 2006), embora exames laboratoriais de rotina sejam necessários para avaliar função hepática, glicemia e teste de eletrólitos, pois se houver alterações nos exames é preciso tratar o paciente com internação hospitalar (MUNCIE, YASINIAN AND OGE, 2013).

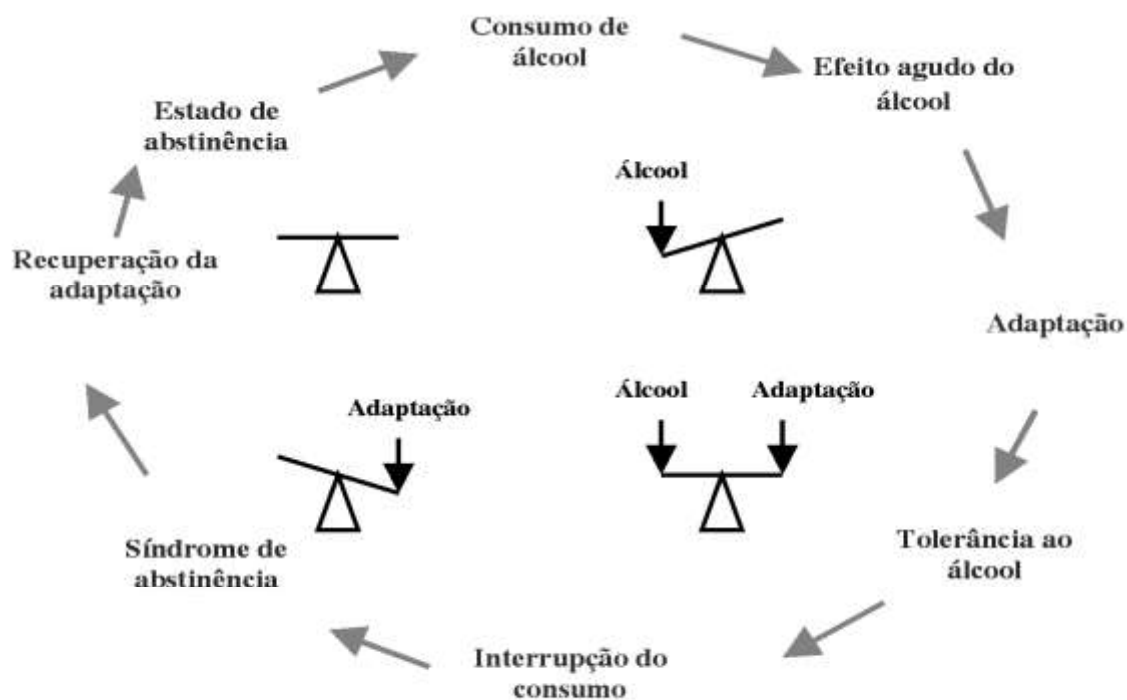
Os principais sintomas ocorrem freqüentemente de 48 a 72 horas após a interrupção. Entretanto, complicações mais severas podem se manifestar após 1 a 4 dias como convulsões e o desenvolvimento de *delirium tremens*. Por volta de 5% dos dependentes apresentam a síndrome de abstinência grave e pode levar semanas a meses exigindo tratamento rigoroso com medicações, como benzodiazepínicos e anticonvulsivantes, e até internações hospitalares. Esta síndrome grave acarreta uma taxa de mortalidade de 1% a 5% (LARANJEIRA et al., 2000; BARD et al 2006, MUNCIE, YASINIAN AND OGE, 2013).

Estudos clínicos demonstraram que pacientes com história de múltiplos episódios de abstinência têm maior risco de piora do quadro clínico em relação aos pacientes que experimentaram o primeiro episódio de retirada do álcool, levando em consideração a gravidade e a duração de cada dependência e a quantidade de álcool consumido pelos indivíduos. Resultados consistentes de estudo com animais relatam que o tratamento adequado deve ser imediato à retirada, mesmo em pacientes com sintomas leves, a fim de evitar o desenvolvimento de abstinência mais complicada com episódios subsequentes mais graves (SAITZ, 1998).

Quando há a interrupção do etanol no organismo, o equilíbrio restabelecido no cérebro durante a dependência alcoólica é desestruturado mais uma vez. Assim, este desequilíbrio causa um efeito funcional no cérebro caracterizando a SAA. Após o estado de abstinência completa de álcool ocorre a recuperação desta neuroadaptação, equilibrando novamente as funções cerebrais (Figura 3).

Consequentemente, as respostas durante a privação são opostas aos efeitos

depressores do álcool sobre o funcionamento do cérebro (BECKER, 2000), o que explica a manifestação de sintomas excitatórios por indivíduos abstinentes. Estes efeitos parecem contribuir para a formação do desejo compulsivo pela droga e conseqüentemente para as recaídas (LITTLETON, 1998).



Fonte: Adaptada de Marques et al, 2002.

Figura 3 - Hipótese de neuroadaptação da presença e ausência de álcool.

Devido ao fato dos papéis serem invertidos, durante a abstinência alcoólica há um aumento das funções dos receptores NMDA, redução da transmissão GABAérgica e uma desregulação no sistema dopaminérgico, e esses eventos contribuem para os diversos sinais e sintomas da SAA (MCKEON, FRYE AND DELANTY, 2008). Apesar disso, já foram encontrados níveis aumentados de GABA no plasma e no líquido cefalorraquidiano após a retirada de álcool em ratos (SANNA et al, 2003).

Para melhor compreensão dos mecanismos que ocorrem no organismo durante a dependência e/ou abstinência, faz-se necessário o uso de modelos animais, bem como para desenvolvimento de tratamentos para a doença (FACHIN-

SCHEIT et al., 2006). Porém, nenhum modelo, atualmente, consegue reproduzir totalmente todas as características de um ser humano, para isso selecionam-se características específicas do distúrbio e condições semelhantes para desenvolver a pesquisa em laboratório (SPANAGEL AND HOLTER, 2000).

1.4 MODELOS ANIMAIS

1.4.1 Modelos de autoadministração de etanol

Há mais de 20 anos pesquisadores vêm desenvolvendo e aplicando modelos diferentes que mimetizem diversos aspectos da dependência alcoólica em humanos, tais como *craving* ou fissura (desejo persistente pela droga) (COLOMBO et al, 2004), recaída (GINSBURG AND LAMB, 2013) e a perda de controle sobre o consumo, que são aspectos importantes da dependência. Além desses, também são incluídos modelos de autoadministração por livre escolha (CABRAL et al, 2006; BONASSOLI et al, 2011) e de privação de álcool (SPANAGEL AND HOLTER, 2000; TAMPIER et al., 2013), entre outros.

Os experimentos pré-clínicos utilizam diversos tipos de animais de espécies diferentes como macacos, coelhos, cães, e peixes. No entanto a maioria dos modelos utiliza roedores, geralmente ratos ou camundongos, por serem animais com tamanhos proporcionais para o manuseio e terem uma boa validade preditiva àquelas com seres humanos (WILLNER, 1991). A partir do uso de espécies não humanas, é possível controlar melhor alguns fatores, como condições de alojamento, dieta e experiências prévias com a substância em teste. Os modelos animais têm sido uma ferramenta muito útil para estudar as implicações comportamentais, neuroquímicas e moleculares no consumo e preferência pelo álcool em humanos (SPANAGEL, 2000). Pesquisadores também usam estes modelos para estudar os mecanismos genéticos e neurobiológicos responsáveis pelos efeitos motivacionais do álcool, e para desenvolver intervenções comportamentais e farmacológicas alterando tais efeitos (CUNNINGHAM, FIDLER AND HILL, 2000).

Na literatura existem duas diferentes formas de se desenvolver um modelo de autoadministração de etanol em animais: modelos que submetem o animal a um

condicionamento operante; e modelos nos quais os animais são mantidos em suas gaiolas-moradia (exemplos listados no Quadro 1). Os modelos de condicionamento permitem compreender a natureza dos efeitos motivacionais que influenciam na autoadministração do álcool, assim como os efeitos farmacológicos, tais como o aumento do prazer, diminuição do estresse e da ansiedade, ou redução do consumo de álcool (JANAK AND GILL, 2003; FORD *et al.*, 2008; GETACHEW *et al.*, 2008; SIMMS *et al.*, 2010; HOUCHI *et al.*, 2013; THORSELL *et al.*, 2013). Para serem desenvolvidos, é necessário que os animais iniciem por uma fase de treinamento para aprenderem a pressionar as barras com seus respectivos sinais sonoros e luminosos, e posteriormente receberem a solução-teste.

Quadro 1 – Exemplos de modelos de autoadministração de etanol.

AUTOR/ ANO	AMBIENTE	INDUÇÃO	METODOLOGIA/ PERÍODO	CONVÍVIO
HOUCHI <i>et al.</i> , 2013	CODICIONAMENTO OPERANTE	Etanol oral	Acesso limitado/dia	
			Durante 15 dias – 30min de acesso/dia (etanol oral) + 10 semanas – 14h de acesso/dia (etanol à vapor)	individual
FORD <i>et al.</i> , 2008 THORSELL <i>et al.</i> , 2013			Durante 2-3 semanas - 2h de acesso/dia Durante 15 dias – 30min de acesso/dia	individual
GETACHEW <i>et al.</i> , 2008		Etanol à vapor	Durante 7 ou 14 dias – 3h de acesso/dia	4 animais
WALKER <i>et al.</i> , 2010	Durante 2 semanas – 14h de acesso/dia		2 animais	
SHARKO <i>et al.</i> , 2013	GAIOLAS-MORADIA	Etanol oral	Acesso limitado/dia	
			Acesso a 2 garrafas: água e 6% de etanol – 4 dias (2h de acesso/dia)	individual
SINNOT, PHILIPS AND FINN, 2002			Acesso a 2 garrafas: água e etanol (5 ou 10%) – 17 dias (2h acesso/dia)	individual
			Livre escolha (24h/dia)	
PISU <i>et al.</i> , 2011			<i>Fade in</i> EtOH <i>fade out</i> sacarose: → Acesso a 2 garrafas: água e até 10% EtOH – 4 semanas	individual ou 3 animais
VILLAS BOAS <i>et al.</i> , 2012			→ Acesso a 3 garrafas: água, 5 ou 10% EtOH – 10 semanas	individual
TAMPIER <i>et al.</i> , 2013			Acesso a 3 garrafas: água, 10 e 20% de etanol – 67 dias	individual
BALDWIN <i>et al.</i> , 1991; CABRAL <i>et al.</i> , 2006; BONASSOLI <i>et al.</i> , 2011	Acesso livre da dieta forçada com EtOH: → Durante 2-3 semanas → Durante 21 dias → Durante 21 dias	individual 4 animais 3 animais		
MANZO <i>et al.</i> , 2012	Acesso a 2 garrafas: água e até 10% de etanol – 18 dias	individual		

Fonte: do Autor, 2014.

Nos modelos desenvolvidos em gaiolas-moradia, onde garrafas para consumo permanecem na gaiola, uma simples maneira de estudar a busca da droga é medir o volume consumido. Quando é dada aos animais uma escolha entre soluções, como água e álcool, a proporção entre a ingesta relativa de etanol e a ingesta total de fluidos (razão de preferência) é frequentemente usada para caracterizar o comportamento do animal. Nos experimentos, as garrafas podem estar disponíveis 24 horas por dia (livre escolha) (CABRAL et al, 2006; BONASSOLI et al, 2011; PISU et al, 2011), ou apenas em curtos períodos do dia (acesso limitado) (SINNOT, PHILLIPS AND FINN, 2002).

Entretanto, roedores submetidos a testes de consumo por livre escolha de etanol, a partir da técnica de *fade out* sacarose, raramente consomem mais de 2 g/kg/dia dessa substância (HEILIG AND KOOB, 2007). Essa pequena concentração não atinge uma alcoolemia necessária para desencadear sinais da síndrome de abstinência na retirada da substância (HEILIG AND EGLI, 2006), parâmetro relevante para análise da dependência (HEILIG AND KOOB, 2007), embora Van Erp and Miczek (1997) demonstraram que o baixo consumo de álcool foi suficiente para induzir alterações comportamentais em ratos, como a agressão e conseqüente influência sobre a autoadministração da substância alcoólica.

Além disso, um fator importante que se têm estudado é a convivência em seu ambiente, ou seja, a interação com outros animais na mesma gaiola ou o seu isolamento social, o que pode retratar melhor a realidade do ambiente de um alcoolista (HENSLER, HODGE AND OVERSTREET 2004; PISU et al, 2011).

Como o etanol tem um sabor estranho a princípio para os animais, é normal eles terem um pouco de receio ao experimentar e consumir a substância, fenômeno denominado neofobia. Devido a isso, os pesquisadores têm adaptado estratégias de introduzir o álcool em concentrações baixas, misturando sacarose ou sacarina, substâncias açucaradas com sabor palatável, e ao longo do tempo aumentar as concentrações de álcool gradualmente reduzindo a do açúcar (processo conhecido como *fade in* etanol *fade out* sacarose) (CUNNINGHAM et al., 2000; SIMMS et al, 2010; VILLAS BOAS et al, 2012).

Outro modelo de autoadministração de etanol por livre escolha é a preparação de uma dieta alimentar solúvel com o composto Sustagen® (Mead Johnson, São Paulo, Brasil) adicionando o álcool, sendo a única fonte de alimento para os animais durante todo o experimento (BOND AND DI GIUSTO, 1976;

BALDWIN et al, 1991). Esta solução é rica em proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais necessários para dieta diária do animal. Esta metodologia alcança concentrações sanguíneas de etanol de 80 a 132mg/dL, suficientes para induzir abstinência alcoólica, além disso, não houve relatos significativos de ganho de massa corporal comparado ao grupo controle (BERTOTO et al, 2006).

1.4.2 Modelos de abstinência ao álcool

A abstinência do álcool pode produzir um estado motivacional negativo ou aversivo que é manifestado por ruptura da resposta, aumento do consumo, mudanças no limiar de recompensa e aversão a lugares. Têm sido aplicados diversos modelos animais para avaliar a privação do álcool de seu ambiente ou, mais especificamente, sintomas da própria SAA. Estes procedimentos são desenvolvidos com eficiência para explorar a neurobiologia da interrupção do consumo da droga, analisando comportamentos etológicos e viabilizando o desenvolvimento de agentes terapêuticos que amenizem a severidade da síndrome (KLIETHERMES, 2005).

Segundo Baldwin e colaboradores (1991), para analisar comportamentos durante a abstinência alguns sinais físicos nos ratos podem se manifestar imediatamente após serem submetidos a testes comportamentais. Estes sinais são rigidez na cauda, tremor, convulsões espontâneas e flexões ventromedial distal, examinados por um pesquisador cegado ao tratamento que os animais recebem.

Além disso, muitos modelos analisam também o efeito de privação do álcool empregando um único período de privação, seja de 24 ou 48h (CABRAL et al, 2006; BONASSOLI et al, 2011). Entretanto, os padrões de consumo em humanos alcoolistas são separados em múltiplos períodos de abstinência e consumo (MCMILLEN, 1997) (exemplos listados no Quadro 2). A partir dessas questões, os pesquisadores têm estudado outro tipo de modelo de abstinência, seguidos de ciclos intercalados de privação repetida de álcool com reapresentação do álcool aos animais (VILLAS BOAS et al, 2012; TAMPIER et al, 2013). Este tipo de modelo auxilia na motivação da procura pela droga e assim aumenta seu consumo (SPANAGEL, 2003).

Quadro 2 – Exemplos de modelos de privação de etanol.

AUTOR/ ANO	PRIVAÇÃO	INDUÇÃO EtOH	METODOLOGIA/ PERÍODO
DEVAUD et al., 2002	ÚNICO PERÍODO	Etanol oral	Privação de 6h
PANDEY et al., 2003			Privação de 24h
SIEGMUND et al., 2005			Privação de 2 semanas
KAYIR AND UZBAY, 2008			Privação de 6h – análises de 2, 4 e 6h de abstinência de EtOH
BONASSOLI et al., 2011			Privação por 24 ou 48h – grupos de animais diferentes
FINN et al., 2006		Etanol à vapor	Privação de ~6-8h
SPANAGEL AND HOLTER, 1999	PERÍODOS REPETIDOS	Etanol oral	Privação de 3 dias – ciclos de abstinência de EtOH mensalmente repetidos - durante 10 meses
KNAPP, OVERSTREET AND BREESE, 2007			Privação de 5 dias (3 ciclos de abstinência intercalados com 2 dias de reapresentação de EtOH)
VILLAS BOAS et al., 2012			Privação de 2 dias – ciclos entre abstinência e reapresentação de EtOH – durante 2 semanas
TAMPIER et al., 2013			Privação de 15 dias (2 ciclos de abstinência intercalados por 7 dias de reapresentação de EtOH)
VEATCH, WRIGHT, AND RANDALL, 2007		Etanol à vapor	Privação de 8h – 4 ciclos entre exposição de 16h e 8h de abstinência de EtOH

Fonte: do Autor, 2014.

O efeito de privação do álcool pode ser considerado como um aumento pela demanda ao etanol pelo indivíduo privado (razão do consumo do etanol/ ingestão total de líquidos) e como um aumento no consumo voluntário da solução alcoólica quando ele é reapresentado ao ambiente após esta interrupção (SPANAGEL AND HÖLTER, 1999). Isto também pode se manifestar pela seleção de concentrações mais altas, as quais produzem efeitos farmacológicos mais rápidos (SERRA et al., 2003), observadas em modelos que ofertam diferentes concentrações de álcool. Entretanto, a medição do efeito de privação do álcool avalia apenas uma consequência comportamental e não dá para se afirmar sobre o estado subjetivo associado à motivação de incentivo a consumir o álcool (SPANAGEL, 2003), sendo difícil de avaliar até em humanos.

O consumo voluntário de drogas e o risco de abuso e recaída dependem de vários fatores biológicos e ambientais, e o estresse consiste em um desses fatores. De acordo com Sinha (2001), existem diversas evidências com animais, e alguns estudos com humanos, demonstrando uma correlação positiva entre exposição ao estresse agudo ou crônico e o aumento do consumo de drogas. O termo “estresse” é freqüentemente definido na literatura como um processo envolvendo percepção, interpretação, resposta e adaptação a eventos ambientais (SINHA, 2001).

1.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE MANIFESTAÇÕES DA SAA EM ANIMAIS

A criação de modelos animais válidos para essas reações fisiológicas do organismo humano é uma tarefa difícil, devido à natureza verbal e pessoal de vários sintomas, bem como pela falta de conhecimentos sobre os fatores etiológicos que poderiam ser utilizados para criar estes modelos.

Como já visto, durante a abstinência do álcool podem surgir vários sinais e sintomas, e dentre eles, as manifestações tipo de ansiedade e de estresse (posteriormente podendo evoluir para a depressão), são algumas características bem avaliadas como manifestações comportamentais animais.

Como já relatado neste trabalho, para um indivíduo apresentar abstinência é necessário previamente ter desenvolvido a dependência pelo álcool, a qual abrange diversos critérios para ser detectada. No caso de pesquisas com animais, o desenvolvimento de dependência a partir do consumo de álcool forçado pode gerar tolerância a alguns dos efeitos intoxicantes agudos do álcool, como hipotermia ou falta de coordenação motora, e alguns sinais leves de abstinência física (SPANAGEL, 2003), além de alterações avaliadas nos parâmetros de consumo do etanol.

Alguns efeitos de privação de álcool em ratos, após meses de indução de dependência, caracterizam-se por um aumento no consumo e na preferência de soluções alcoólicas, níveis de etanol no sangue semelhantes aos de animais que tinham uma preferência por doses elevadas de etanol, alterações no padrão de consumo com ingestão de quantidades e concentrações alcoólicas elevadas, e

ainda o consumo não se altera mesmo quando são adicionadas substâncias não palatáveis, como o quinino (SPANAGEL et al., 1996).

Sob a influência da etologia, ciência que estuda o comportamento animal, os testes comportamentais de ansiedade procuram reproduzir uma situação ambiental de provável ocorrência de diferentes formas de aversão ou desconforto. Os animais são expostos às diversas situações como: ambientes novos ou potencialmente perigosos e sem saídas, estímulos ou contextos associados a estímulos nociceptivos moderados, situações sinalizadoras da presença de um predador natural, confrontos iminentes com animais da mesma espécie (BLANCHARD *et al*, 1993; STEIMER, 2011). Entre alguns testes importantes nessa abordagem estão: campo aberto, labirinto em cruz elevado, preferência condicionada de lugar, interação social em ratos, vocalização ultrassônica, transição claro-escuro e labirinto em “T” elevado. Com essa diversidade de modelos, podem-se estudar os efeitos sobre a ansiedade que o etanol pode causar após a administração aguda ou crônica, e durante a sua abstinência. (BECKER, 2000).

A ansiedade, além de ser expressa em comportamentos exploratórios, pode se manifestar no comportamento de auto-limpeza do animal, evento conhecido em experimentos pré-clínicos como *grooming*, o qual também é observado em situações estressantes, e considerado importante na adaptação comportamental ao estresse e na redução da ansiedade. O *grooming* tende a ocorrer obedecendo a uma seqüência cefalocaudal e diferentes contextos podem interferir na apresentação de tal seqüência, podendo indicar maior estresse ou ansiedade no animal (KALUEFF AND TUOHIMAA, 2005; NIN *et al*, 2012).

Estes modelos mencionados também são considerados fatores de estresse, já que se tratam de ambientes novos e implicam desafios de exploração do local pelos animais. Além disso, situações ambientais estressantes têm uma importante e inegável contribuição no desenvolvimento da depressão. Desta forma, foram criados modelos com a aplicação de eventos estressores externos não previsíveis e inescapáveis, tentando provocar modificações similares no comportamento animal àquela encontrada na depressão. Um dos modelos mais utilizados no estudo da depressão em roedores são os testes do nado forçado e o de suspensão de cauda (DAVID et al, 2001).

No presente estudo foram realizados alguns destes testes comportamentais para análise de sintomas tipo-ansiedade (campo aberto e labirinto em cruz elevado), e tipo-depressão (nado forçado).

1.5.1 Teste do Campo Aberto

O campo aberto (CA) é o teste comportamental mais antigo e considerado um dos mais simples ensaios para avaliação da atividade exploratória. O teste consiste em colocar individualmente o animal dentro de uma arena desconhecida, geralmente circular e dividida em quadrantes, no qual ele circula livremente entre o centro ou periferia. Embora seja uma tarefa simples de se realizar, algumas variações metodológicas existem na literatura, desde o formato e o material do qual é constituído o CA, em que alguns são quadrados, outros circulares, opacos, claros ou escuros (BARROS *et al*, 1991); até mesmo o tempo de duração do teste (5, 10 e até 20 minutos de duração) (SPANAGEL AND HOLTER, 2000; RICHEY *et al*, 2012) e comportamentos avaliados.

Por meio deste procedimento é possível avaliar algumas manifestações da SAA, que podem consistir em alterações da atividade locomotora, comportamentos de auto-limpeza e no tempo gasto no centro da arena (KLIETHERMES *et al*, 2005).

Apesar de alguns parâmetros avaliados no CA, há ainda muita controvérsia de resultados, principalmente sobre a locomoção do animal. Durante a abstinência, os animais demonstram hiperatividade locomotora na retirada do álcool em roedores (BARROS *et al*, 1991; KAYIR AND UZBAY, 2008), indicando que esses animais estão com níveis elevados de ansiedade. Entretanto, alguns estudos já relacionaram pouca atividade locomotora (DEVAUD, BARTOO AND MALTHANKAR, 2002; BONASSOLI *et al*, 2011) e menor preferência pelo centro do CA (PRUT AND BELZUNG, 2003) com sintomas da abstinência.

1.5.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Atualmente, o labirinto em cruz elevado (LCE) retrata um dos modelos animais de ansiedade mais utilizados para o estudo experimental de drogas com efeitos ansiolíticos e ansiogênicos (KLIETHERMES, 2005). Validado farmacológica, fisiológica e comportamentalmente por Pellow e colaboradores (1985), o teste

aborda o conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão e o medo natural que ratos apresentam em relação a altura e espaços abertos.

O instrumento é composto por quatro braços, sendo dois abertos e dois outros envolvidos por paredes laterais. Os braços são dispostos perpendicularmente uns aos outros, formando uma cruz, dos quais são elevados geralmente de 40 a 50 cm do chão. O arranjo dos braços permite que os animais percebam simultaneamente o precipício e o espaço aberto. O LCE consiste em expor livremente o animal no centro do labirinto por 5 minutos e nessa situação, os animais tendem a explorar mais os braços fechados do que os abertos, e isso se deve mais ao fato deles evitarem espaços abertos do que a própria altura. Além disso, é analisado principalmente pela quantidade de entradas e tempo gasto nos braços abertos, representando indicadores de ansiedade (BECKER, 2000).

Durante a abstinência do álcool, estudos relataram ambivalência de resultados, já que alguns autores não observam diferença nos efeitos da retirada (FINN, GALLAHER AND CRABBE, 2000; KIEFER et al, 2003) e outros demonstram claramente um aumento de ansiedade nesse período (BALDWIN et al, 1991; CAGETTI *et al.*, 2003; CABRAL *et al.*, 2006). Essas diferenças estão relacionadas à metodologia empregada, estando ligadas, por exemplo, ao consumo de etanol e ao período de abstinência (horas ou dias), que são muito variados. Em experimentos com dieta líquida contendo a substância alcoólica ocorre um aumento induzido de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE após algumas horas de abstinência (BALDWIN et al, 1991; CABRAL et al., 2006).

1.5.3 Teste do Nado Forçado

O teste do nado forçado (FST, do inglês *forced swim test*) é um dos modelos mais tradicionais para o estudo da depressão em animais de laboratório. Este é um modelo clássico, proposto por Porsolt e colaboradores (1977), e foi usado para testar o efeito antidepressivo de algumas drogas e apresenta alto valor preditivo, principalmente em relação à resposta aos medicamentos antidepressivos existentes.

Neste modelo, os animais são colocados individualmente em aquários de acrílico opaco com água ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) até certo limite, para que os animais fiquem impossibilitados de fugirem ou de se apoiarem com as patas ou cauda no fundo do

cilindro. Um dia antes do dia-teste, os animais são expostos ao FST, como treino geralmente por 15 minutos, e no dia-teste exposto por 5 minutos. Entre o treino e dia-teste, é administrado o fármaco em avaliação para atividade antidepressiva em três momentos: 24h, 5h e 1h antes do dia-teste. Após um período inicial de nado vigoroso, eles passam a executar apenas movimentos para manter a cabeça fora da água, e entre tantos comportamentos no FST a imobilidade é o principal comportamento avaliado (BARROS AND FERIGOLO, 1998). Este comportamento de imobilidade ocorre quando o rato deixa de se esforçar e permanece totalmente imóvel na piscina, e é interpretado como a perda de motivação, ou “desespero comportamental”, e a redução da duração da imobilidade por uma droga pode ser considerada como efeito tipo-antidepressivo (BARROS AND FERIGOLO, 1998).

Outras avaliações são feitas no FST, como comportamentos de mobilidade: escalar, quando o animal tenta escapar do aquário pelas paredes; e nadar, quando o animal tenta escapar com movimentos de nado pelo centro do aquário, ou permanece nadando com a cabeça acima da água (BARROS AND FERIGOLO, 1998).

Tem sido relatado que durante a retirada abrupta de álcool, a partir da exposição de etanol à vapor, camundongos ficaram mais imóveis no FST (HIRANI, KHISTI AND CHOPDE, 2002). Stevenson e colaboradores (2009) descreveram que após consumo oral de etanol em camundongos, somente com 14 dias de abstinência ao álcool houve aumento da imobilidade demonstrando efeitos depressivos nos animais, embora com 1 dia de abstinência não houvesse alteração comportamental no FST.

2 JUSTIFICATIVA

Entre os diversos tipos de modelos animais validados que existem na literatura, tanto de dependência quanto de abstinência alcoólica, há muitos questionamentos a fazer quanto ao emprego de uma metodologia adequada para mimetizar as reais condições de um alcoolista. Além disso, a ingestão frequente de doses baixas de etanol pode desencadear sérios danos à saúde no ser humano, os quais podem se intensificar após privações agudas de etanol destas doses consideradas sem risco para a população. As alterações de comportamentos que

ocorrem após a abstinência aguda de álcool são consideradas “menores” ou leves e, portanto, não são vistas com importância.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar alterações comportamentais durante períodos agudos de abstinência a doses baixas de álcool em ratos, com um modelo de autoadministração de etanol por dieta forçada.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o consumo de etanol dos animais, comparando a procura pela solução disponível entre os dias de privação e reapresentação de álcool na dieta;

Avaliar o comportamento dos animais durante os dias de abstinência ao álcool pelos testes do campo aberto, labirinto em cruz-elevado e nado forçado.

4 RESULTADOS

ARTIGO CIENTÍFICO:

“Behavioral Evaluation during Acute Alcohol Withdrawal Periods in Rats Submitted to Repeated Intermittent Ethanol Access”.

Behavioral Evaluation during Acute Alcohol Withdrawal Periods in Rats Submitted to Repeated Intermittent Ethanol Access

Priscila A. Costa¹, Jefferson H. Z. Poli¹, Camilla M. do V. Pereira¹, Nicolas de O. Cardoso¹, Nathalia Sperotto², Dinara J. Moura², Maurício S. Nin¹, and Helena M. T. Barros^{1*}.

¹ From the Department of Pharmacosciences, laboratory of Neuropsychopharmacology (PAC, JHZZP, CMVP, NOC, MSN, HMTB), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

² From the Department of Pharmacosciences, laboratory of Toxicology Genetic (NS, DJM), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

* Reprint requests: Helena M. T. Barros, MD, PhD, Department of Pharmacosciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 245 Sarmento Leite Street, Laboratory of Neuropsychopharmacology, PC 90050-170; Tel./Fax: +55 51 33038821; E-mail: helenbar@ufcspa.edu.br

Background: Intermittent ethanol access can manifest exploratory behavior changes and ethanol intake, and repeated acute alcohol withdrawals may enhance these. The aim of this study is to evaluate minor behavioral changes in acute withdrawal periods using a model of low dose of ethanol self-administration by a forced diet in rats.

Methods: Male Wistar rats were subjected to an oral ethanol self-administration procedure for a forced diet, in which they were offered 6-8% (v/v) ethanol solution for a period of 21 days followed by 5 repeated 24-hours cycles between alcohol withdrawal and reinstatement of the treatment. Control animals received a control diet without ethanol adding sucrose for same periods. Behavioral changes were analyzed on consecutive ethanol withdrawal days in the open field, elevated plus-maze and forced swim tests after to 6-9 hours alcohol deprivation.

Results: The repeated intermittent ethanol access enhanced solution intake and alcohol-seeking. Decreased exploratory activity was observed in the open field test and the animals stretched attempt less in the elevated plus-maze test. However, in the forced swim test the withdrawn rats spent less time doing of immobility behavior.

Conclusions: Repeated acute alcohol withdrawal induced minor behavioral changes in rats, in which these short periods of alcohol deprivation partially modeled the affective changes related to anxiety- and depression-like behaviors.

Key Words: Ethanol, Alcohol Withdrawal, Intermittent Ethanol Access, Minor Behavioral Changes, Self-administration.

INTRODUCTION

Repeated intermittent ethanol access by self-administration mimics the initial use of alcohol by humans whom experience multiple periods between alcohol withdrawals and relapses, representing a pattern of alcoholics (McMillen, 1997; Spanagel and Holter, 1999). This process has been applied to animals in which the period of alcohol deprivation, phenomenon known as “alcohol deprivation effect” (ADE), showed to increase the motivation for drug demand and alcohol consumption in rodents. (Spanagel and Holter, 1999; Sanchis-Segura and Spanagel 2006; Simms et al., 2008; Rosenwasser et al., 2012; Villas Boas et al., 2012; Tampier et al., 2013). The ADE may be potentiated by repeated cycles between alcohol deprivation and re-exposure (Spanagel and Holter, 1999; Rodd et al., 2009) alternating with faster cycles, i.e. 24-hour ethanol access (Wise, 1973; Simms et al., 2008).

Affective manifestations after ethanol removal become more severe with the chronic use of alcohol. However these manifestations have been observed in humans in a temporary state, after a single exposure to ethanol, which can be called as acute withdrawal or “hangover” (Kaladayian et al., 2013). This state is informed by university students volunteers who describe the symptoms of nausea and vomiting, headache, tremor, guilt, depressed mood, high levels of anxiety, drowsiness and being less alert the morning after alcohol consumption (McKinney and Coyle, 2006; Penning et al., 2013). Some of these symptoms also occur in alcohol withdrawal known as “minor alcohol withdrawal symptoms” and can happen while the patient still has a measurable blood alcohol level, approximately between 6 and 12-hours after cessation, and include mild anxiety, insomnia, headache, tremulousness, among others (Bayard et al., 2004). However, although larger repeated doses of ethanol cause more severe symptoms, a hangover is not only dose-dependent, but is also dependent on the volume ingested, time-consuming, food consumption, metabolism and individuals characteristics. It is probable that about 1.5g/kg of alcohol (approximately 5 to 6 drinks for 80kg-man, and 3 to 5 drinks for 60kg-woman) lead to hangover (Wiese et al., 2000).

Taking advantage of pre-clinical experiment results, the animals behavioral manifestations during acute alcohol withdrawal state may also resemble emotional or affective symptoms such as anxiety-like, agitation, hyperirritability, convulsions, stress and depression (Baldwin et al., 1991; Cabral et al., 2006; Stevenson et al.,

2009). Furthermore, some of these manifestations have been correlated with relapse following prolonged periods of ethanol cessation.

Actually, results from locomotor activity tests have been inconsistent in the literature showing hyperactivity (Barros et al., 1991; Kayir and Uzbay, 2008) or hypoactivity (Fachin-Sheit et al., 2006; Getachew et al., 2008; Bonassoli et al., 2011) during alcohol withdrawal after intermittent ethanol self-administration. However, results from forced diet with low doses of ethanol (6-8%) have shown a decrease in locomotion activity by rats in the first few hours of alcohol withdrawal (Devaud et al., 2002; Bonassoli et al., 2011).

Moreover, in acute alcohol withdrawal posterior to ethanol exposure there is an anxiogenic effect in the elevated plus-maze test (EPM) and social inhibition symptoms (Doremus et al., 2003; Varlinskaya and Spear, 2004; Zhang et al., 2007; Valdez et al., 2012). Unlike some reports in humans, it was found that a lower dose of ethanol (1g/kg) did not alter anxiety-like behaviors but higher doses (3g/kg) decreased exploration in the open arms in the EPM after 9-12hours of ethanol exposure (Zhang et al., 2007), suggesting that the effects of alcohol hangover may be dose-dependent and also occur after complete ethanol metabolism.

Other animal's behavior changes were found as immobility time increase (Williams et al., 2012) and latency to immobility decrease (Walker et al., 2010) in the forced swim test (FST) during acute withdrawal after intermittent alcohol intake. On the other hand, this increase of immobility was also seen after 14 days of alcohol withdrawal but is not apparent 1 day after alcohol cessation (Stevenson et al., 2009) suggesting that the depressive-like effect is still ambiguous regarding to the time of ethanol withdrawal.

Our hypothesis is that there are minor behavioral alterations such as changes in exploratory behavior and affective states that are associated to acute withdrawal periods after intermittent use of low doses of ethanol by rats. The main objective was to measure the behavioral changes after acute alcohol withdrawal during repeated intermittent alcohol access with a model of ethanol self-administration in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (35-40 days old; ~90g; $n=58$) were obtained from the Animal House of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). They were individually housed in polypropylene cages (25×35×35cm height), with wood shavings as bedding, and with free access to water and food in a temperature-controlled room ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) which was maintained on a 12/12-h light/dark cycle. The animals were weighted 2 days per week and water was freely available. All in vivo experiments followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science and were approved by the Ethical Committee for Research of UFCSPA (147/12). All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

Experimental procedure

The animals were randomly assigned for their respective groups (control and ethanol). From the day one to the 21st day, the animals consumed their respective solutions. From the 22nd day to the 31st, the animals followed 5 repeated 24-hours cycles between ethanol withdrawal (EW) and ethanol reinstatement (ER) (Figure 1). Two days before the day one, the animals had access to pure Sustagen®, for adaptation, since the alcohol was mixed to this solution. The behavior tests were made only on EW days.

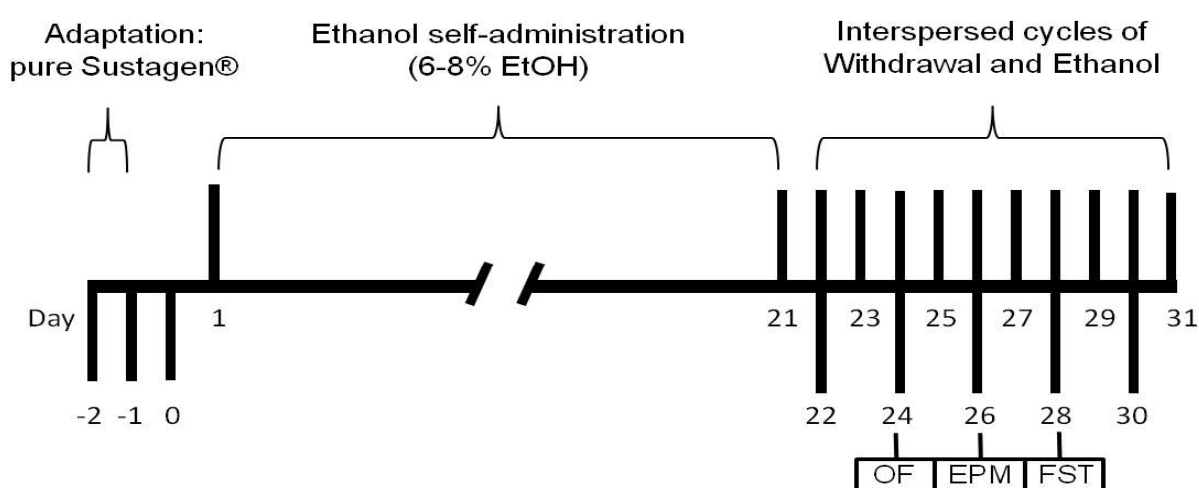


Figure 1: Experimental procedure timeline. Ethanol (EtOH); Open field test (OF); Elevated plus-maze test (EPM); Forced swim test (FST).

Ethanol self-administration

Ethanol (99.5%, v/v) was obtained from Alphatec (Brazil) and was diluted to 6 or 8% (v/v) in tap water every day. The amount of alcohol consumed daily during the treatment was converted to grams of alcohol per kg of body weight.

Chronic ethanol self-administration was based on a forced procedure of fluid dietary intake via drinking an alcohol containing liquid diet (Baldwin, 1991; Cabral *et al.*, 2006; Bonassoli *et al.*, 2011). The animals had access to two bottles for all experiment, one containing water and the other Sustagen® (chocolate flavor, Mead Johnson, Brazil), used as a vehicle for the alcohol consumption. Sustagen® is a ready-to-feed liquid formula providing protein, carbohydrate, fat plus vitamins and mineral salts corresponding to an amount of 1.1 kcal/ml (17.11g of Sustagen®/60ml of water by rat/day) and was the only source of food daily available to the animals (Bond and Di Giusto, 1976). This solution was prepared every day and then 50ml offered to each animal.

Then, for ethanol group ($n=44$), the diet was added with two different concentrations of ethanol. During the first two days of consume, ethanol concentration was 6% (v/v). After that period until the end of experiment (except withdrawal days) ethanol concentration used was increased to 8% (v/v). The control animals ($n=14$) received the same dietary base without ethanol during all experiment, and sucrose (Synth, Brazil) was added as a caloric substitute for ethanol, in which these values were 0.33 and 0.42kcal/mL corresponding to 6 and 8g of ethanol-containing diet, respectively. The solution bottles were weighted every day and changed of position in the cage every two days to prevent memory effects in the rats (Barros and Miczek, 1996).

Ethanol Withdrawal and Reinstatement

Following the induction phase, from the day 22nd to 31st, it was initiated cycles of 24h interspersed of forced alcohol withdrawal and ethanol reinstatement on the following day. This method increases the demand for the solution offered (Spanagel, 2003; Rosenwasser *et al.*, 2012). On all EW days the bottles were removed at 8 a.m. and maintained between six to nine hours of abstinence and after replaced with the

same control diet for all animals: Sustagen® without ethanol. The rats were exposed to the behavior tests on consecutive days (24th, 26th and 28th).

Behavioral tests

The animals were exposed to three classic tests of anxiety and depression. Behavioral tests were conducted between six and nine hours after abstinence (2 p.m. - 5 p.m.). The control groups were exposed to the same procedures.

All rats were exposed once per day in the tests for 300±5s, and were recorded with video camera and posteriorly analyzed using the software Behavsoft® (in patent process) by an observer blinded for treatment groups.

Open field test

All rats were individually placed in the center of a novel arena (70cm diameter and 40cm height). The arena was divided in 25 parts, being 9 considered as center and 16 as periphery. Total locomotor activity was analyzed after the experiment. All the events like locomotion on periphery and center, rearing and grooming were assessed. After each trial, the open field was cleaned with ethanol solution 70%.

Elevated plus-maze test

The EPM test was made of wood and had two open arms (50 × 10 cm), perpendicular to two enclosed arms of the same size, with 50cm-high walls. The apparatus was elevated 50 cm from the floor (Pellow et al., 1985; Pellow and File, 1986). The rats were placed individually on the central platform facing the open arm. An observer, who was blind to treatment groups, measured the time that the animals spent in the open and closed arms, as well as the number of entries on both arms. Besides that, the frequency and duration of grooming, of stretch attempt (rat into the closed arm with two paws on the open arm) and of spy (rat into the open arm looking for floor) were examined. The criteria for an arm entry were when the rat stay with all the four paws on the respective arm. The maze was cleaned with ethanol 70% after each test using damp and dry cloths.

Forced swim test

The FST is a modified version of Porsolt's test and has been shown to be sensitive to acute anti-depressant administration in the absence of background stress state (Porsolt, 1977). Briefly, the animals were individually placed in cubic glass pools (25×25×40cm) filled with 25 cm of water at a temperature of 25±1°C. Although the cylindrical pool is classically used for the FST, the cubic swimming pool was demonstrated to have the same sensitivity to detect the antidepressant effect of drugs and has been used as a model in our laboratory and by other researchers (Gomez *et al.*, 2003; Nin *et al.*, 2008). Two swim sections were conducted: an initial 15min training section followed 24 h later by a 5min test session. Following both sessions, the rats were removed from the pools, carefully dried with towels placed in a heated room for 15 min and later returned to their home cages. The frequency and duration of acts and postures (climbing, swimming, diving, head-shakes, total immobility, and latency to immobility) were quantified for each animal during the analysis. The behavioral analyses were described previously and the model showed both reliability and validity for detecting the antidepressant effects GABAergic drugs in the FST (Nin *et al.*, 2008). The entire contents of the cubic were changed before each animal session.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Sigma Stat 3.1. Kolmogorov-Smirnov test to verify normality to all variables, and also followed by an equal variance test. Linear Regression test was used to predict the relationship between dependent and independent variables about consumption of each group. Student's *t* test was used to verify differences between control and ethanol groups, in all behaviors analyzed in the OF, EPM and FST, and total ethanol intake. One-way analyses of variance (ANOVA) for repeated measures were used to compare solution and ethanol intake among rats, periods of EW or ER and different days. Tukey's test was used as post-hoc. If each behavior (variable) failed in the normality and/or equal variance test, it was carried on a non-parametric test (ANOVA on Ranks). Data were reported as mean ± standard error of mean (S.E.M.). Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$.

RESULTS

Ethanol intake

It was performed a forced diet with Sustagen[®] solution in a two-bottle free access procedure and the results had of total daily diet intake are shown in the Figure 2.A. There was a positive correlation in total daily intake by the EtOH rats during experiment ($P < 0.001$). The mean amount of ethanol consumption was 17.7g/kg/day over the 21 days of treatment. The daily solution consumed on 21 days were 37.0g by control and 32.7g by ethanol animals, and during the intermittent EtOH access or withdrawal (cycles of EW and ER days) the consumption remained on similar baseline 38.5g by controls, and the ethanol rats consumed on average 39.3g.

The Figure 2.B illustrates the consumption of both control and ethanol animals throughout the repeated intermittent access to ethanol and alcohol withdrawal days. Comparing the EW days, on 24th and the 28th days of the EtOH group consumed more solution than CTR. These days represent the consumption after immediate return of the performing the OF and FST tests, respectively. Moreover, comparing only the consumption during ER days, the EtOH rats consumed significantly less solution than the CTR animals on the first three consecutive ER days. However on day 29th there was a significant higher amount of solution containing ethanol than CTR group, and also showed that on the day 29th, comparing only ER days, the animals with alcohol consumed more solution than to other ER days ($P < 0.001$). Figure 2.C represents the total mean consumption of ethanol group between all cycles days, which the EtOH group consumed more the solution on EW days than when had ethanol in their diet on ER days ($P < 0.002$).

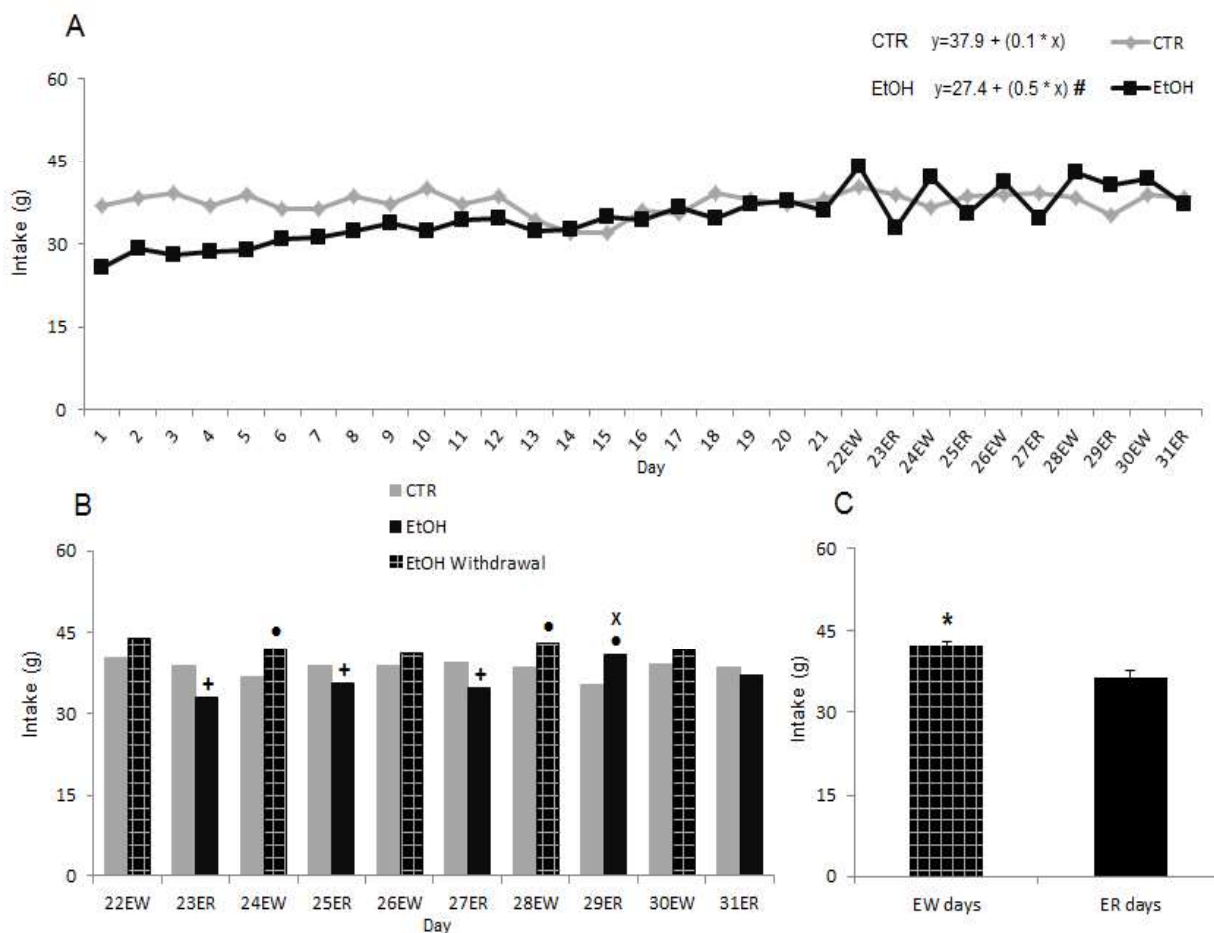


Figure 2: Daily consumption of total ethanol (EtOH) and control (CTR) solution by rats. Ethanol withdrawal day (EW) and Ethanol reinstatement day (ER). (A) Consumption/day of total solution during all experiment; (B) Consumption/day of total solution by CTR and EtOH rats on 10 cycle days; (C) Consumption of EtOH solution by rats between EW and ER days. Data are presented as each group's mean. Comparisons were made using the tests: Linear Regression and one-way ANOVA (RM). # represents significance in the linear regression test, $P<0.001$; + means difference statistics from the EtOH rats consumed a less than CTR, $P<0,05$ and • difference from the EtOH consumed more than CTR, $P<0.05$; x represents difference from the others ER days compared in EtOH group, $P<0.001$; * represents difference from the ER days, $P<0.002$.

Open field test

The open field test was performed to evaluate the anxiety-like state of animals. During ethanol withdrawal, there was a decrease in the total locomotion when compared to control rats ($P<0.001$; Figure 3.C), both in the periphery ($P<0.001$; Figure 3.A) and in the center ($P=0.009$; Figure 3.B), meaning a possible anxiety-like behavior increase in these animals. There was no difference between the number of rearing in control animals (23.2 ± 2.2) and ethanol withdrawal rats (19.5 ± 1.3) (Figure 3.D). There was an increase in the grooming frequency ($P=0.029$; Figure 3.E) and

duration ($P=0.024$; Figure 3.F) suggesting that these animals presented higher anxiety-like behavior than control animals.

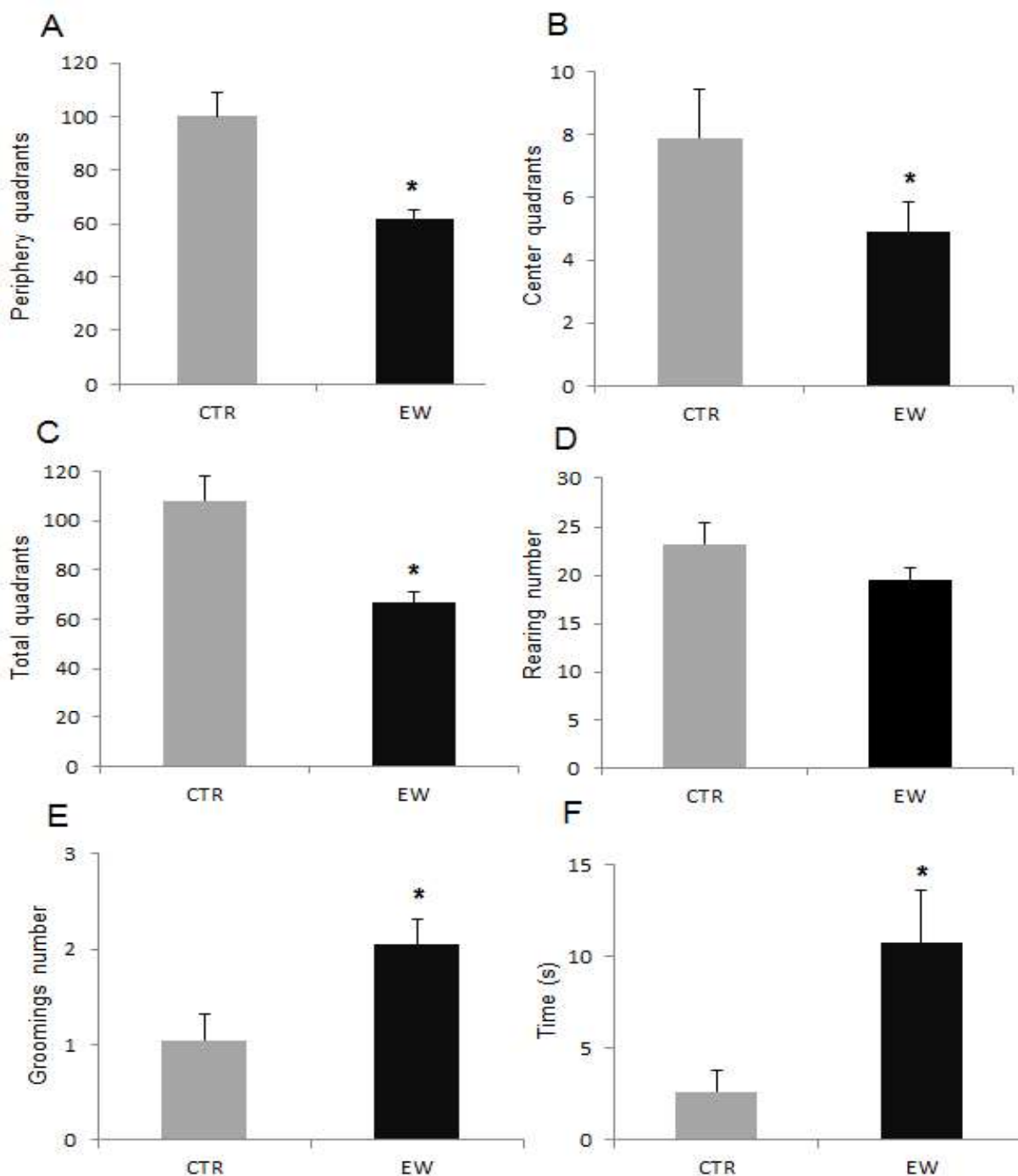


Figure 3: Effect of ethanol withdrawal (EW) versus control (CTR) rats in the open field test. (A) Locomotion on periphery, (B) Locomotion on center, (C) Total locomotion, (D) Rearing number, (E) Grooming frequency, (F) Grooming duration. Each bar represents mean \pm S.E.M. Comparisons were made using a Student's *t* test. * $P < 0.05$, compared to control group.

Elevated plus-maze test

This classic behavior test was delineated to evaluate the influence of ethanol withdrawal on the anxiety level of rats. There were no differences in the open arm entries ($P=0.517$; Figure 4.A), neither in the open arm duration ($P=0.132$; Figure 4.B). Nevertheless, during ethanol withdrawal rats stretched less than the control ones ($P=0.045$; Figure 4.C). There were no differences in the other behavioral test parameters observed in the EPM.

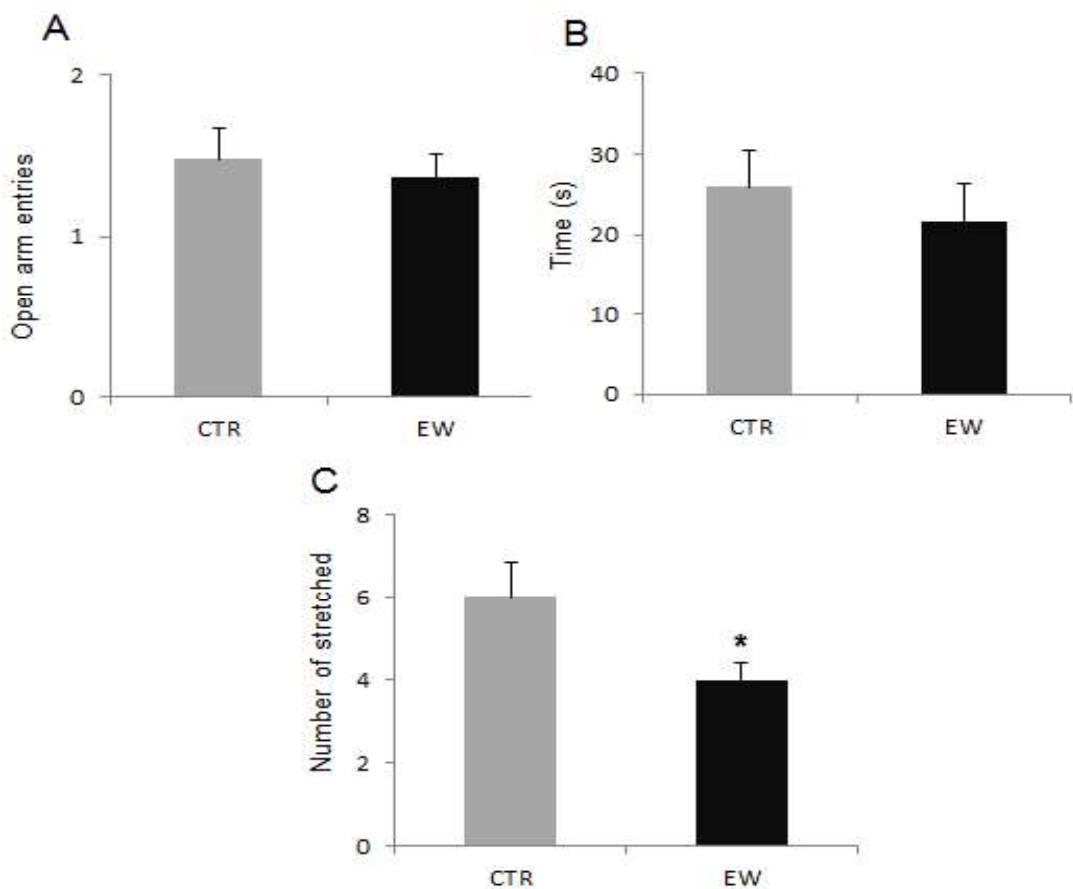


Figure 4: Effect of ethanol withdrawal (EW) versus control (CTR) rats on elevated plus maze test. (A) Open arm entries, (B) Open arm duration, (C) Number of stretched posture. Each bar represents the mean \pm S.E.M. Comparisons were made using a Student's *t* test. * $P < 0.05$, compared to control group.

Forced swim test

The FST was performed after the performance of the other anxiety behavior tests, on the 4th ethanol withdrawal day. In the test day, during the five minutes of

exposure, the rats spent less time during immobility behaviors comparing to control animals ($P=0.002$; Figure 5.A), however there was no difference of the latency to immobility between the groups ($P=0.633$; Figure 5.B). This immobility decrease reflected in an increase of climbing ($P=0.016$; Figure 5.C) and swimming duration ($P=0.049$; Figure 5.D) compared to control rats. Also, the ethanol withdrawal rats presented more head-shakes (5.6 ± 1.0) than the control rats (3.8 ± 1.5) ($P=0.02$; data not shown).

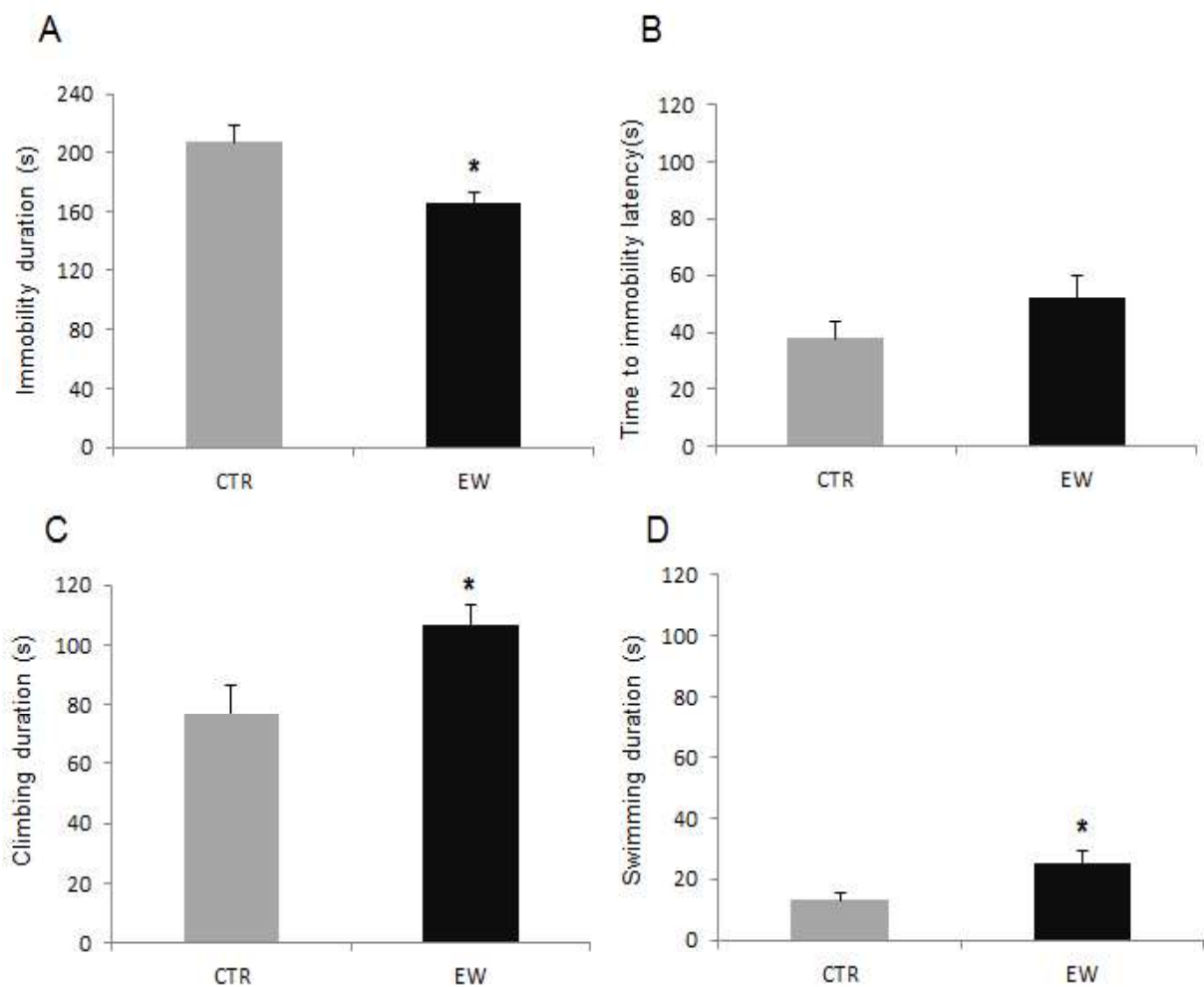


Figure 5: Comparison between ethanol withdrawal (EW) versus control (CTR) rats in the forced swim test. (A) Total immobility duration, (B) Latency to immobility, (C) Climbing duration, (D) Swimming duration. Each bar represents mean \pm S.E.M. Comparisons were made using a Student's t test. * $P < 0.05$, compared to control group.

DISCUSSION

This experiment was designed to test the hypothesis that the chronic ethanol self-administration induction by forced diet on free access to two bottles of water or ethanol solution and with the 24-hour cycle between alcohol deprivation and reinstatement, may exhibit minor behavioral changes in alcohol withdrawal period in rats.

In this present study we reproduced an animal model which represents both conditions of alcohol dependence and alcohol withdrawal in adulthood male rats. As Spanagel (2003) observed, the alcohol deprivation effect model had been associated with real human conditions, and in this case, alcoholics experimenting many abstinence and relapse episodes in their lives.

As described in the results, the consumption of ethanol was gradually increased during the twenty-one days of forced drinking, and determined amount ingested is sufficient to induce ethanol withdrawal signs, indicating a risk for alcohol dependence, as reported elsewhere (Baldwin et al., 1991; Cabral et al., 2006; Valdez and Harshberger, 2012). The control group consumed the same liquid diet but without ethanol during all experiment, and then adjusted the calories with the addition of sucrose to equalize with ethanol's calories (Bertotto et al., 2006; Cabral et al., 2006). Therefore, the liquid diets are nutritionally complete and animals typically consume sufficient quantities of ethanol to achieve dependence, reflected by the emergence of withdrawal symptoms after ethanol deprivation (Bertotto et al., 2006).

Also, still on consumption, the repeated intermittent alcohol periods after the continuous chronic ethanol self-administration, seems to manifest an effect of larger ethanol consumption by rats (Spanagel and Holter, 1999; Tampier et al., 2013). Melendez and colleagues (2006) showed that short-term deprivations followed by repeated (weekly) ethanol re-exposure produce a robust alcohol deprivation effect in mice. With a methodology of daily deprivation, our results point to a high alcohol mean consumption on the 4th day of re-exposure to the drug, indicating the beginning of this alcohol effect.

During ER days, the EtOH group remained with a similar mean of consumption (36.2 ± 0.4 g), compared to the alcohol continuous acquisition (21 days). These consumption was in accordance with previous studies have shown that rodents return to baseline levels of consumption within a few days after continuous

access to alcohol, even after multiple deprivations (Spanagel and Holter 1999; Rodd et al., 2009; Rosenwasser et al 2012).

Sinha (2001) described that there are several pre-clinical models of relapse showed that the brief foot-shock stress reestablishes the drug-seeking behavior in abstinent rats. Also, clinical studies from drug abusers samples and alcoholics often report stress and negative affect as reasons for the onset, maintenance and relapse to alcohol use (Sinha, 2001; Goeders, 2003).

According to the data showed here, it can be seen that the model used to induce alcohol dependence was effective for self-administration of a liquid diet containing ethanol as the sole source of food. The EtOH rats developed common behaviors to consume ethanol solution, and also increased the amount ingested every day, it has typically produced blood ethanol concentrations able to express dependence ranging from 80 to 132mg/dl (Bertotto et al., 2006; Bonassoli et al., 2011), and when alcohol was removed and then reintroduced, the animals have developed a greater behavior of alcohol-seeking.

Moreover, our results show that locomotion in the OF was decreased when alcohol was withdrawn, suggesting that there was a mild anxiety-like effect during acute alcohol withdrawal. According to Bonassoli and colleagues (2011), this behavior is also expressed with a decrease of distance traveled in the OF test after 24hs, but not after 48hs of abstinence. In addition some authors reported decrease on ambulation after 5hs of alcohol withdrawal in mice (Fachin-Sheit et al., 2006) and after 6hs of withdrawal in rats (Devaud et al., 2002). Pohorecky (1976), who also showed low mobility that declined on the following ethanol withdrawal days, reported that all withdrawal animals showed manifestations such as tremors and spontaneous vocalization. For Zhang and colleagues (2007) the characterization of anxiety-like behavior, during ethanol withdrawal evaluated in the EPM test, may direct hypoactive state as an additional behavioral ethanol withdrawal symptom, commonly observed after chronic ethanol treatment.

However, hyperactivity during alcohol withdrawal, which is a characteristic of alcohol withdrawal syndrome (AWS) in humans, has been observed in other studies with both rats and mice. As seen in Kayir and Uzbay (2008), the increase in locomotion occurs right after 2, 4 and 6hs of ethanol withdrawal period, but hyperactivity was observed in very early times after ethanol withdrawal, and this could be associated with recent ethanol intoxication. On the other side, there is an

increase of locomotion after 25hs of alcohol withdrawal in mice after ethanol oral consume or inhalation (Capaz et al., 1981) and Barros e colleagues (1991) also observed locomotor hyperactivity on modified OF test, which persists until five consecutive days of alcohol withdrawal. All these data led us to speculate that hyperactivity occurs during withdrawal after higher doses of ethanol, but this still is a matter of debate.

The same animals with low locomotor behavior had increased time in grooming behavior in a longer time suggests that the animals were more anxious, had higher conflicts than the controls in the OF test.

Grooming is often observed in stressful situations and is considered important in behavioral adaptation to stress and excitation reduction (Moyaho and Valencia, 2002). However, self-grooming is increased by both stress and comfort conditions, and quantification of frequency becomes an insufficient measure of grooming, pointing to inconclusive data interpretation and analysis. Grooming is an important animal behavior that can be induced by exposure to a new environment which can be indicate an anxiogenic-like behavior (Nin et al., 2012) and a predictor to stress-like behavior (Kalueff and Tuohimaa, 2005).

During alcohol deprivation, the animals showed no evident anxiety state in the EPM test. Other researchers also found no difference in entries in the open arms of the EPM (Kliethermes et al., 2005). Finn and colleagues (2000) observed no differences about 6 to 10hs of abstinence, similar time selected in this present study. However, the same authors, observed a significant decrease in open arm entries after 72hs of ethanol withdrawal in rats, representing an anxiogenic-like effect. This induction of anxiety state was also seen by Cabral and colleagues (2006), when animals entered more into the closed arms and less in the open arm after 48hs of ethanol deprivation. Also the increase of anxiety-like state in the EPM after withdrawal may be related to the ethanol dose ingested in liquid diet, which was observed after 30hs of ethanol deprivation with the higher doses but does not happen with the lower doses (Rylkova et al., 2009).

One other parameter analyzed in the EPM test, the risk assessment, it was observed that the animals, after the alcohol withdrawal, presented less stretched than control groups, similar as observed in mice (Cole et al., 1999). The number of stretch-attend postures, defined as when the subject stretches forward with its forepaws without actually moving its hind paws, can be interpreted as an anxiety-like

or stress posture, since the animals do not even have the courage to explore the open space on the open arm (Cole et al., 1999).

By analyzing the depressive-like behaviors in the FST, it can be observed that animals deprived from alcohol climbed more and made more head-shakes, and also swam for longer periods than control rats. These behaviors corroborate the significant shorter time spent doing immobility behaviors in the pool comparing with control animals. The decreased immobility time is in agreement with Richey and colleagues (2012) who found decreased immobility after 18h of ethanol injections withdrawal.

However, it's in disagreement with others studies which show no significant behavioral depressive-like changes in acute ethanol withdrawal, and also present reduction on latency to immobility in the FST after more than 14 days up to 60 days of alcohol withdrawal (Stevenson et al., 2009; Walker et al., 2010; van Waes et al., 2011). The depressive-like manifestations after long-term alcohol withdrawal were seen in different alcoholism models: vapor-exposition (Walker et al., 2010), oral self-administration (Stevenson et al., 2009), and two-bottle choice (van Waes et al., 2011), were described in different daily doses of our model.

One point that might be highlighted is that the FST was performed after the two anxiety evaluation tests (two days from the EPM test and four days from the OF test), and even if they were in different days, it could be interfere with the FST immobility results. However, some experiments indicate that test can be performed in sequence without any miss understanding in the behavioral results. Thought, the immobility decrease observed in the present study, is in accordance with previous results observed with stressed animals after chronic withdrawal (van Waes et al., 2011).

Anxiety, irritability and depressive symptoms are negative affective states which are commonly seen after withdrawal after chronic drug abuse (Kreek and Koob, 1998). The successive potentiation of withdrawal symptoms after repeated cycles of ethanol exposure and deprivation has been postulated to be a form of neurobiological trigger (Ballenger and Post 1978), altering multiple neurotransmitter systems and affecting several central nervous system regions. However, the authors presented that intermittent alcohol access to a low dose of ethanol liquid diet induces an elevated brain reward function compared to chronic continuous exposure to this diet. (Rylkova et al, 2009).

In fact, it is clear that there are still many questions to be answered about the erratic behavioral results presented during acute withdrawal after low doses of alcohol used intermittently. Methods of inducing minor signs of addiction, to establish short and long periods of abstinence, are some of the questions in order to clarify the symptoms that can reflect behaviors observed in alcoholic.

In conclusion, the behavioral changes presented in this study, after intermittent ethanol withdrawal, may be considered "minor" manifestations and do not fully model the affective states of anxiety or depression. It is still necessary to verify if it is possible to discriminate between ethanol acute withdrawal and ethanol "hangover", and thereby being able to use this experimental protocol in pharmacological screenings.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the graduate students Bisognin KM, Caletti G, Freese L, Souza MF, and Umpierrez, LS for technical assistance, and technicians Letícia Maya and Mário Serapião. We thank the support from CNPq (HMTB-1C) and the fellowship from CAPES (PAC).

REFERENCES

Baldwin HA, Rassnick S, Rivier J, Koob GF, Britton KT (1991). CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology* 103 : 227-232.

Ballenger JC, Post RM (1978). Kindling as a model for alcohol withdrawal syndromes. *Brit J Phisychiat*, 133:1-14.

Barros HMT, Miczek KA (1996). Withdrawal from oral cocaine in rats: ultrasonic vocalizations and tactile startle. *Psychopharmacology*, 125:379-384.

Barros HMT, Tannhauser MAL, Tannhauser SL, Tannhauser M (1991). Enhanced detection of hyperactivity after drug withdrawal with a simple modification of the open-field apparatus. *J Pharm Methods*, 26: 269-275.

Bayard M, McIntyre J, Hill JR, Woodside J (2004). Alcohol Withdrawal Syndrome. *Americ Fam Physic*, 69, 6: 1443-1450.

Bertotto ME, Bustos SG, Molina VA, Martijena ID (2006). Influence of ethanol withdrawal on fear memory: effect of D-cycloserine. *Neuroscience* 142: 979–990.

Bonassoli VT, Milani H, de Oliveira RMW (2011). Ethanol withdrawal activates nitric oxide-producing neurons in anxiety-related brain areas. *Alcohol*, 45: 641-652.

Bond NW (1979). Impairment of Shuttlebox Avoidance Learning following Repeated Alcohol Withdrawal Episodes in Rats. *Pharmac Biochem Behav*, 11: 589-591.

Bond NW, Di Giusto EL (1976). Effects of prenatal alcohol consumption on open-field behaviour and alcohol preference in rats. *Psychopharmacologia (Berl.)* 46: 163-165.

Cabral A, Isoardi N, Salum C, Macedo CE, Nobre MJ, Molina VA, Brandão ML (2006). Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG. *Experim Neurol*, 200: 200-208.

Capaz FR, Vasconcellos LEM, De Moraes S, Palermo Neto J (1981). The open-field: A simple method to show ethanol withdrawal symptoms. *Arch Int Pharmacodyn* 251:228-236.

Cole J.C, Littleton JM, Little HJ (1999). Effects of repeated ethanol administration in the plus maze: a simple model for conditioned abstinence behavior. *Psychopharmacology*, 142: 270–279.

Devaud LL, Bartoo G, Malthankar G (2002). Altered responses to dizocilpine maleate administration in ethanol-withdrawn male and female rats. *Alcohol* 28: 83–93.

Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP (2003). Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharm Biochem Behav*, 75: 411– 418.

Fachin-Scheit DJ, Ribeiro AF, Pigatto G, Goeldner FO, Boerngen-Lacerda R (2006). Development of a mouse model of ethanol addiction: naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. *J Neural Transm*. 113: 1305–1321.

Finn DA, Gallaher EJ, Crabbe JC (2000). Differential change in neuroactive steroid sensitivity during ethanol withdrawal. *J Pharmac Exp Therap*, 292: 394-405.

Getachew B, Hauser SR, Taylor RE, Tizabi Y (2008). Desipramine blocks alcohol-induced anxiety- and depressive-like behaviors in two rat strains. *Pharmac Biochem Behav* 91: 97–103.

Goeders NE (2003). The impact of stress on addiction. *European Neuropsychopharmacology* 13: 435– 441.

Gomez R, Vargas CR, Wajner M, Barros HMT (2003). Lower in vivo brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. *Brain Research* 968: 281–284.

Karayajian AG, Busso MJ, Feleder C, Cutrera RA (2013). Alterations in affective behavior during the time course of alcohol hangover. *Behavioural Brain Research* 253: 128– 138.

Kalueff AV, Tuohimaa P (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of Neuroscience Methods* 143: 169–177.

Kayir H, Uzbay T (2008). Pharmacology and cell metabolism: effects of clozapine on ethanol withdrawal syndrome in rats. *Alcohol & Alcoholism* 43, 6: 619-625.

Kliethermes CL (2005). Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 28:837–850.

Kreek MJ, Koob GF (1998). Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug and Alcohol Dependence*, 51: 23-47.

McKinney A, Coyle K (2006). Alcohol hangover effects on measures of affect the morning after a normal night's drinking. *Alcohol & Alcoholism*, 41, 1: 54–60.

McMillen BA (1997). Toward a definition of a valid model of alcoholism: multiple animal models for multiple diseases. *Alcohol*, 14, 4: 409-419.

Melendez RI, Middaugh LD, Kalivas PW (2006). Development of an alcohol deprivation and escalation effect in C57BL/6J mice. *Alcohol Clin Exp Res*, 30,12: 2017-2025.

Moyaho A, Valencia J (2002). Grooming and yawning trace adjustment to unfamiliar environments in laboratory Sprague-Dawley rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol*, 116, 3: 263-269.

Nin MS, Salles FB, Azeredo LA, Frazon APG, Gomez R, Barros HMT (2008). Antidepressant effect and changes of GABAA receptor α_2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. *J Psychopharmacol*, 22: 477-485.

Nin MS, Couto-Pereira NS, Souza MF, Azeredo LA, Ferri MK, Dalprá WL, Gomez R, Barros HMT (2012). Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. *Behav Pharmacol*, 684: 95-101.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14: 149-167.

Pellow S, File SE (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharm Biochem Behav*, 24: 525-529.

Penning R, McKinney A, Bus LD, Olivier B, Slot K, Verster JC (2013). Measurement of alcohol hangover severity: development of the Alcohol Hangover Severity Scale (AHSS). *Psychopharmacology*, 225:803–810.

Pohorecky LA (1976). Withdrawal from ethanol: simple quantitative behavioral tests for its evaluation. *Psychopharmacology* 50: 125-129.

Porsolt R D, LePichon M, Jalfre M (1977). Depression: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730–732.

Richey L, Doremus-Fitzwater TL, Buck HM, Deak T (2012). Acute illness-induced behavioral alterations are similar to those observed during withdrawal from acute alcohol exposure. *Pharm Biochem Behav*, 103: 284–294.

Rodd ZA, Bell RL, Kuc KA, Murphy JM, Lumeng L, McBride WJ (2009). Effects of concurrent access to multiple ethanol concentrations and repeated deprivations on alcohol intake of high-alcohol-drinking (HAD) rats. *Addiction Biology*, 14: 152–164.

Rosenwasser AM, Fixaris MC, Crabbe JC, Brooks PC, Ascheid S (2012). Escalation of intake under intermittent ethanol access in diverse mouse genotypes. *Addiction Biology*, 18, 496–507.

Rylkova D, Shah HP, Small E, Bruijnzeel AW (2009). Deficit in brain reward function and acute and protracted anxiety-like behavior after discontinuation of a chronic alcohol liquid diet in rats. *Psychopharmacology*, 203:629–640.

Sanchis-Segura C, Spanagel R (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology*, 11: 2–38.

Simms JA, Steensland P, Medina B, Abernathy KE, Chandler LJ, Wise R, Bartlett SE (2008). Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long–Evans and Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 32, 10: 1816-1823.

Sinha R (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology* 158, 4: 343-59.

Spanagel R (2003). Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Pract Res Clin Gastr*, 17, 4: 507–518.

Spanagel R, Holter SM (1999). Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism? *Alcohol & Alcoholism*. 34, 2: 231-243.

Stevenson JR, Schroeder JP, Nixon K, Besheer J, Crews FT, Hodge CW (2009). Abstinence following alcohol drinking produces depression-like behavior and reduced hippocampal neurogenesis in mice. *Neuropsychopharmacology*, 34: 1209–1222.

Tampier L, Quintanilla ME, Karahanian E, Rivera-Meza M, Herrera-Marschitz M, Israel Y (2013). The alcohol deprivation effect: marked inhibition by anticatalase gene administration into the ventral tegmental area in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 37, 8: 1278–1285.

Valdez GR, Harshberger E (2012). Kappa opioid regulation of anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal. *Pharm Biochem Behav*, 102: 44–47.

Van Waes V, Darnaudéry M, Marrocco J, Gruber J, Talavera E, Mairesse J, Van Camp G, Casolla B, Nicoletti F, Mathéc AA, Maccari S, Morley-Fletcher S (2011).

Impact of early life stress on alcohol consumption and on the short- and long-term responses to alcohol in adolescent female rats. *Behav Brain Res*, 221: 43–49.

Varlinskaya EI, Spear LP (2004). Acute ethanol withdrawal (hangover) and social behavior in adolescent and adult male and female sprague-dawley rats. *Alcohol Clinic Exp Res*, 28, 1: 40-50.

Villas Boas GR, Zamboni CG, Peretti MC, Correia D, Rueda AVL, Camarini R, Brunialti-Godard AL, Boerngen-Lacerda R (2012). GABAB receptor agonist only reduces ethanol drinking in light-drinking mice. *Pharm Biochem Behav*, 102: 233–240.

Walker BM, Drimmer DA, Walker JL, Liu T, Mathé AA, Ehlers CL (2010). Effects of prolonged ethanol vapor exposure on forced swim behavior, and neuropeptide Y and corticotropin releasing factor levels in rat brains. *Alcohol*, 44: 487-493.

Wiese JG, Shlipak MG, Browner WS (2000). The alcohol hangover. *Ann Intern Med*, 132:897-902.

Williams AM, Reis DJ, Powell AS, Neira LJ, Nealey KA, Ziegler CE, Kloss ND, Bilimoria JL, Smith CE, Walker BM (2012). The effect of intermittent alcohol vapor or pulsatile heroin on somatic and negative affective indices during spontaneous withdrawal in Wistar rats. *Psychopharmacology*, 223: 75–88.

Wise RA (1973). Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. *Psychopharmacologia (Berl.)*, 29: 203--210.

Zhang Z, Morse AC, Koob GF, Schulteis G (2007). Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 31, 11: 1811–1819.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo revelou que o protocolo utilizado foi capaz de induzir alterações comportamentais significantes tanto no consumo de etanol quanto nos testes comportamentais. Durante a abstinência alcoólica aguda, as principais alterações comportamentais nos ratos foram a diminuição da atividade exploratória

no campo aberto e a redução no tempo de imobilidade no nado forçado. Estas alterações podem ser consideradas manifestações "menores" e parece não modelar totalmente os estados afetivos de ansiedade ou depressão. Ainda é necessário verificar se é possível discriminar entre os efeitos da abstinência aguda e a ressaca de etanol, e, assim, poder utilizar este protocolo experimental para posteriores análises farmacológicas e toxicológicas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Aline Silva de. **Toxicidade do consumo crônico de baixas doses de etanol e predisposição ao alcoolismo em animais desnutridos**. 200f. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008. il.
- APA – American Psychiatry Association. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-5**. 2013, p. 490-503.
- BALDWIN, H.A.; RASSNICK, S.; RIVIER, J.; KOOB, G.F.; BRITTON, K.T. **CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat**. *Psychopharmacology*, vol. 103, 1991, p. 227-232.
- BARD, M. R., GOETTLER, C. E.; TOSCHLOG, E. A., et al. **Alcohol withdrawal syndrome: turning minor injuries into a major problem**. *The journal of trauma*. Vol. 61, nº 6, 2006.
- BARROS, H.M.T. AND FERIGOLO, M. **Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences**. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 23, 1998, p. 279–286.
- BARROS, H.M.T.; TANNHAUSER, M.A.L.; TANNHAUSER, S.L.; TANNHAUSER, M. **Enhanced detection of hyperactivity after drug withdrawal with a simple modification of the open-field apparatus**. *J Pharm Methods*, vol. 26, 1991, p. 269-275.
- BECKER, H. C. **Animals models of alcohol withdrawal**. *Alcohol research & health*. Vol. 24, nº 2, 2000.

- BERTOTTO, M.E.; BUSTOS, S.G.; MOLINA, V.A.; MARTIJENA, I.D. **Influence of ethanol withdrawal on fear memory: effect of D-cycloserine.** Neuroscience, vol. 142, 2006, p. 979–990.
- BLANCHARD, R.T.; MAGEE, L.; VENIEGAS, R. AND BLANCHARD, D.C. **Alcohol and anxiety ethopharmacological approaches.** Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat, vol. 17, 1993, p. 171-182.
- BONASSOLI, V.T; MILANI, H.; DE OLIVEIRA, R.M.W. **Ethanol withdrawal activates nitric oxide-producing neurons in anxiety-related brain areas.** Alcohol, vol. 45, 2011, p. 641-652.
- BOND, N.W.; DI GIUSTO, E.L. **Effects of prenatal alcohol consumption on open-field behaviour and alcohol preference in rats.** Psychopharmacologia (Berl.), vol. 46, 1976, p. 163-165.
- BOUNOVA, I.; ABOU-ASSI, S.; HEUMAN, D. M.; et al. **Alcoholic liver disease.** Hospital Physician. 2003.
- CABRAL A, ISOARDI N, SALUM C, MACEDO CE, NOBRE MJ, MOLINA VA, BRANDÃO ML. **Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG.** Experim Neurol, vol. 200, 2006, p. 200-208.
- CAGETTI, E.; LIANG, J.; SPIGELMAN, I.; OLSEN, R.W. **Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors.** Mol Pharmacol, vol. 63, nº 1, 2003, p. 53-64.
- CARLINI E.A., et al. **II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 108 Maiores Cidades do País – 2005.** São Paulo: CEBRID/SENAD - UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2006.
- COLASANTI, B. K. AND MARTIN, B. **Abuso de Drogas.** In: CRIG, C. R.; STITZEL, R.E. Farmacologia Moderna. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, p. 413-425.
- COLOMBO, G.; ADDOLORATO, G.; AGABIO, R.; CARAI, M.A.M.; PIBIRI, F.; SERRA, S.; VACCA, G.; and GESSA L.G. **Role of GABAB receptor in**

alcohol dependence: reducing effect of baclofen on alcohol intake and alcohol motivational properties in rats and amelioration of alcohol withdrawal syndrome and alcohol craving in human alcoholics. Neurotoxicity Research, Vol. 6, n° 5, 2004, p.403-414.

CUNNINGHAM, C. L.; FIDLER, T. L. AND HILL, K. G. **Animal Models of Alcohol's Motivational Effects.** Alcohol Research & Health. Vol. 24, n°. 2, 2000.

DAVID, D.J.P.; DHONNCHADHA, B.A.N.; JOLLIET, P.; HASCOËT, M.; BOURIN, M. **Are there gender differences in the temperature profile of mice after acute antidepressant administration and exposure to two animal models of depression?** Behavioural Brain Research, vol. 119, 2001, p. 203–211.

DAVIES, M. **The role of GABA_A receptors in mediating the effects of alcohol in the Central Nervous System.** Journal of Psychiatry Neuroscience. Vol. 28, n° 4, p. 263-274, 2003.

DEVAUD, L.L.; BARTOO, G. AND MALTHANKAR, G. **Altered responses to dizocilpine maleate administration in ethanol-withdrawn male and female rats.** Alcohol, vol. 28, 2002, p. 83–93.

FACHIN-SCHEIT, D. J., RIBEIRO, A. F., PIGATTO, G., et al. **Development of a mouse model of ethanol addiction: naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving** J Neural Transm. Vol. 113, p. 1305–1321, 2006.

FINN, D. A.; DOUGLASS A. D.; BEADLES-BOHLING, A. S.; TANCHUCK, M. A.; LONG S. L. AND CRABBE J. C. **Selected line difference in sensitivity to a GABAergic neurosteroid during ethanol withdrawal.** Genes, Brain and Behavior, vol. 5, p.53–63, 2006.

FINN, D.A.; GALLAHER, E.J. AND CRABBE, J.C. **Differential change in neuroactive steroid sensitivity during ethanol withdrawal.** J Pharmac Exp Therap, vol. 292, 2000, p. 394-405.

FORD, M.M.; BECKLEY, E.H.; NICKEL, J.D.; EDDY, S.; FINN, D.A. **Ethanol intake patterns in female mice: Influence of allopregnanolone and the inhibition of its synthesis.** Drug and Alcohol Dependence, vol. 97, 2008, p. 73–85.

GALDURÓZ JCF AND CAETANO R. **Epidemiology of alcohol use in Brazil.** Rev Bras Psiquiatr, São Paulo, n° 26, p.3-6, 2004.

- GETACHEW, B.; HAUSER, S.R.; TAYLOR, R.E.; TIZABI, Y. **Desipramine blocks alcohol-induced anxiety- and depressive-like behaviors in two rat strains.** *Pharmac Biochem Behav*, vol. 91, 2008, p. 97–103.
- GINSBURG, B.C. AND LAMB, R.J. **Reinforcement of an alternative behavior as a model of recovery and relapse in the rat.** *Behavioural Processes*, vol. 94, 2013, p. 60– 66.
- GOEDERS, N. E. **The impact of stress on addiction.** *European Neuropsych*, vol. 13, nº 6, 2003, p. 435-41.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; FONSECA, A. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica.** 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.
- GRAEFF, F. G. AND GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de psicofarmacologia.** São Paulo: Atheneu; 2005.
- HEILIG, M.; AND EGLI, M. **Pharmacological treatment of alcohol dependence: Target symptoms and target mechanisms.** *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 111, 2006, p. 855–876.
- HEILIG, M.; AND KOOB, G.F. **A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence.** *Trends Neurosci*, vol. 30, nº 8, 2007, p. 399–406.
- HENSLER, J.G.; HODGE, C.W.; AND OVERSTREET, D.H. **Reduced 5-HT3 receptor binding and lower baseline plus maze anxiety in the alcohol-preferring inbred fawn-hooded rat.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, vol. 77, 2004, p. 281 – 289.
- HIRANI, K.; KHISTI, R.T. AND CHOPDE, C.T. **Behavioral action of ethanol in Porsolt's forced swim test: modulation by 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one** *Neuropharmacology*, vol. 43, 2002, p. 1339–1350.
- HOUCHI, H.; PERSYN, W.; LEGASTELOIS, R.; AND NAASSILA, M. **The adenosine A2A receptor agonist CGS 21680 decreases ethanol self-administration in both non-dependent and dependent animals.** *Addiction Biology*, vol. 18, 2013, p. 812–825.
- ISRAEL, Y.; HURWITZ, E.; NIEMELA, O.; ARNON, R. **Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde-containing epitopes in**

acetaldehydeprotein adducts. Proceedings of the National Academy Sciences of the USA, N° 83, p. 7923-7927, 1986.

ISRAEL, Y.; ORREGO, H.; CARMICHAEL, F. J. **Acetate-mediated effects of ethanol**. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 18: 144- 148, 1994.

JANAK, P.H. AND Gill, T.M. **Comparison of the effects of allopregnanolone with direct GABAergic agonists on ethanol self-administration with and without concurrently available sucrose**. Alcohol, vol. 30, 2003, p. 1–7.

KALUEFF, A.V. AND TUOHIMAA, P. **The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research**. Journal of Neuroscience Methods, vol.143, 2005, p. 169–177.

KAUFMAN, J.; YANG, B-Z., DOUGLAS-PALUMBERI H., et al. **Genetic and environmental predictors of early alcohol use**. Biological psychiatry, vol. 61, n° 11, 2007, p. 1228-34.

KAYIR, H. AND UZBAY, T. **Pharmacology and cell metabolism: effects of clozapine on ethanol withdrawal syndrome in rats**. Alcohol & Alcoholism 43, n° 6, 2008, p. 619-625.

KIEFER, F.; JAHN, H.; KOESTER, A.; MONTKOWSKI, A.; REINSCHIED, R.K.; WIEDEMANN, K. **Involvement of NMDA receptors in alcohol-mediated behavior: mice with reduced affinity of the NMDA R1 glycine binding site display an attenuated sensitivity to ethanol**. Biol Psychiatry, vol. 53, 2003, p.345–351.

KLIETHERMES, C.L. **Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure**. Neurosci Biobehav Rev, vol. 28, 2005, p. 837–850.

KOOB, G. F.; AHMED, S. H.; BOUTREL, B.; *et al.* **Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence**. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 27, 2004. p 739–749.

KOOB, G.F. & LE MOAL, M. **Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction**. Phil. Trans. R. Soc. B. Vol. 363, 2008, p. 3113-3123.

- KNAPP, D.J.; OVERSTREET, D.H. AND BREESE, G.R. **Baclofen blocks expression and sensitization of anxiety-like behavior in an animal model of repeated stress and ethanol withdrawal.** *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 31, nº 4, 2007, p. 582–595.
- LARANJEIRA, R.; NICASTRI, S.; JERÔNIMO, C.; *et al.* **Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA) e o seu tratamento.** *Revista Brasileira de Psiquiatria*. Vol. 22, nº 2, 2000. p 62-71.
- LARANJEIRA, R.; PINSKY, I., ZALESKI, M. AND CAETANO, R. **I levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira.** Brasília: SENAD, 2007.
- LIEBER, C. S. **Medical and nutritional complications of alcoholism:** mechanisms and management. New York: Plenum Press, p.579, 1992.
- LITTLETON, J. **Neurochemical mechanisms underlying alcohol withdrawal.** *Alcohol Health & Research World*. Vol. 22, nº 1, 1998.
- MANZO, L.; GÓMEZ, M.J.; CALLEJAS-AGUILERA, J.E.; *et al.* **Oral ethanol self-administration in inbred Roman high- and low-avoidance rats:** gradual versus abrupt ethanol presentation. *Physiology & Behavior*, vol. 108, 2012, p. 1–5.
- MARQUES, A. C. P. R., RIBEIRO, M., LARANJEIRA, R., *et al.* **Abuso e Dependência do Álcool.** Projeto diretrizes – AMP-CFM. 2002.
- McKEON, A.; FRYE M. A. AND DELANTY, N.. **The alcohol withdrawal syndrome.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Vol 79, p. 854–862, 2008.
- McMILLEN, B.A. **Toward a definition of a valid model of alcoholism: multiple animal models for multiple diseases.** *Alcohol*, Vol. 14, No. 4, 1997, p. 409-419.
- MULIA, N., YE, Y., ZEMORE, S. E. AND GREENFIELD, T. K.. **Social disadvantage, stress, and alcohol use among black, Hispanic and white Americans:** findings from the 2005 U.S. National Alcohol Survey. *Journal of studies on alcohol and drugs*. Vol. 69, nº 6, p. 824-33, 2008.

- MUNCIE, H. L. JR., YASINIAN, Y. AND OGE', L.. **Outpatient management of alcohol withdrawal syndrome**. American Family Physician. Vol. 88, nº 9, 2013.
- NAIMI, T. S.; BREWER, R. D.; MOKDAD, A.; et al. **Binge drinking among US adults**. JAMA. Vol. 289, nº 1, 2003, p.70-75.
- NIEL, M. AND SILVEIRA, D. X. **Drogas e redução de danos: uma cartilha para profissionais de saúde**. São Paulo: Ministério da Saúde, 2008.
- NIN, M.S.; COUTO-PEREIRA, N.S.; SOUZA, M.F.; AZEREDO, L.A.; FERRI, M.K.; DALPRÁ, W.L.; GOMEZ, R.; BARROS, H.M.T. **Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests**. Behav Pharmacol, 684, 2012, p. 95-101.
- PANDEY, S.C.; ROY, A. AND ZHANG, H. **The Decrease Phosphorylation of Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) Response Element Binding (CREB) Protein in the Central Amygdala Acts as a Molecular Substrate for Anxiety Related to Ethanol Withdrawal in Rats**. Alcohol Clin Exp Res, vol. 27, nº. 3, 2003, p. 396-409.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. **Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat**. J Neurosci Methods, vol. 14, 1985, p. 149-167.
- PEREIRA, E. L. A. AND OLIVEIRA, I. R. Farmacologia do álcool etílico. Tratamento Farmacológico do Alcoolismo. In: SILVA, PENILDON. **Farmacologia**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 313-319.
- PISU, M.G.; MOSTALLINO, M.C.; DOREA, R.; MACIOCCO, E.; SECCI, P.P.; AND SERRA, M. **Effects of voluntary ethanol consumption on emotional state and stress responsiveness in socially isolated rats**. Eur Neuropsychopharmacol, vol. 21, nº 5, 2011, p. 414–425.
- PORSOLT R D, LEPICHON M, JALFRE M. **Depression: a new model sensitive to antidepressant treatments**. Nature, vol. 266, 1977, p. 730–732.
- PRUT, L. AND BELZUNG, C. **The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review**. European Journal of Pharmacology, vol. 463, 2003, p. 3– 33.

- RALL, T. W. Hipnoticos e Sedativos; Etanol. In: GOODMAN e GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 228-252.
- RANG, H. P., DALE, M. M. AND RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001.
- RICHEY, L.; DOREMUS-FITZWATER, T.L.; BUCK, H.M; DEAK, T. **Acute illness-induced behavioral alterations are similar to those observed during withdrawal from acute alcohol exposure**. Pharm Biochem Behav, vol. 103, 2012, p. 284–294.
- SANNA, E., MOSTALLINO, M. C., BUSONERO F., et al. **Changes in GABAA receptor gene expression associated with selective alterations in receptor function and pharmacology after ethanol withdrawal**. The Journal of Neuroscience. Vol. 23, nº 37, 2003, p. 11711–11724.
- SCIVOLETTO, S. AND MALBERGIER, A. **Fundamentos de toxicologia**. Etanol. In: OGA, SEIZI. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2003. p. 272-285.
- SERRA, S.; BRUNETTI, G.; VACCA, G.; et al. **Stable preference for high ethanol concentrations after ethanol deprivation in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats**. Alcohol, vol. 29, 2003, p. 101–108.
- SHARKO, A.C.; KAIGLER, K.F.; FADEL, J.R.; WILSON, M.A. **Individual differences in voluntary ethanol consumption lead to differential activation of the central amygdala in rats**: relationship to the anxiolytic and stimulant effects of low dose ethanol. Alcohol Clin Exp Res, Vol. 37, nº S1, 2013, p. 172-180.
- SIEGMUND, S.; VENGELIENE, V.; SINGER, M.V. SPANAGEL, R. **Influence of age at drinking onset on long-term ethanol self-administration with deprivation and stress phases**. Alcohol Clin Exp Res, vol. 29, nº 7, 2007, p. 1139-1145.
- SILVA, M.T.B.; ARAÚJO, F.L.O.; FÉLIX, F.H.C; *et al.* **Álcool e nicotina: mecanismos de dependência**. Revista de Neurociências. Vol 18, nº 4, 2010. p 531-537.
- SIMMS, J.A.; BITO-ONON, J.J.; CHATTERJEE, S.; AND BARTLETT, S.E. **Long-Evans rats acquire operant self-administration of 20% ethanol without sucrose fading**. Neuropsychopharmacology, vol. 35, 2010, p. 1453–1463.

- SINHA, R. **How does stress increase risk of drug abuse and relapse?** Psychopharmacology. Vol. 158, n° 4, p. 343-59, 2001.
- SINNOT, R.S.; PHILLIPS, T.J. AND FINN, D.A. **Alteration of voluntary ethanol and saccharin consumption by the neurosteroid allopregnanolone in mice.** Psychopharmacology, vol. 162, 2002, p.438–447.
- SPANAGEL, R. **The influence of opioid antagonists on the discriminative stimulus effects of ethanol.** Pharmacology Biochemistry & Behavior, vol. 54, n°. 4, 1996, p. 645-649.
- SPANAGEL, R. **Recent animal models of alcoholism.** Alcohol Research & Health - Recent Animal Models of Alcoholism. Vol. 24, n°. 2, 2000, p. 124-131.
- SPANAGEL, R. **Alcohol addiction research: from animal models to clinics.** Best Pract Res Clin Gastr, vol. 17, 4, 2003, p. 507–518.
- SPANAGEL, R. AND HOLTER, S. M. **Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism?** Alcohol & Alcoholism. Vol. 34, n° 2, 1999, p. 231-243.
- SPANAGEL, R. AND HOLTER, S. M. **Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism.** J Neural Transm. Vol.107, 2000, p. 669-680.
- STEIMER, T. **Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues.** Translational research - Dialogues in Clinical Neuroscience, vol. 13 . n° 4 2011, p. 495-506.
- STEVENSON, J.R.; SCHROEDER, J.P.; NIXON, K.; BESHEER, J.; CREWS, F.T.; HODGE, C.W. **Abstinence following alcohol drinking produces depression-like behavior and reduced hippocampal neurogenesis in mice.** Neuropsychopharm, vol. 34, 2009, p. 1209–1222.
- TAMPIER, L.; QUINTANILLA, M.E.; KARAHANIAN, E.; RIVERA-MEZA, M.; HERRERA-MARSCHITZ, M.; ISRAEL, Y. **The alcohol deprivation effect: marked inhibition by anticatalase gene administration into the ventral tegmental area in rats.** Alcohol Clin Exp Res, vol. 37, n° 8, 2013, p. 1278–1285.

- THORSELL, A.; TAPOCIK, J.D.; LIU, L.; et al. **A novel brain penetrant NPS receptor antagonist, NCGC00185684, blocks alcohol-induced ERK-phosphorylation in the central amygdala and decreases operant alcohol self-administration in rats.** The Journal of Neuroscience, vol. 33, n° 24, 2013, p.10132–10142.
- USDA - United States Department of Agriculture. **Nutrition and Your Health: dietary guidelines for americans.** Wshington: Home and Garden Bulletin, 5^aed N° 232. 2000.
- VAN ERP, A.M.M.; AND MICZEK, K.A. **Increased aggression after ethanol self-administration in male resident rats.** Psychopharmacology, vol. 131, 1997, p. 287.295.
- VEATCH, L.M.; WRIGHT, T.M. AND RANDALL, C.L. **Only male mice show sensitization of handling-induced convulsions across repeated ethanol withdrawal cycles.** Alcohol Clin Exp Res, vol. 31, n° 3, 2007, p. 477-485.
- VILLAS BOAS, G.R.; ZAMBONI, C.G.; PERETTI, M.C.; CORREIA, D.; RUEDA, A.V.L.; CAMARINI, R.; BRUNIALTI-GODARD, A.L.; BOERNGEN-LACERDA, R. **GABAB receptor agonist only reduces ethanol drinking in light-drinking mice.** Pharm Biochem Behav, vol. 102, 2012, p. 233–240.
- VOGEL-SPROTT, M. **Is behavioral tolerance learned?** Alcohol health & research. Vol. 21, n° 2, p. 144- 148, 1997.
- WALKER, B.M.; DRIMMER, D.A.; WALKER, J.L.; LIU, T.; MATHÉ, A.A.; EHLERS, C.L. **Effects of prolonged ethanol vapor exposure on forced swim behavior, and neuropeptide Y and corticotropin releasing factor levels in rat brains.** Alcohol, vol. 44, 2010, p. 487-493.
- WHO - World Health Organization. **Global status report on alcohol 2004.** Department of Mental Health and Substance Abuse. Geneva, 2004.
- WILLNER, P. **Methods for assessing the validity of animal models of human psychopathology.** Animal models in psychiatry I – Neuromethods, vol. 18, 1991, p.1-23.
- ZALESKI, M.; MORATO, S. G.; SILVA, V. A. AND LEMOS, T. **Neuropharmacological aspects of chronic alcohol use and withdrawal**

syndrome. Revista Brasileira de Psiquiatria: Florianópolis. Nº 26, 2004, p 40-42.

ANEXOS

Anexo 1 – Adendo à dissertação: resultados adicionais



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

ADENDO À DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Resultados adicionais

À banca avaliadora,

É com grande satisfação a que venho incluir novos resultados à minha dissertação de mestrado, o qual foi obtido após o envio da dissertação à relatoria do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

Estes novos resultados são de grande relevância e corroboram com alguns resultados comportamentais aprimorando esta dissertação. Como já relatado, é sabido que a ingestão de etanol provoca sérios danos toxicológicos em diversos órgãos, principalmente no cérebro em que as espécies reativas de oxigênio, produzidas durante a metabolização do álcool, podem causar danos em várias biomoléculas, incluindo o DNA. Assim, estes resultados adicionais proveram do objetivo de verificação se neste modelo de ingestão de álcool há formação de quebras na molécula de DNA. Para alcançar tal objetivo foi utilizada a técnica do ensaio cometa, versões alcalina e neutra, para avaliação de quebras na molécula de DNA em diferentes regiões do cérebro, incluindo hipotálamo, córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e cerebelo. Adicionalmente, a formação de espécies reativas de oxigênio foi verificada utilizando a sonda fluorescente diclofluoresceína.

1 Introdução às metodologias realizadas

1.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa, ensaio de eletroforese de células isoladas em microgel ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis Assay) foi inicialmente proposto por Östling e Johanson (1984), e seu princípio básico leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização dentro do núcleo (Collins, 2014). Singh e colaboradores (1998) modificaram e aprimoraram o ensaio cometa com a introdução de condições alcalinas desenvolvendo uma eletroforese de células isoladas, demonstrando desta maneira que a sensibilidade do teste está relacionada ao fato de detectar as quebras de fita simples do DNA, diferente dos testes citogenéticos que detectam quebras na dupla fita do DNA. Essa modificação permite mensurar não somente quebras nas duas fitas do DNA, mas também em uma única fita do DNA de núcleos interfásicos, além de permitir detectar sítios susceptíveis a ataques alcalinos (Burlinson, 2012).

Existem dois tipos de protocolos disponíveis para a realização deste teste, estabelecidos de acordo com o pH: (a) tratamento neutro (pH 7-8), que detecta quebras duplas no DNA, realizado de acordo com o método original descrito por Östling e Johanson (1984); e (b) tratamento alcalino (pH > 13), que detecta quebras de fita única e dupla, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas e sítios de reparação por excisão incompletas, realizado de acordo com a técnica proposta por Singh et al. (1988). Pode ainda ser utilizado o protocolo levemente alcalino com eletroforese em tampão com pH 12,1, que se diferencia do pH > 13 por não detectar danos alcalilábeis (Azqueta e Collins, 2013).

1.2 Oxidação da 2'7'-Diclorofluoresceína

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são intermediários químicos extremamente importantes em estudos biológicos, devido às suas múltiplas funções fisiologicamente essenciais e seus efeitos, muitas vezes patologicamente deletérios. Por isso, é vital que a sua presença em amostras biológicas seja quantificável (Chen et al., 2010; Joshi e Bakowska, 2011). Um dos métodos utilizados para detecção de EROs, é baseado na oxidação da sonda não-fluorescente 2' 7'-

dichlorodihydrofluorescein (DCFH₂) para se obter a molécula altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). A DCFH₂ na presença de EROs é rapidamente oxidada transformando-se então em DCF que apresenta um alto rendimento quântico de fluorescência quando excitado. Assim, neste ensaio, o aumento da fluorescência observada é proporcional à produção de ERO.

2. Material e métodos

2.1 Procedimento experimental

No presente estudo já relatado anteriormente, foram disponibilizadas doses baixas de etanol (8% EtOH) a 58 ratos Wistar durante um período crônico de 21 dias contínuos e com 24 horas de livre acesso. Além desse período, os animais passaram por mais uma etapa de consumo de etanol, em que se privava da solução alcoólica e no dia seguinte era rerepresentada aos ratos, seguindo com estes ciclos alternados durante 10 dias. Os testes comportamentais foram realizados durante os dias de privação de etanol, como descrito nesta dissertação. Imediatamente após a eutanásia dos animais por guilhotinamento, as diferentes regiões do cérebro, incluindo córtex pré-frontal, hipotálamo, estriado, cerebelo e hipocampo foram dissecadas e congeladas a -80 ° C.

2.2 Preparo das amostras

De acordo com o método descrito por Hartmann et al (2003), foi feita uma suspensão de células individuais a partir das diferentes áreas cerebrais. Cada área do cérebro foi colocada em um microtubo separado com 300 µL de solução gelada de PBS acrescido de 20 mM EDTA e 10% de DMSO. Estes tecidos foram macerados com auxílio de uma pinça, seguida de decantação dos tecidos e coleta do sobrenadante contendo as células isoladas. A concentração e a viabilidade celular foram determinadas usando azul de trypan em câmara de Neubauer. As células isoladas foram posteriormente utilizadas para realização do ensaio cometa nas versões alcalina e neutra.

2.3 Ensaio cometa

O ensaio do cometa alcalino foi realizado de acordo com Silva e colaboradores (1988) e Hartmann e Speit (1997). As células isoladas ($\sim 10^4$ células/mL) das diferentes áreas cerebrais foram misturadas com uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (0,75 %) e espalhadas em lâminas de microscópio pré-revestidas de agarose (1,5 %). As lâminas foram incubadas em solução de lise gelada (2,5 M de NaCl, 10 mM de Tris, 100 mM de EDTA, 1 % Triton X-100, e DMSO a 10%, pH 10,0) a 4°C durante 24 horas para remoção das membranas celulares. Após esta etapa, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal e incubadas a solução tampão (NaOH a 300 mM, EDTA 1 mM, pH 12,0) a 4°C durante 15 minutos para permitir o desenovelamento da molécula de DNA e a exposição das regiões de quebras. Em seguida foi conduzida a eletroforese neste mesmo tampão por 15 minutos com uma corrente de 94 V/cm (300 mA e 25 V). O ensaio cometa na versão neutra foi realizado seguindo essencialmente o mesmo procedimento da versão alcalina, exceto para as condições de eletroforese (Wojewódzka et al., 2002). Nesta versão, após um período de equilíbrio de 60 min das lâminas, a eletroforese foi realizada durante 1 hora em tampão de eletroforese neutro (100 mM de Tris e 300 mM de acetato de sódio, pH 8,5) com uma corrente de 0,5 V/cm (a 12 mA e 14 V). Todos os passos descritos acima foram realizados sem incidência direta de luz, a fim de evitar danos adicionais na molécula de DNA. Após estas etapas, as lâminas foram neutralizadas e coradas com nitrato de prata para posterior observação em microscópio óptico.

Cem células de cada tratamento foram selecionadas para análise da migração de DNA, e a média das duas lâminas de cada tratamento foi utilizada para determinar o índice de dano (ID). O ID é uma pontuação arbitrária calculada baseada na classificação das diferentes classes de danos, que são visualmente determinadas de acordo com o comprimento da cauda em cinco classes: (1) Classe 0: sem danos, sem cauda; (2) Classe 1: com uma cauda mais curta do que o diâmetro do núcleo da cabeça; (3) Classe 2: com um comprimento da cauda 1 - 2x o diâmetro da cabeça; (4) Classe 3: com uma cauda mais longa do que 2x o diâmetro da cabeça; e (5) Classe 4: cometas sem cabeças. O DI varia de 0 (sem cauda: 100 células \times 0) a 400 (com a migração máxima: 100 células \times 4).

2.4 Determinação do estresse oxidativo

A 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCF-DA) foi utilizada como um indicador da produção de peróxido pelos componentes celulares. Este método experimental de análise baseia-se na desacetilação da sonda DCFH-DA, e a sua oxidação subsequente por espécies reativas a DCFH, um composto altamente fluorescente (Halliwell e Gutteridge 2007). As frações do sobrenadante das diferentes regiões do cérebro foram adicionadas a um meio contendo tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e DCFH-DA (1 mM). As amostras foram incubadas no escuro durante 1 hora, até o início do procedimento de medição de fluorescência (excitação a 488 nm e emissão a 525 nm). A oxidação de DCFH foi determinada utilizando uma curva padrão de DCF e os resultados foram corrigidos pelo conteúdo de proteína de cada amostra medido pelo método de Bradford.

2.5 Análises estatísticas

Após as médias serem obtidas após o cometa e o teste da DCF, foi realizada a análise estatística desses danos em cada região cerebral, comparando as estruturas dos animais expostos ao etanol com os controles, a partir do teste *t-Student*, considerando diferença estatística significativa $P < 0,05$ (dados expressos em média \pm erro padrão).

3. Resultados e discussão

Os resultados do ensaio cometa versão alcalina indicam um aumento significativo no número de quebras na molécula de DNA em todas as regiões cerebrais induzidos pelo consumo de etanol (Figura 1). Alguns autores têm demonstrado que o etanol leva a perda de neurônios em diferentes regiões cerebrais e isto parece estar associado com prejuízos cognitivos, deficiência colinérgica e demência (Brooks, 1997; Arendt, 1995; Brooks, 2000, Harper, 2005). Embora os efeitos do álcool no cérebro sejam bem documentados, os mecanismos associados a esta toxicidade é pobremente entendido. Alguns modelos de toxicidade têm sido propostos envolvendo, por exemplo, receptores do tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) onde o etanol aumentaria a vulnerabilidade da resposta citotóxica do glutamato (excitotoxicidade) com um aumento da entrada do influxo de cálcio (Krystal et al., 2003; Seitz, 2007; Sakaguchi et al., 2011). Outros trabalhos têm associado a

toxicidade do etanol a um aumento de EROs, como produto da metabolização do etanol mediado pelas enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e catalase, relevantes para a metabolização do etanol no cérebro (Deng e Deitrich, 2008; Kasai, 1997). Como consequência desta toxicidade, Young e colaboradores (2003) demonstraram que o etanol induz apoptose neuronal mediada pelo aumento do fator pró-apoptótico Bax, seguida de liberação do citocromo C da mitocôndria e ativação das caspases 9 e 3. A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas distintas, tais como diminuição do volume celular, despolarização de mitocôndria com liberação de citocromo C, condensação de cromatina e fragmentação do DNA. Dessa forma, nossos dados vêm corroborar com mais uma possibilidade de mecanismo de toxicidade associado a prejuízos neuronais induzidos pelo etanol.

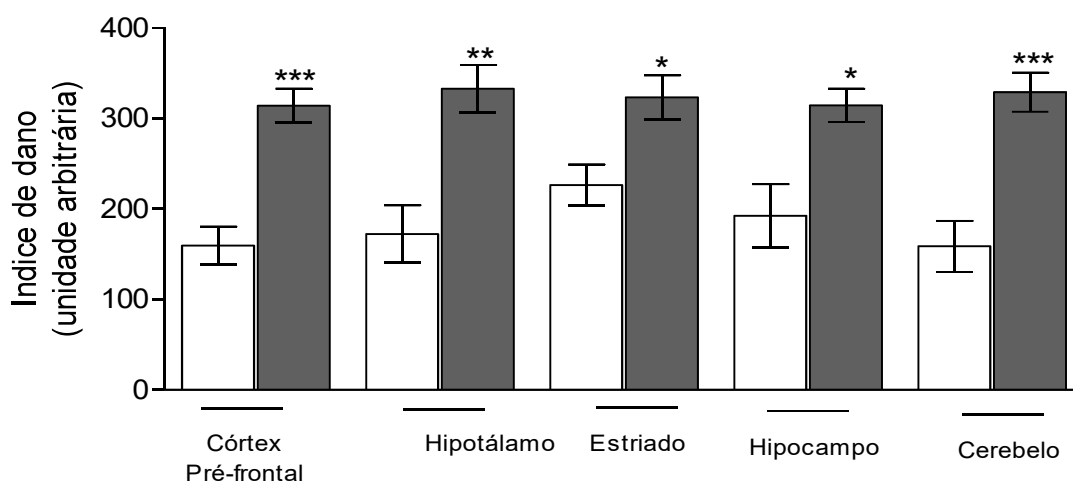


Figura 1 – Índice de dano no DNA visualizado através do cometa alcalino nas diferentes estruturas cerebrais. Barra preta representa os animais expostos ao etanol, e a barra branca representa os animais controles. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$, comparados aos controles.**

Recentemente foi demonstrado que o consumo de etanol a 10% durante quatro semanas induz genotoxicidade visualizada pela formação de micronúcleos (Kotova et al., 2013). Neste estudo os autores verificaram que o acetaldeído, resultante da metabolização hepática do etanol, bloqueia a replicação de DNA em células de mamífero, resultando na formação de quebras duplas na molécula de DNA com aumento da expressão das proteínas Rad51, associada a via de reparação de DNA por recombinação homóloga, e γ -H2AX, uma histona modificada sinalizadora de quebras duplas na molécula de DNA. Com o intuito de verificar se o

tratamento com etanol proposto neste trabalho induz formação de quebras duplas na molécula de DNA utilizamos a metodologia do ensaio cometa versão neutra. Interessantemente, neste não houve diferença estatística entre os grupos controle e etanol, indicando que o etanol não induz formação de quebras duplas na molécula de DNA (Figura 2), descartando a possibilidade do acetaldeído estar formando adutos com a molécula de DNA, explicando a formação de quebras duplas como previamente mostrado (Rulten et al., 2008). Outra possibilidade a ser considerada que explicaria a ausência de formação de quebras duplas é o fato que as células neuronais não se duplicam, considerando que a lesão é mediada pelo bloqueio da replicação causado pelo aduto DNA-acetaldeído.

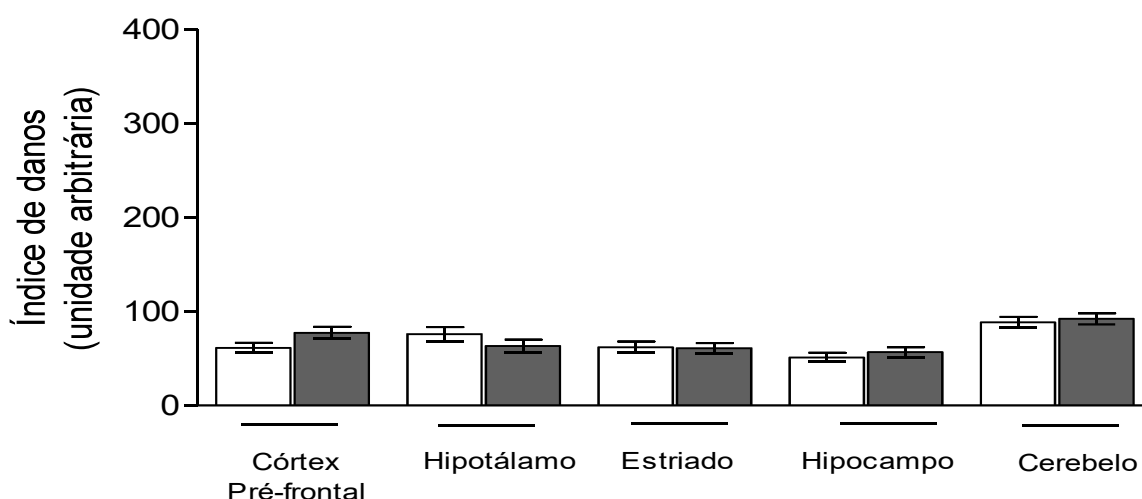


Figura 2 – Índice de dano no DNA visualizado através do cometa neutro nas diferentes estruturas cerebrais. Barra preta representa os animais expostos ao etanol, e a barra branca representa os animais controles.

A formação de EROs também está associada com a citotoxicidade do etanol e pode estar diretamente ligada a quebras na molécula de DNA (Kasai, 1997). Neste trabalho investigamos a formação de EROs, especialmente peróxidos e espécies reativas de nitrogênio, utilizando a sonda fluorescente DCF. Nossos resultados demonstram um aumento na formação de EROs nas diferentes regiões cerebrais dos animais tratados com etanol em relação aos controles, exceto no hipocampo em que não houve diferença estatística (Figura 3).

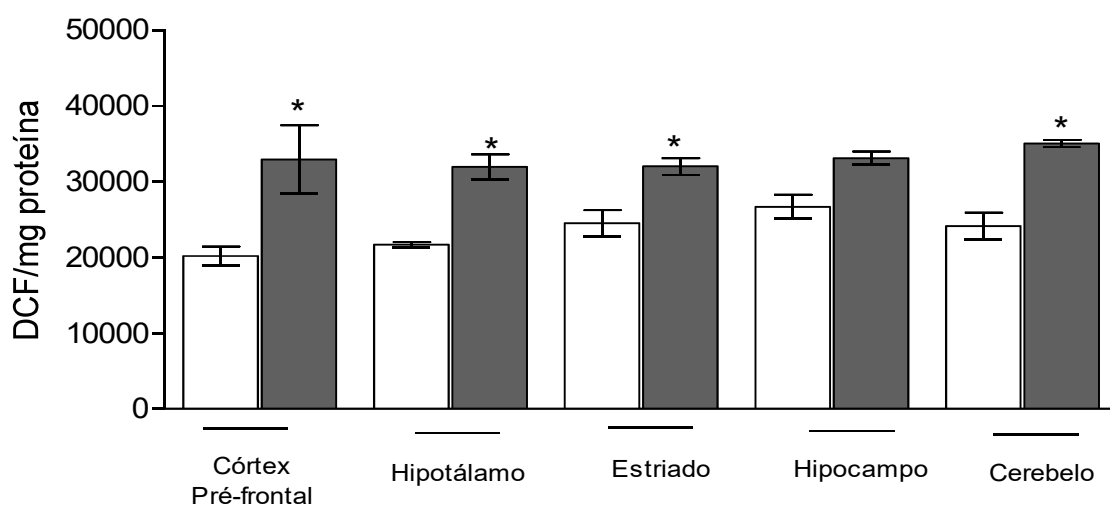


Figura 3 – Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em diferentes estruturas cerebrais. Barra preta representa os animais expostos ao etanol, e a barra branca representa os animais controles. * $P < 0,05$ comparados aos controles.

O cérebro é um dos principais alvos do etanol. Em alcoolistas adultos, o dano no cérebro é caracterizado por atrofia cerebral e cerebelar, assim como prejuízos no hipocampo e córtex pré-frontal (Harper, 1998; Bleich et al., 2003). Guo e colaboradores (2007) relataram que a exposição de álcool em camundongos causou dano no DNA em diferentes regiões cerebrais como no cerebelo e hipocampo (após administrações aguda e crônica) e ainda no hipotálamo e córtex cerebral (após administração crônica), e já no estriado não houve diferença significativa. Estes autores sugerem que o dano oxidativo no DNA causado pelo etanol pode ser região-específico no cérebro, entretanto nossos resultados comprovam que a exposição crônica de álcool em ratos lesionou o DNA de todas as estruturas analisadas, inclusive no estriado.

Em estudo com humanos, há relação entre a síntese de EROs com o estresse psicológico, mostrando a associação entre o dano oxidativo e emoções negativas, como a ansiedade e depressão (Irie et al., 2001). Já se sabe que a exposição ao estresse e aumento de ansiedade promovem alterações neuronais, como apoptose, alterações morfológicas e aumento do estresse oxidativo (Joëls et al., 2007). Além disso, a exposição a eventos estressores promove também prejuízo da neurotransmissão serotoninérgica hipocampal e estas alterações parecem estar envolvidas na mediação de consequências comportamentais do estresse como, por exemplo, a depressão (Mcewen, 2005). Entretanto, as lesões no DNA de células cerebrais associadas a alterações comportamentais tipo ansiedade e depressão, na

abstinência ao álcool, ainda são pouco relacionadas na literatura, sendo necessários mais estudos que verifiquem os mecanismos principais destas mudanças comportamentais.

4. Conclusão

Nossos resultados reforçam dados prévios de que o etanol induz neurotoxicidade e que isto pode estar relacionado com formação de quebras na molécula de DNA, mediadas pela formação de espécies reativas de oxigênio. Adicionalmente, neste trabalho demonstramos que danos no DNA não são região-específicos e ocorrem igualmente em diferentes estruturas cerebrais após a exposição crônica de baixas doses de etanol.

Referências

Arendt T. **Impairment in memory function and neurodegenerative changes in the cholinergic basal forebrain system induced by chronic intake of ethanol.** J Neural Transm Suppl. 1994; 44:173–87.

Azqueta A, Collins AR. **The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair.** Arch Toxicol. 2013 Jun;87(6):949-68

Bleich S, Wilhelm J, Graesel E, Degner D, Sperling W, Rössner V, Javaheripour K, Kornhuber J. **Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with hippocampal volume reduction in females with alcoholism.** J Neural Transm. 2003; 110:401–11.

Brooks PJ. **DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity.** Alcohol Clin Exp Res. 1997; 21:1073–82.

Brooks PJ. **Brain atrophy and neuronal loss in alcoholism: a role for DNA damage?** Neurochem Int. 2000; 37:403–12.

Burlinson B. **The in vitro and in vivo comet assays.** Methods Mol Biol. 2012;817:143-63.

Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. **2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy.** Free Radic Res. 2010 Jun;44 (6):587-604.

Collins AR. 2014. **Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay.** Biochim Biophys Acta. 2014 Feb;1840 (2):794-800.

Deng XS, Deitrich RA. **Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction.** Curr Drug Abuse Rev. 2008; 1:3–8.

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

Harper C, Matsumoto I. **Ethanol and brain damage.** Curr Opin Pharmacol. 2005; 5:73–8.

Joshi DC, Bakowska JC. **Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons.** J Vis Exp. 2011, May 23;(51).

Joëls M., Karst H., Krugers H.J., Lucassen P.J. **Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis.** Frontiers in Neuroendocrinology 2007; 28:72–96.

Kasai H. **Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis.** Mutat Res. 1997; 387:147–63.

Kotova N, Vare D, Schultz N, Gradecka Meesters D, Stepnik M, Grawé J, Helleday T, Jenssen D. **Genotoxicity of alcohol is linked to DNA replication-associated damage and homologous recombination repair.** Carcinogenesis. 2013 Feb;34(2):325-30.

Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L, D'Souza DC. **N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability.** Pharmacol Ther. 2003; 99:79–4.

McEwen B.S. **Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain.** Metabolism Clinical and Experimental 2005; 54:20-23.

Östling, O., Johanson, K. J. **Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 123, p. 291–298, 1984.

Rulten SL, Hodder E, Ripley TL, Stephens DN, Mayne LV. **Alcohol induces DNA damage and the Fanconi anemia D2 protein implicating FANCD2 in the DNA damage response pathways in brain.** *Alcohol Clin Exp Res.* 2008 Jul;32(7):1186-96.

Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K. **Progression of alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress.** *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011; 26:30–46.

Seitz HK, Stickel F. **Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis.** *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:599–612.

Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. **A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells.** *Exp. Cell Res*, v. 175, p. 184–191, 1988.

Young C, Klocke BJ, Tenkova T, Choi J, Labruyere J, Qin YQ, Holtzman DM, Roth KA, Olney JW. **Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain.** *Cell Death Differ.* 2003 Oct;10 (10):1148-55.

Anexo 2 – Normas da revista:

Alcoholism: Clinical and Experimental Research

Edited By: Harriet de Wit, Interim Editor

Impact Factor: 3.421

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 3/16 (Substance Abuse)

Preparation of Manuscript – 4500 words total

Please ensure that all text (including abstract, body of manuscript, figure legends, and references) is submitted as double-spaced type. **We also require all text be line-numbered.** Manuscripts that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review.

Title page:

The title page should include:

- The complete manuscript title
- The full names of all authors, their highest academic degrees, and affiliations
- Name and address for correspondence, including fax number, telephone number, and e-mail address
- All sources of support, including pharmaceutical and industry support, that require acknowledgement

Manuscripts that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review.

Structured abstract and key words: The article should be briefly summarized or abstracted in a short paragraph (approximately 300 words) at the beginning of the text on a separate page. It should contain 4 elements labeled: Background, Methods, Results, and Conclusions. At the end of the paragraph, provide no more than 5 key words or phrases.

Search Engine Optimization: Driving usage and readership is critically important to raising the visibility of your published research. One of the key factors in sustaining long-term usage is through search engine optimization (SEO). Below is a list of suggested ways of maximizing your SEO.

1. Make sure your article title is SEO-friendly. It should be descriptive, and it must include a key phrase from your topic. Key words should appear within the title's first 65 characters.
2. Provide up to five key words or phrases in the keyword field.
3. Be sure your key words and phrases appear in your abstract several times, but don't go overboard or the search engine may kick you out.
4. When referencing authors, be consistent. Use their names as they generally appear in past online publications.
5. When appropriate, use your key words in article section headings.

Remember: They can't read it if they can't find it!

For more detailed information on SEO, including helpful examples, go to <http://authorservices.wiley.com/bauthor/seo.asp>.

Text: Organize the manuscript into four main headings: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. Define abbreviations at first mention in text and in each table and figure. If a brand name is cited, supply the manufacturer's name and address (city and state/country).

Abbreviations: For a list of standard abbreviations, consult the Council of Biology Editors Style Guide (available from the Council of Science Editors, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814) or other standard sources. Write out the full term for each abbreviation at its first use unless it is a standard unit of measure.

References: The authors are responsible for the accuracy and completeness of information contained in the references. The journal uses **Harvard Style for Referencing**.

-Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Several publications by the same author or group should be listed in chronological order; those that appeared in the same year should be distinguished by a,b,c, etc. Where there are two authors, both should be named, but with three or more only the first author's name plus "et al." should be given.

-Reference List

The list of references should only include works that are cited in the text and have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. References should be compiled (**double-spaced**) at the end of the article in alphabetical order. Identify multiple authors published in the same year with an a,b,c, etc. after the year. In-text citations should be listed by author name(s) and year of publication in parentheses.

Journal article, list all authors

1. Aragon CMG, Spivak K, Amit Z (1991a) Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced narcosis, lethality and hypothermia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 39:55-59.
- Aragon CMG, Stotland LM, Amit Z (1991b) Studies on ethanol-brain catalase interaction: evidence for central ethanol oxidation. *Alcohol Clin Exp Res* 15:165-169.

Book chapter

2. Holtzman SG (1990) Discriminative stimulus effects of drugs: relationship to potential for abuse, in *Modern Methods in Pharmacology*, Vol. 6, Testing and Evaluation of Drugs of Abuse (Adler M, Cowan A eds), pp 193-210. Wiley-Liss, New York.

Entire book

3. Julien RM (1985) *A Primer of Drug Action*. 4th ed. WH Freeman, New York.

Software

4. Epi Info [computer program]. Version 6. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

Online journals

5. Friedman SA. Preeclampsia: a review of the role of prostaglandins. *Obstet Gynecol* [serial online]. January 1988;71:22-37. Available from: BRS Information Technologies, McLean, VA. Accessed December 15, 1990.

Database

6. CANCERNET-PDQ [database online]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 1996. Updated March 29, 1996.

World Wide Web

7. Gostin LO. Drug use and HIV/AIDS [JAMA HIV/AIDS Web site]. June 1, 1996. Available at: <http://www.ama-assn.org/special/hiv/ethics>. Accessed June 26, 1997.

Figures: There are three preferred formats for digital artwork submission: Encapsulated PostScript (EPS), Portable Document Format (PDF), and Tagged Image Format (TIFF). We suggest that line art be saved as EPS files. Alternately, these may be saved as PDF files at 600 dots per inch (dpi) or better at final size. Tone art, or photographic images, should be saved as TIFF files with a resolution of 300 dpi at final size. For combination figures, or artwork that contains both photographs and labeling, we recommend saving figures as EPS files, or as PDF files with a resolution of 600 dpi or better at final size. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp> Each figure should be submitted individually - one file per figure.

Figure legends: Include legends for all figures. They should be brief and specific, and they should appear on a separate manuscript page after the references. Use scale markers in the image for electron micrographs, and indicate the type of stain used.

Tables: Create tables using the table creating and editing feature of your word processing software (eg, Word, WordPerfect). Do not use Excel or comparable spreadsheet programs. Each table should include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviations used). Tables should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text. Cite tables consecutively in the text, and number them in that order. Tables may be submitted at the end of the manuscript text file. Table legends should appear on a separate page, labeled 'Table Legends'.

Supplementary material: If you have supplementary information that you would like to link to your submission, please read the following instructions:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>

Style: Pattern manuscript style after the *American Medical Association Manual of Style* (10th edition). *Stedman's Medical Dictionary* (28th edition) and *Merriam Webster's Collegiate Dictionary* (11th edition) should be used as standard references. Refer to drugs and therapeutic agents by their accepted generic or chemical names, and do not abbreviate them. Use code numbers only when a generic name is not yet available. In that case, supply the chemical name and a figure giving the chemical structure of the drug. Capitalize the trade names of drugs and place them in parentheses after the generic names. To comply with trademark law, include the name and location (city and state in USA; city and country outside USA) of the manufacturer of any drug, supply, or equipment mentioned in the manuscript. Use the metric system to express units of measure and degrees Celsius to express temperatures. Please submit all text (including abstract, figures, legends, and references) as double-spaced.

Manuscript Revisions

All manuscript revisions should be submitted online within three months following the editor's decision. If this is not enough time in which to make your revisions, please contact the Editorial Office for an extension. If you do not

request an extension and your revisions are not submitted within six months, your manuscript will be withdrawn by the editorial office. At that point, any further work by you will be considered as a new submission.

After Acceptance

Author Services: Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Page proofs and corrections: Corresponding authors will receive electronic page proofs to check the copyedited and typeset article before publication. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (eg, reprint order form) will be sent to the corresponding author by e-mail. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading and printing the files and for faxing the corrected page proofs to the publisher. It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Changes that have been made to conform to journal style will stand if they do not alter the authors' meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content will be made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material will be disallowed. The publisher reserves the right to deny any changes that do not affect the accuracy of the content. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and corrections faxed within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the cover letter accompanying the page proofs.

Offprints: Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Wiley-Blackwell's Author Services. Please register to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> to register.

If you wish to order reprints from this journal please click on the following link:

<https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=ACER>

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

- Título** Adequado Comentários
- Introdução** Adequada Comentários
- Objetivos** Adequados Comentários
- Relevância e Justificativa** Adequados Comentários
- Materiais e Métodos** Adequados Comentários
- Cronograma para execução da pesquisa** Adequado Comentários
- Orçamento e fonte financiadora** Adequados Comentários
- Referências Bibliográficas** Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C D E

Justifique:

Utilização de procedimentos que causam mínimo de dor ou estresse, de curta duração.

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não
Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não
Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório): Farmacologia- UFCSPA
 Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
	Wistar	machos	72

12) RECOMENDAÇÃO:

- Aprovado
- Com Pendência
- Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

Todas as alterações e questões apontadas na primeira avaliação foram respondidas adequadamente. Projeto Aprovado