View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Repositório Institucional da UFSC

TATIANE TERU TAKAHASHI

AVALIAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS PREDITIVOS DE TRANSIÇÃO À DEPENDÊNCIA EM RATOS EXPOSTOS À ASSOCIAÇÃO ETANOL E ENERGÉTICO

Florianópolis
2014

ERRATA

TAKAHASHI, Tatiane Teru. **Avaliação dos comportamentos preditivos de transição à dependência em ratos expostos à associação etanol e energético**. Florianópolis, 2014.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
78	34	Behavioural Brain Research	Behav Brain Res
79	11	Journal of Gambling Studies	J Gambling Studies
79	18	Alcoholism, clinical and experimental research	Alcohol Clin Exp Res
80	3	PNAS	Proc Natl Acad Sci
81	8	Drug and Alcohol Dependence	Drug Alcohol Depend
81	35	Physiology & Behavior	Physiol Behav.
82	3	Pharmacology Biochemistry and Behavior	Pharmacol Biochem Behav.
82	13	British Journal of Pharmacology	Br J Pharmacol
82	26	Journal of Caffeine Research	J Caf Res
83	7	Behavioural Brain Research	Behav Brain Res.
83	10	Journal of Affective Disorders	J Affect Disord.
83	22	European Journal of Neuroscience	Eur J Neurosci
83	26	Addiction Biology	Addict Biol
83	31	Journal of Alzheimer´s Disease	J Alzheimers Dis
84	14	Physiology & Behaviour	Physiol Behav
84	30	Journal of Neurochemistry	J Neurochem
84	39	British Journal of Pharmacology	Br J Pharmacol.
85	8	PNAS	Proc Natl Acad Sci
85	34	Current Opinion in Pharmacology	Curr Opin Pharmacol.
86	21	Pharmacology Biochemistry and Behavior	Pharmacol Biochem Behav
87	36	Pharmacology Biochemistry and Behavior	Pharmacol Biochem Behav
88	24	Addiction Biology	Addict Biol
88	36	Pharmacology & Therapeutics	Pharmacol Ther
89	22	The Journal of Neuroscience	J Neurosci.
90	32	Alcohol Alcoholism	Alcohol Alcohol.
93	24	Alcohol Alcoholism	Alcohol Alcohol.
93	35	Behavioural Brain Research	Behav Brain Res
94	41	Addiction Biology	Addict Biol
96	30	Addictive Behaviors	Addict Behav
98	2	Journal of Biomedical Science	J Biomed Sci.
98	23	Pharmacology Biochemistry and Behavior	Pharmacol Biochem Behav.

TATIANE TERU TAKAHASHI

AVALIAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS PREDITIVOS DE TRANSIÇÃO À DEPENDÊNCIA EM RATOS EXPOSTOS À ASSOCIAÇÃO ETANOL E ENERGÉTICO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Takahashi, Tatiane Teru
Avaliação dos comportamentos preditivos de transição à dependência em ratos expostos à associação etanol e energético / Tatiane Teru Takahashi ; orientador, Reinaldo Naoto Takahashi - Florianópolis, SC, 2014.
94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Psicofarmacologia. 3. Dependência de drogas. 4. Etanol. 5. Energético. I. Takahashi, Reinaldo Naoto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

"Avaliação dos comportamentos preditivos à transição a dependência de ratos expostos à associação etanol e energético"

por

Tatiane Teru Takahashi

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 04/PPGFMC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:

Prof(a). Dr(a). Reinaldo Naoto Takahashi
(Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a). Rosana Camarini (Dpto. de Farmacologia/ICB/USP)

Prof(a). Dr(a). Geison Souza Izídio (BEG/CCB/UFSC)

Prof(a). Dr(a). Rui Daniel Schroder Prediger (FMC/CCB/UFSC)

Coordenadora:

Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 07 de fevereiro de 2014.

"Strive not to be a success, but rather to be of value."
Albert Einstein

"Twenty years from now you will be more disappointed by the things that you didn´t do than by the ones you did do, so throw off the bowlines, sail away from safe harbour, catch the trade winds in your sails. Explore, Dream, Discover."
Mark Twain

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e por permitir terminar este mestrado com o quebra-cabeça se encaixando no final das contas.

Ao professor Reinaldo N. Takahashi, por ter aceitado me orientar quando já estava com outros planos de vida. Agradeço pela liberdade de criar, crescer e amadurecer meu próprio eu científico. Sou grata também por fazer parte da história de um laboratório onde muitos nomes são importantes para a sociedade científica e pelas colaborações que pude realizar com esses pesquisadores.

Ao Leandro F. Vendruscolo, por todo o apoio no desenho experimental, esclarecimentos e incentivo, até mesmo durante o período de férias! Sou extremamente grata por todos os conselhos, sugestões e direções durante o mestrado. Admiro muito seu trabalho e espero manter sua amizade com muitas colaborações de sucesso no futuro.

À professora Thereza C. M. de Lima e aos professores Geison S. Izídio e Anicleto Poli, pelo apoio, conversas e por terem sido um refrigério em muitos momentos difíceis dessa caminhada.

Ao professor Leandro J. Bertoglio e alunos de seu laboratório, por permitir participar de seus seminários e pelos conhecimentos compartilhados durante todo o mestrado.

Aos colegas de laboratório Lívia, Marília, Cristiane, Jéssica e Rafael pela amizade e pelas conversas científicas e não-científicas. Agradeço por deixar o ambiente de trabalho menos sério, mais alegre e espontâneo.

Aos amigos e colegas da pós, Pablinny, Alanny, Ana Paula, Karina, Claudini, Flora, Renata, Leo, Vagner, Filipe, Paulo, Josiel, pessoal do lab. do prof. Leandro e do prof. Pádua, Lenyta, Stef, Ale, Taci e tantos outros por terem compartilhado momentos, risadas, ensinamentos, sugestões, almoços e amizade.

Aos meus pais, Maria e Masateru, e meu irmão, Rodrigo, por acreditar e sempre incentivar a ir mais longe, por seu amor incondicional, por permitir explorar o mundo a minha maneira, por me ensinar a amar as pequenas coisas da vida e usar a inteligência no dia-a-dia, por inserir em

mim valores de vida construído em rocha firme, por serem meus exemplos de vida.

Ao meu namorado, Hungyen Lin, pelo incentivo, apoio, orientação, advertências e muita paciência durante o mestrado. Sou grata por me ensinar a ser uma cientista e profissional melhor, pelo companheirismo e cumplicidade apesar da distância, pelo amor e carinho todo o tempo.

Aos meus amigos externos, Celso e Lucy Ishida, pela amizade, cumplicidade, apoio e paciência ao longo de tantos anos. Sou grata por me ouvir e me entender em diversas situações.

A família Toriy, por me acolher nesses dois anos, por ser minha família nesta cidade linda, cheia de encantos e belezas naturais. Sou grata por todas as caronas, saídas, festas, surpresas e comidinhas gostosas!

Aos funcionários do biotério setorial, pelo cuidado dos animais, e a todos os funcionários da ufsc, desde a secretaria, limpeza e outros.

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro.

RESUMO

O consumo da associação de etanol (EtOH) e energético (EN) tornou-se uma tendência entre os jovens nos últimos anos e popularizou um padrão de consumo chamado binge ou ´porre´. Evidências sugerem que o binge pode facilitar a transição para a dependência, no entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da associação EtOH+EN na transição para o alcoolismo. Por esse motivo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição repetida da associação de EtOH e EN nos comportamentos preditivos de transição ao alcoolismo em modelos animais. Inicialmente, ratos Wistar adultos foram submetidos ao protocolo de livre-escolha entre duas garrafas, no qual grupos independentes de animais tinham acesso contínuo (24 h/todos os dias) ou intermitente (24 h/dias alternados) a EtOH ou a associação EtOH+EN durante 26 dias. Os grupos desse tratamento foram: EtOH contínuo (EtOH_cont) ou intermitente (EtOH_int), EtOH+EN contínuo (EtOH+EN_cont) ou intermitente (EtOH+EN_int) e controle. Foi avaliada a atividade locomotora basal dos animais durante o tratamento e os seguintes comportamentos durante a abstinência: busca pela novidade (BN), efeitos de privação ao EtOH, comportamento tipo-ansiedade e a função cognitiva através da tarefa de reconhecimento de objetos (RO). Os resultados mostraram que os animais previamente expostos a EtOH+EN consumiram maiores quantidades de EtOH, comparados com o grupo controle (EtOH). Apenas os grupos cuja exposição foi intermitente apresentaram alteração significativa do comportamento de BN. A exposição a EN preveniu os efeitos de privação ao etanol somente nos ratos expostos ao regime contínuo. Não houve diferença nos comportamentos locomotor, do tipo-ansiedade e cognitivo entre os grupos avaliados. Adicionalmente, outros grupos experimentais (EtOH, EtOH+EN, EN e controle) foram expostos a EtOH (3,4 g/kg/dia) e/ou EN (10,71 ml/kg/dia), via gavagem (i.g.), por 6 dias consecutivos. A locomoção dos animais foi avaliada nos dias 1 e 6 do tratamento e, durante a abstinência, foram realizadas os testes de RO, discriminação social (DS), e preferência condicionada ao lugar (PCL). A pré-exposição a EtOH+EN facilitou a resposta na PCL, mostrando que essa associação pode aumentar a motivação na busca pela droga e os efeitos reforçadores da mesma. No dia 1, o grupo EtOH+EN apresentou hiperlocomoção comparado ao grupo controle, enquanto o grupo EtOH, uma hipolocomoção. No dia 6 de tratamento, ambos os grupos apresentaram atenuação desses efeitos. Nos testes cognitivos, os grupos EtOH e EtOH+EN apresentaram prejuízo

cognitivo em ambos os testes de memória (RO e DS), mostrando que EN não preveniu danos cognitivos. Dessa forma, concluímos que a associação EtOH+EN pode favorecer a transição à dependência pela facilitação do efeito de recompensa do EtOH.

Palavras-chave: Energético, etanol, dependência, ratos.

ABSTRACT

Consumption of ethanol (EtOH) and energy drink (EN) has become popular among youth in recent years and it has been proposed that this association may increase binge drinking. Several pieces of evidence have shown that binge drinking may facilitate the transition to addiction. However, little is known about the effects of this association in the development of alcoholism. For this reason, the aim of this study is to examine the effects of repeated EtOH+EN exposure on predictive behaviors for the transition to alcoholism in animal models Initially, male adult Wistar rats were submitted to a two-bottle choice paradigm, in which independent groups were given continuous (24 h/every day) or intermittent (24h /every other day) access to EtOH or EtOH+EN for 26 days. Therefore, the experimental groups were: EtOH continuous (EtOH_cont) or intermittent (EtOH_int), EtOH+EN continuous (EtOH+EN_cont) or intermittent (EtOH+EN_int) and control. Locomotor activity was monitored during the treatment and the following behaviors were assessed during withdrawal: novelty-seeking (BN), EtOH deprivation effects, anxiety-like behavior and short-term memory using the Object Recognition test (RO). Our results showed that animals pre-exposed to EN increased EtOH consumption compared to the control group (EtOH group). Both intermittent groups showed higher NS behavior. EN prevented the EtOH deprivation effects only in the continuous group. There were no changes in locomotion, anxiety-like behavior and cognitive function among groups. Additionally, other experimental groups were exposed to EtOH (3.4 g/kg/day) and/or EN (10.71 ml/kg/day) for 6 consecutive days (i.e., EtOH+EN, EtOH, EN and control). Locomotor activity was assessed on day 1 and 6 during the treatment and the following behaviors were evaluated during abstinence: short-term memory and conditioned place preference (CPP). Pre-exposition to EtOH+EN facilitated CPP response, showing that this association may increase drug-seeking behavior and the reinforcing effects of EtOH. On day 1 of treatment, EtOH+EN group showed hyperlocomotion compared to control group, whereas EtOH group showed hypolocomotion. On day 6, both groups showed tolerance to those effects. In the cognitive tests, EtOH and EtOH+EN showed memory deficit. Therefore, the association of EtOH and EN might facilitate the transition to alcoholism by increasing the reinforcing effects of alcohol.

Keywords: Energy drink, ethanol, addiction, rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico no encéfalo humano. 33
Figura 2. Monitor de atividades 43
Figura 3. Labirinto em cruz elevado 44
Figura 4. Campo aberto 46
Figura 5. Objetos do teste de reconhecimento de objetos 46
Figura 6. Desenho experimental do consumo voluntário.. 47
Figura 7. Preferência condicionada de lugar 50
Figura 8. Desenho experimental do tratamento via gavagem. 50
Figura 9. Consumo voluntário de EtOH de animais expostos ao regime contínuo ou intermitente de EtOH ou EtOH+ENp durante durante 26 dias. 52
Figura 10. Peso dos animais ao longo do consumo livre-escolha de EtOH ou EtOH+ENp. 53
Figura 11. Consumo total de etanol após 26 dias de livre-escolha 54
Figura 12. Atividade locomotora dos animais expostos a EtOH ou EtOH+ENp ao longo de 26 dias de consumo livre-escolha 56
Figura 13. Memória de curta duração avaliada no teste de reconhecimento de objetos após 3 dias de abstinência do consumo voluntário de EtOH ou EtOH+ENp por 26 dias. 58
Figura 14. Comportamento de busca pela novidade após 5 dias de abstinência do consumo voluntário de EtOH ou EtOH+ENp por 26 dias. 59
Figura 15. Efeitos de privação ao EtOH após 7 dias de privação do consumo voluntário de EtOH ou EtOH+ENp por 26 dias. 60
Figura 16. Atividade locomotora de animais submetidos à administração aguda e repetida de EtOH e/ou EN via gavagem 61
Figura 17. Memória de curta duração avaliada no teste de reconhecimento de objetos após 3 dias do fim das administrações via gavagem. 63
Figura 18. Memória de curta duração avaliada pelo teste de discriminação social após 3 dias do fim do tratamento via gavagem.. 63
Figura 19. Efeitos reforçadores de EtOH avaliado no teste da PCL em ratos previamente tratados com EtOH e/ou EN via gavagem.. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos principais sistemas de neurotransmissores envolvidos nos efeitos do EtOH 32
Tabela 2. Grupos do protocolo consumo voluntário 42
Tabela 3. Consumo total médio dos componentes de ENp 53
Tabela 4. Dados da avaliação do comportamento tipo-ansiedade.....57
Tabela 5: Dose diária administrada de cada componente do energético 62
Tabela 6. Resumo de experimentos e resultados 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. - Antes de Cristo
ADH - Álcool desidrogenase
AMY - Amigdala
ANOVA - Análise de variância
CA - Campo aberto
CEUA - Comitê de ética no uso de animais
CID - Classificação internacional de drogas
CRF - Fator liberador de corticotrofina
c.v. - Consume voluntário
CYP2E1 - Citocromo P450, subtipo 2E1
DA - Dopamina
DS - Discriminação social
DSM - Manual estatístico e de diagnóstico de doenças mentais
DYN - Dinorfina
E.P.M. - Erro padrão da média
EN - Energético
ENK - Encefalinas
EtOH - Etanol
FAEE - Ácido graxo étil éster sintetase
FDA - Agência reguladora de drogas e alimentos
Fig. - Figura
GABA - Ácido gama-aminobutírico
GIRK - Canais de potássio corretores de fluxo de internalização acoplados a proteína G
Gly - Glicina
HIP - Hipocampo
HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal
i.g. - Intragástrico
INPAD - Instituto nacional de políticas públicas do álcool e outras drogas
i.p. - Intraperitoneal
IP - Fosfatidil inositol
KOR - Receptores kappa-opióide
LCE - Labirinto em cruz elevado
LENAD - Levantamento nacional de álcool e drogas
LTP - Potenciação de longa duração
MOR - Receptor mi-opióide
NAc - Núcleo acumbens
nAChR - Receptores nicotínicos de acetilcolina

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NS - Busca por novidade
OMS - Organização mundial da saúde
PCL - Preferência condicionada de lugar
PFC - Cortex pré-frontal
PKC - Fosfoquinase C
RO - Reconhecimento de objetos
SNC - Sistema nervoso central
Tau - Taurina
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo
βEND - Beta-endorfinas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....27
1.1 EFEITOS DO ETANOL.....28
1.2 MECANISMO DE AÇÃO.....29
1.3 SISTEMA DE RECOMPENSA.....32
1.4 *BINGE DRINKING* OU BEBER PESADO EPISÓDICO.....34
1.5 ENERGÉTICOS.....36
2 OBJETIVOS.....40
2.1 Objetivo Geral.....40
2.2 Objetivos Específicos.....40
3 MATERIAL E MÉTODOS.....41
3.1 ANIMAIS.....41
3.2 CONSUMO VOLUNTÁRIO DE EtOH OU EtOH+ENp.....41
3.3 ATIVIDADE LOCOMOTORA.....43
3.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....43
3.5 RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....44
3.6 BUSCA PELA NOVIDADE.....46
3.7 EFEITOS DE PRIVAÇÃO AO ETANOL.....47
3.8 TRATAMENTO INTRAGÁSTRICO (GAVAGEM).....48
3.9 DISCRIMINAÇÃO SOCIAL.....48
3.10 PREFERÊNCIA CONDICIONADA DE LUGAR.....49
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....51
4 RESULTADOS.....52
4.1 CONSUMO VOLUNTÁRIO.....52
4.1.1 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente sobre o consumo de EtOH.....52
4.1.2 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente sobre o consumo total de EtOH.....54
4.1.3 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente no comportamento locomotor dos animais.....55

4.1.4 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente no comportamento tipo-ansiedade avaliado após 24h de abstinência.....56
4.1.5 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente sobre a função cognitiva avaliada no período de abstinência.....57
4.1.6 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente sobre o comportamento de busca pela novidade no período de abstinência.....58
4.1.7 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente sobre os efeitos de privação a etanol avaliado durante o período de abstinência.....59
4.2 TRATAMENTO INTRAGÁSTRICO (I.G.).....60
4.2.1 Avaliação da atividade locomotora após administração intragástrica aguda e repetida da associação de EtOH e EM.....60
4.2.2 Avaliação da função cognitiva após administração intragástrica repetida da associação EtOH e EM.....62
4.2.3 Avaliação dos efeitos reforçadores de etanol após administração intragástrica repetida da associação de EtOH e EM.....64
5 DISCUSSÃO.....66
6 CONCLUSÕES.....77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……...78

1 INTRODUÇÃO

O consumo de álcool ou etanol[1] (EtOH) ocasional ou crônico por mamíferos e outras espécies, como algumas moscas de frutas, é uma prática moldada há milhares de anos. Registros arqueológicos revelam que os primeiros indícios sobre o consumo de EtOH pelo ser humano datam aproximadamente 10.000 anos a.C. (HANSON, 1995). Nessa época, o EtOH era obtido através da fermentação natural de produtos vegetais ricos em açúcar, como as frutas, néctar e seiva (SPANAGEL, 2009). Portanto, o conteúdo alcoólico era relativamente baixo, como o vinho e a cerveja (graduação alcoólica entre 4 e 12%). Foi a partir do século XV que os destilados (graduação alcoólica de ~ 40%) começaram a se tornar populares no mercado. O primeiro documento de produção de vodka na Rússia data final do século IX e o uísque, por volta do ano de 1400 na Irlanda. Em 1690, o governo britânico promulgou uma lei encorajando o consumo dessas bebidas, gerando um aumento da produção de 0,5 milhão de galões em 1685 para 5 milhões em 1727 e 18 milhões no início do século XIX (GOODMAN & GILMORE, 2011; MCKEE, 1999).

Atualmente, os perigos do consumo excessivo de EtOH são reconhecidos pelas etnias do mundo inteiro e a dependência e/ou o uso abusivo de EtOH tornaram-se um dos problemas de saúde pública mais custosos e graves da atualidade (HARPER & MATSUMOTO, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 76,3 milhões de pessoas apresentam algum distúrbio no consumo de EtOH e cerca de 2,5 milhões morrem anualmente por causas relacionadas ao uso excessivo dessa bebida. Desses, 320.000 são jovens de 15 a 29 anos, representando 9 % de todas as mortes nessa faixa etária (OMS, 2011).

No Brasil, esse cenário não é diferente. Um estudo recente realizado pela INPAD (Instituto Nacional de Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas) da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo) mostrou que a taxa de consumidores frequentes (aqueles que consomem EtOH pelo menos uma vez por semana) subiu de 45 para 54%, e o consumo binge (intoxicação por EtOH em um período de até 2 h), de 45% para 59% na população de bebedores, entre os anos de 2006 e 2012 (LENAD, 2012).

---

[1] Os termos álcool e etanol serão usados como sinônimos neste trabalho

1.1 EFEITOS DO ETANOL

O EtOH é considerado uma droga psicotrópica hipnótica-sedativa que produz efeitos comportamentais de forma dose-dependente. Em baixas concentrações no sangue (0,01 a 0,05 g%) produz desinibição e redução da tensão. Em concentrações moderadas (0,08 a 0,10 g%) a oscilação de humor se torna mais pronunciada, com euforia. A alcoolemia de 0,08 g% produz prejuízos distintos de julgamento e função motora. Em níveis maiores (0,15 a 0,20 g%) há presença de uma ataxia marcante, uma fala arrastada e prejuízo no tempo de reação. Considera-se a dose letal (DL50) uma alcoolemia de 0,40 a 0,50 g% em indivíduos não-dependentes (KOOB & LE MOAL, 2006).

Devido a sua fórmula molecular simples (C2H6O) e características químicas, o EtOH é rapidamente absorvido pelo estômago e intestino delgado. O pico plasmático é alcançado aproximadamente 30 min após a ingestão oral, sem alimento no estômago. Seu metabolismo ocorre primariamente no fígado, através de três vias enzimáticas principais: a álcool desidrogenase (ADH), o sistema de oxidação citocromo P450E1 (CYP2E1), e o ácido graxo etil éster sintetase (FAEE).

A ADH é predominantemente expressa no fígado, onde ocorre a maioria da oxidação de EtOH consumido. Essa enzima transforma EtOH para acetaldeído, reduzindo simultaneamente NAD^+ para NADH. Essa etapa é também considerada uma etapa limitante do metabolismo de EtOH, uma vez que são necessários 2 mols de NAD^+ para metabolização de 1 mol de EtOH, o qual corresponde a metabolização de 8 g de EtOH por hora em um adulto saudável de 70 kg. Em seguida, o acetaldeído é metabolizado para ácido acético, através da enzima aldeído desidrogenase (NAGY, 2004). Ambas as enzimas apresentam variações genéticas que alteram o metabolismo do álcool e a susceptibilidade para seus efeitos. Isso corresponde a cerca de 30 a 45 % dos asiáticos, 50 a 90 % dos russos e judeus, e menos de 10 % dos europeus (EDENBERG et al., 2006).

A segunda maior via de metabolização de EtOH é pela indução enzimática de CYP2E1. A atividade desta via ocorre durante o consumo de altas concentrações de EtOH ou em alcoolistas crônicos. Essa via também parece contribuir para a tolerância metabólica ao EtOH por aumentar a excreção renal de seus substratos pela urina. Além disso, a produção de diversas espécies reativas de oxigênio resultante da

metabolização dessa via podem contribuir com os danos hepáticos causados por essa bebida (NAGY, 2004).

A terceira via ocorre pela FAEE, que leva a formação de ácidos graxos. A concentração de FAEE é alta em órgãos susceptíveis aos efeitos tóxicos de EtOH, incluindo pâncreas e fígado, e exerce um impacto negativo na atividade de mitocôndrias e lisossomos (NAGY, 2004).

Apenas cerca de 5 a 10% de EtOH é excretada de forma inalterada pelos pulmões ou pela urina (GOLDBERG, 1943).

1.2 MECANISMO DE AÇÃO

No sistema nervoso central (SNC), o EtOH atua em diversos receptores e sinapses neuronais (SPANAGEL, 2009; BERRY & PENTREATH, 1980). Após a administração aguda dessa droga, ocorre um aumento da inibição mediada pelos neurotransmissores GABA e glicina (Gly). Ocorre também uma inibição da entrada de Ca^{2+} pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, a ativação de alguns tipos de canais de K^{+}, a inibição dos receptores ionotrópicos de glutamato e a inibição do transporte de adenosina (HARRIS et al., 2008; TABAKOFF & HOFFMAN, 1996; LOVINGER, 1997).

O EtOH facilita a abertura dos canais de cloreto e aumenta a ação de GABA nos receptores $GABA_A$, semelhante aos benzodiazepínicos. Dessa forma, o agonista inverso dos receptores benzodiazepínicos flumazenil é capaz de reverter alguns dos efeitos depressores centrais de EtOH de forma não competitiva na interação com o receptor $GABA_A$. O EtOH, assim como a taurina e a β-alanina, parece também ativar os receptores de glicina (GlyR) possivelmente pela interação do EtOH com a subunidade α1 desse receptor mediado pela ativação de fosfoquinase C. O resultado dessa ativação é o aumento da liberação de dopamina (DA) no núcleo accumbens (NAc). A taurina, particularmente, parece aumentar a liberação de DA pela ativação simultânea de GlyR e dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (ERICSSON et al., 2010, 2006; MOLANDER & SÖDERPALM, 2005; LOBO et al., 2004). Os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) expressam diversas subunidades de nAChR e sua ativação aumenta a taxa de disparo dos neurônios dopaminérgicos, principalmente da região posterior de VTA, os quais conectam-se ao NAc (LESLIE, 2013). Dessa forma, o consumo agudo de EtOH aumenta os níveis de acetilcolina

(ACh) na VTA, os quais ativam os nAChR e aumentam a liberação de DA no NAc (JOSLYN et al., 2008).

A inibição dos efeitos excitatórios de glutamato por EtOH ocorre em concentrações que produzem os efeitos depressivos no SNC in vivo. Os receptores NMDA e não-NMDA (Kainato e AMPA) são inibidos por essa droga, sendo os receptores AMPA mais resistentes aos efeitos de EtOH, ou seja, maiores concentrações de EtOH são necessárias para inibir esses receptores (CARTA et al., 2003).

O EtOH também inibe a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem, reduzindo a despolarização do nervo terminal e, consequentemente, diminuindo a liberação de neurotransmissores para a fenda sináptica. A diminuição da excitabilidade neuronal ocorre pela ativação dos canais de potássio corretores do fluxo de internalização acoplados a proteínas G (GIRK) (BODHINATHAN & SLESINGER, 2013) bem como da atividade dos canais de potássio ativados por cálcio. Os canais GIRK controlam a excitabilidade neuronal do circuito da via da recompensa cerebral e parecem ter um papel importante nos distúrbios relacionados ao EtOH. Camundongos nocautes para os canais GIRK2 autoadministram maiores quantidades de EtOH e não desenvolvem preferência no teste de preferência condicionada de lugar (PCL), comparados aos camundongos selvagens (HILL et al., 2003; BLEDNOV et al., 2001). No entanto, os mecanismos moleculares dessa ativação ainda não estão bem estabelecidos.

Alguns estudos têm demonstrado que o neurotransmissor adenosina está envolvido em alguns dos efeitos farmacológicos de EtOH (NAM et al., 2013; ASATRYAN et al., 2011; PREDIGER et al., 2006, 2004; DAR et al., 1983). A adenosina possui uma família com quatro subtipos de receptores, todos acoplados a proteína G: A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3 (CUNHA, 2008). Dentre esses receptores, os dois primeiros são predominantemente expressos no encéfalo, principalmente no estriado, e parecem estar envolvidos nos efeitos reforçadores e motores da cafeína, um antagonista competitivo e não seletivo dos receptores de adenosina, mas preferencialmente de A_1 e A_{2A}. Os receptores A_{2A} estriatais modulam a neurotransmissão dopaminérgica pelo estabelecimento de interações diretas com os receptores D_2 de DA, formando dímeros A_{2A}-D_2. Nessas interações, a estimulação dos receptores A_{2A} bloqueia a função dos receptores D_2. No estriado ventral, essas interações parecem exercer um papel importante nos comportamentos relacionados à recompensa (FERRÉ & O´BRIEN, 2011; PREDIGER et al., 2006). Semelhante aos antagonistas dos receptores D_2, os agonistas dos receptores A_{2A} elevam o limiar de estimulação da recompensa,

indicando que adenosina, via receptores A_{2A}, pode inibir os processos de recompensa centrais. Por outro lado, a estimulação dos receptores estriatais pré-sinápticos A_1 inibe a liberação de DA, enquanto seu bloqueio facilita a liberação desse neurotransmissor por mecanismos dependentes e independentes de glutamato (FERRÉ & O´BRIEN, 2011).

Os opióides endógenos também apresentam papel importante nos efeitos hedônicos de EtOH (HERZ, 1997; REID & HUNTER, 1984). Um exemplo disso é o antagonista dos receptores μ-opióides (MOR) naloxona que parece prevenir o desenvolvimento da sensibilização a EtOH em camundongos, mostrando o papel do sistema opioidérgico nos efeitos estimulantes de EtOH (CAMARINI et al, 2000). Estudos posteriores confirmaram essa teoria bem como mostraram que a administração aguda de EtOH estimula a liberação de opióides endógenos β-endorfinas (βEND), encefalinas (ENK) e dinorfinas (DYN), os quais ligam-se aos receptores MOR, δ-(DOR) e κ-(KOR) opióides (GIANOULAKIS et al., 1996; MARINELLI et al., 2003, 2004, 2005, 2006; DAI et al., 2005; LAM et al., 2008; JARJOUR et al., 2009). A ativação de MOR e DOR parecem estar envolvidos nos efeitos eufóricos e positivos de EtOH. A DYN, por sua vez, parece produzir efeitos negativos relacionados à retirada da droga durante a abstinência (SIROHI et al., 2012).

Em suma, o EtOH interage com múltiplos sistemas de neurotransmissores e a compreensão de como estas interações ocorrem poderá desvendar alvos potenciais para o tratamento do alcoolismo.

Tabela 1. Resumo dos principais sistemas de neurotransmissores envolvidos nos efeitos do EtOH

Sistema de Neurotransmissor	**Efeitos produzidos pelo EtOH**
$GABA_A$	Liberação de GABA e ↑ da densidade do receptor
NMDA	Inibição dos receptores pós-sinápticos NMDA; no uso crônico do EtOH, superexpressão
Dopamina	↑ DA sináptica e dos efeitos recompensadores ligados ao NAc
Glicina	↑ liberação de glicina no NAc e ativação de GlyR
Opióides	Liberação de β-endorfinas e encefalina após administração aguda de EtOH; liberação de dinorfina durante abstinência
Acetilcolina	↑ liberação de ACh após administração aguda de EtOH e ativação de nAChR seguido de ↑ liberação de DA no NAc
Adenosina	↑ liberação de adenosina no estriado e ativação de receptores A_1 e A_{2A}

1.3 SISTEMA DE RECOMPENSA

O sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, conhecido também como a via da recompensa ou do reforço, é a via responsável pelos efeitos reforçadores positivos de natureza hedônica de forma geral, como comer, beber e manter relações sexuais, que são atividades vitais para a perpetuação das espécies (NESTLER, 2005; KOOB & LE MOAL, 1997). De forma semelhante, as drogas de abuso também podem ativar esse circuito, que engloba projeções da VTA para o NAc e o córtex pré-frontal (PFC) (SESACK & GRACE, 2010). O NAc abrange a parte ventral do estriado e pode ser considerado a região central do sistema de recompensa. Portanto, o aumento da liberação de dopamina no NAc produzido pela administração de drogas de abuso, por exemplo, gera sensação de prazer, o qual reforça a manutenção dessa atividade (Fig.1).

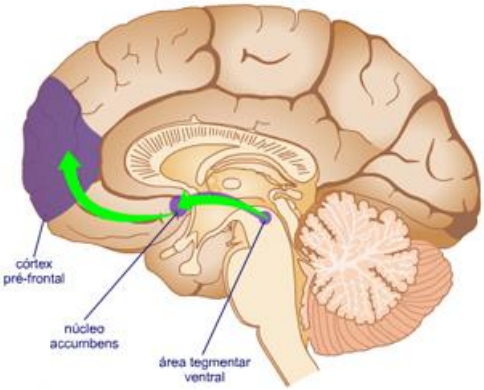


Figura 1. Esquema simplificado do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico no encéfalo humano. Os neurônios dopaminérgicos se originam na área tegmental ventral em direção ao núcleo accumbens e o córtex pré-frontal (figura obtida da UNESP VIRTUAL, 2014).

Além das projeções dopaminérgicas originadas da VTA e dos interneurônios gabaérgicos e colinérgicos, o NAc recebe inervações glutamatérgicas do PFC e de regiões límbicas, como amígdala (AMY) e hipocampo (HIP) (MORALES & PICKEL, 2011). Essas três últimas regiões encefálicas (PFC, AMY e HIP) também estão envolvidas nos processos de aprendizagem e memória (NESTLER, 2009).

O PFC, particularmente, é uma estrutura que controla a função executiva do comportamento, ou seja, exerce um controle cognitivo sobre o comportamento inibitório e a tomada de decisão (NESTLER, 2009). Semelhante ao NAc, o PFC é inervado por uma variedade de projeções de sistemas de neurotransmissores, como a norepinefrina, serotonina, acetilcolina e substanciais inervações dopaminérgicas. Por esse motivo, essa região encefálica é frequentemente conhecida por exercer um controle ´top-down´, ou seja, um controle cognitivo do comportamento (cortical sobre regiões subcorticais). Além disso, a função executiva depende significativamente da memória de curta-duração, uma capacidade do encéfalo de manter a representação de uma informação sensorial por um período curto de tempo (NESTLER, 2009). Essas memórias de curta-duração permitem a integração e a manipulação dessas informações para guiar o raciocínio, as emoções e o comportamento, sendo crucial para os mamíferos (NESTLER, 2009).

Há muito tempo se sabia que dependentes de drogas apresentam prejuízos da função frontal do encéfalo (BECHARA, 2003), os quais estão relacionados com os prejuízos do controle executivo, inibitório e de tomada de decisão dos indivíduos (FEIL et al., 2010; BAICY & LONDON, 2007; TAPERT et al., 2007; VERDEJO-GARCÍA et al., 2007; YÜCEL et al., 2007; MONTEROSSO et al., 2005). E, nos últimos anos, tem sido proposto que o prejuízo dessa região encefálica poderia ocorrer ao longo do desenvolvimento da dependência de drogas (FEIL et al., 2010), ou seja, o prejuízo da função do PFC ocorreria durante a transição à dependência.

A dependência é uma doença crônica de recaída que se caracteriza pelo comportamento persistente de busca e uso compulsivo da droga, apesar das consequências negativas produzidas pelo consumo da droga (KOOB, 2013; THOMAS et al., 2008). Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento dessa doença, como a exposição repetida às drogas de abuso, que produz mudanças mal adaptativas e afeta a regulação da motivação ligada à droga, somadas às características biológicas (ansiedade, busca por sensações e novidade, e sensibilidade à droga) e ambientais (disponibilidade da droga e estresse) (STEKETEE & KALIVAS, 2011; NESTLER & CARLEZON, 2006; KOOB & LE MOAL, 2006). Dentre os consumidores de drogas, as linhas atuais de pesquisa dividem o uso de drogas em três tipos: (1) ocasional, (2) uso controlado ou social, e (3) a dependência de drogas (KOOB & LE MOAL, 2006).

No grupo de consumidores sociais ou controlado da droga, existem indivíduos que consomem o EtOH de forma esporádica e abusiva, conhecidos popularmente como consumidores binge. Esses indivíduos são considerados pertencerem a um grupo de risco para desenvolver o alcoolismo devido os diversos prejuízos sistêmicos e no SNC produzidos pelo consumo abusivo de EtOH.

1.4 *BINGE DRINKING* OU BEBER PESADO EPISÓDICO

O termo binge drinking ou beber pesado episódico descreve um padrão de consumo caracterizado pela ingestão de bebidas alcoólicas com a intenção primária de intoxicação (níveis de alcoolemia que podem alcançar 0,08 g % em um período de até 2 h) (STOCK & BESTE, 2013; PETIT et al., 2013; LIU et al., 2011; NIAA, 2004). Para adultos do sexo masculino, isso corresponde à ingestão de pelo menos cinco doses padrões e, para o sexo feminino, no mínimo quatro doses

padrões (CRABBE et al., 2011). Em média, uma dose padrão de EtOH equivale de 10 - 14 g de álcool, que varia conforme a graduação alcoólica das bebidas, normalmente sendo 350 ml de cerveja (4 a 6%, v/v), 80 a 140 ml de vinho (10-15%, v/v) e 40 a 50 ml de destilados (~40%, v/v) (CRM-SP, 2003).

Diversas evidências em seres humanos e animais têm mostrado que beber de forma binge pode facilitar a transição para a dependência por causar diversos danos, como, por exemplo, disfunção do sistema de estresse, déficit cognitivo e alterações morfonatômicas do encéfalo (CAMPANELLA et al., 2013; STOCK & BESTE, 2013; PETIT et al., 2013; PARADA et al., 2012; SPROW&THIELE, 2012; CIPPITELLI et al., 2012; MAURAGE et al., 2012; GILPIN et al., 2012; LIU et al., 2011; CREGO et al., 2010; STEPHENS & DUKA, 2008; FIELD et al., 2008; SMITH et al., 2008). Os sistemas neuroquímicos principais que medeiam as respostas comportamentais ao estresse incluem os glicocorticoides, o fator de liberação de corticotrofina (CRF), a noreprinefrina e a dinorfina (KOOB, 2013). Os neurônios do CRF estão presentes em diversas regiões encefálicas e diversos estudos tem demonstrado um papel chave dos neurônios CRF do núcleo paraventricular do hipotálamo em controlar a resposta da pituitária-adrenal ao estresse e o papel dos neurônios CRF do núcleo central da amígdala e do núcleo da estria terminal em mediar as respostas afetivas negativas do estresse e da retirada da droga (KOOB, 2013). Dentre as alterações morfoanatômicas comumente encontradas em consumidores binge são reduções do córtex frontal e do hipocampo, da densidade da substância cinzenta, alteração no volume do tálamo, dos ventrículos e do putamen, e uma atividade parietal aumentada durante as tarefas de memória espacial (ZHAR et al., 2014; FEIN et al., 2013; MEDINA et al, 2008; BERESFORD et al., 2006; TAPERT et al., 2004).

Apesar de diversos estudos comprovarem as mudanças biológicas e neurofisiológicas do consumo binge em seres humanos e modelos animais, recentemente Piazza e Deroche-Gamonet (2013) publicaram um artigo propondo que modelos de binge não representam modelos de transição à dependência. Os pesquisadores afirmam que o consumo binge pertence à categoria similar a tolerância e retirada da droga, além de não ser um critério de diagnóstico explícito em manuais internacionais de diagnóstico de doenças mentais (DSM-5 e CID-10), ou uma condição necessária para o desenvolvimento da dependência, pois esse padrão de consumo pode ser observado em indivíduos na fase de uso recreacional da droga (jovens que bebem nos finais de semana). No entanto, apesar de alguns adeptos ao padrão binge apresentarem

consumo “controlado” e intencional de EtOH nos finais de semana, os prejuízos da ingestão excessiva dessa droga não podem ser ignoradas. Diversas evidências já mostraram as alterações neurofisiológicas causadas pelo abuso do EtOH. Além disso, o padrão binge de consumo não necessariamente seria um sintoma, como a tolerância, descrito por Piazza & Deroche-Gamonet, (2013), mas uma recente tendência comportamental capaz de elevar os riscos para o desenvolvimento da dependência, em indivíduos não dependentes. Outro fator que deve ser considerado é a dificuldade de distinguir o ponto exato de transição entre o uso controlado da droga para a perda de controle. Dessa forma, não é possível estabelecer quantos episódios de binge e abstinências são necessários para desencadear a doença ou mesmo para manter o uso controlado e ocasional da droga, uma vez que diversas alterações biológicas ocorrem nesses consumidores. Portanto, no presente estudo o consumo binge será considerado como um comportamento de risco para a transição à dependência.

Uma recente tendência entre os consumidores jovens que tem preocupado e divergido opiniões dos cientistas é o consumo de EtOH em padrão binge pela associação de EtOH e energético (EN).

1.5 ENERGÉTICOS

Bebida energética ou energético (EN) é uma bebida não alcoólica criada na Tailândia na década de 60 (REISSIG et al., 2009). Entretanto, começou a ganhar popularidade apenas a partir da introdução da bebida Red Bull na Áustria em 1987, e dos pesados investimentos de publicidade que ocorreram nos Estados Unidos da América uma década depois. Dentre os consumidores regulares de EN, 31% são adolescentes e 34 a 51% são jovens de 18 a 24 anos de idade (HOWLAND & DAMARIS, 2012).

O EN entrou no mercado com a promessa de melhorar o humor, o desempenho físico e psicomotor, além de aumentar a concentração e o alerta (FERREIRA et al, 2004; SEIDL et al, 2000; ALFORD & WESCOTT, 2001). Esses efeitos são devido aos seus constituintes - por exemplo, uma lata de Red Bull contém uma combinação de carboidratos (~11 g/dl), taurina (~400 mg/dl), cafeína (~32 mg/dl), glucoronolactona (~240 mg/dl) e vitaminas do complexo B. Outros fabricantes ainda adicionam estimulantes fitoterápicos, como guaraná, ginseng, extratos de acerola, cranberry ou açaí. Dentre eles, acredita-se que a cafeína e a taurina são os principais componentes responsáveis pelos efeitos do EN.

A taurina (Tau) é um aminoácido inibitório, semelhante ao GABA, que se encontra distribuído em grandes quantidades em diversas regiões do organismo de mamíferos. Apesar de seu papel ainda não estar bem esclarecido, a Tau parece modular a excitabilidade da membrana, diminuir a concentração de cálcio intracelular produzido pela excitotoxicidade glutamatérgica e aumentar a atividade da enzima aldeído desidrogenase (FROSINI et al, 2003; WARD et al., 2001; WATANABE et al., 1985; HAYES & STURMAN, 1981).

A cafeína é um psicoestimulante encontrado em diversos alimentos como chocolate, café, chás e refrigerante de cola. Em doses não tóxicas, atua principalmente como um antagonista dos receptores A_1 e A_{2A} de adenosina e produz um efeito estimulante, aumentando o alerta e reduzindo o sono e a fadiga. Diversos estudos também já mostraram o papel neuroprotetor da cafeína, principalmente pela sua ação nos receptores A_{2A} (ESPINOSA et al., 2013; PIRES et al., 2010; PREDIGER, 2010; DALL´IGNA et al., 2003). No entanto, o consumo excessivo dessa droga pode produzir efeitos negativos, como aumento da liberação de Ca^{2+} e o bloqueio dos receptores GABA, e a dependência com a ingestão frequente dessa droga (FREDHOLM et al., 1999).

Apesar das ações benéficas produzidas por esses componentes, ainda não existe uma regulamentação de dose ou constituintes de EN pela Agência de Vigilância Sanitária, aumentando os riscos de intoxicação pelo mesmo (REISSIG et al., 2009). A cafeína, por exemplo, pode variar de 50 a 505 mg por lata ou conteúdo de ED, dependendo do fabricante (REISSIG et al., 2009). A recomendação para o consumo dessa droga pela FDA, a Agência Reguladora da Comercialização de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos, é de no máximo 100 a 200 mg a cada 3 ou 4 horas, em adultos e jovens acima de 12 anos de idade, o equivalente a uma xícara de café (77~150 mg de cafeína). A taurina, por sua vez, ainda não tem sua dose tóxica estabelecida, dificultando o controle na venda ou fabricação dessas bebidas.

A tendência de associar EN aos destilados, como a vodka, produz drinks conhecidos como “alcopops” (KPONEE et al., 2013; LIU et al., 2011; VENDRUSCOLO et al., 2010; HEALTH EDUCATION AUTHORITY, 1999; HUGHES et al. 1997). Popularmente acredita-se que essa associação reverte alguns dos efeitos indesejados de EtOH, como a sedação e a descoordenação motora, devido ao efeito estimulante de EN. No entanto, um estudo controlado realizado por Ferreira et al. (2004) em voluntários mostrou que não há diferenças

fisiológicas (tempo de reação e coordenação motora) e metabólicas (alcoolemia) entre indivíduos que consumiram EtOH+EN ou EtOH apenas. As alterações encontradas naqueles que consumiram EtOH+EN foram na percepção de intoxicação e no julgamento cognitivo, os quais poderiam explicar a tendência aumentada de dirigir embriagado, os frequentes casos de intoxicação por EtOH ou pelos componentes de EN, como a cafeína, relatados na literatura (KPONEE et al., 2013; HOWLAND & DAMARIS, 2012; ANITEI et al., 2011, ARRIA et al., 2011; O´BRIEN et al., 2008; OTERI et al., 2007; FERREIRA et al., 2006).

Os alcopops também parecem ter contribuído para a popularização do consumo em padrão *binge*, um comportamento que tem se dissipado entre jovens adultos de diversos países. Possivelmente, o elevado conteúdo de açúcares presentes nos EN aumenta a palatabilidade de EtOH, aumentando a ingestão total de EtOH (FERREIRA et al., 2004; VENDRUSCOLO et al., 2010).

Embora consumidores da associação EtOH+EN frequentemente parecem ingerir EtOH em padrão *binge*, algumas controvérsias na literatura tem questionado se de fato essa associação pode facilitar ou não a transição à dependência. A maioria dos estudos sobre a associação de EtOH e EN é epidemiológico e, de fato, é bastante difícil de controlar algumas variáveis, como, por exemplo, o histórico de consumo de EtOH e/ou o histórico familiar de cada indivíduo antes de consumir a associação de EtOH+EN. E apesar dessa crescente popularização do padrão binge de EtOH+EN, inclusive no Brasil, poucos estudos foram realizados para avaliar sistematicamente os prejuízos da exposição a EtOH+EN em modelos animais.

A maioria dos progressos científicos que existem na pesquisa farmacológica e comportamental deriva de estudos realizados em modelos animais. Apesar de não existir nenhum modelo animal que mimetize totalmente as condições clínicas apresentadas por seres humanos, eles permitem que elementos específicos do processo para a dependência sejam estudados (KOOB & LE MOAL, 2006). E, por esse motivo, diversos modelos animais têm sido desenvolvidos e usados a fim de avaliar diferentes comportamentos nos estágios do ciclo da dependência. Recentemente, Simms et al. (2008) e George et al. (2012) mostraram que ratos que possuem acesso intermitente de EtOH 20% em protocolo de livre-escolha entre duas garrafas desenvolve consumo escalonar de EtOH entre quatro a seis semanas e seus níveis de alcoolemia alcançam níveis próximos de consumidores binge nas duas primeiras horas de acesso à solução alcoólica, mostrando que esse

protocolo pode ser um modelo animal do tipo-*binge* interessante para estudar a transição à dependência ao EtOH.

Com base nos temas abordados acima sobre o crescente índice de alcoolismo na população mundial e brasileira, a relevância do consumo da associação EtOH e EN entre os jovens e as limitações dos estudos epidemiológicos sobre as consequências produzidas pela associação dessas bebidas a longo prazo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a exposição repetida de EtOH+EN pode alterar alguns dos comportamentos preditivos de transição ao alcoolismo em um modelo animal tipo-binge.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se a combinação de EN e EtOH pode alterar alguns dos comportamentos preditivos de transição à dependência em ratos

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o padrão de consumo de EtOH de animais com acesso contínuo (24 h/dia) ou intermitente (24 h/2as, 4as e 6as - feiras) de EtOH ou EtOH+ENp [2]por 26 dias;
2. Avaliar a atividade locomotora dos animais durante o consumo voluntário;
3. Avaliar o comportamento do tipo-ansiedade na abstinência aguda;
4. Avaliar a função cognitiva durante a privação ao EtOH;
5. Avaliar o comportamento de busca pela novidade;
6. Avaliar os efeitos reforçadores ou de privação ao EtOH no teste de preferência condicionada de lugar após 7 dias de privação.

---

[2] ENp corresponde a uma solução preparada com os principais componentes de EN (açúcares, cafeína, taurina, glucuronolactona e inositol), baseado na dose de *Red Bull*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade entre 60 e 75 dias pós-natal no início dos experimentos, oriundos do Biotério Setorial do departamento de Farmacologia da UFSC. Os animais foram trazidos para o biotério setorial em caixas com 5 animais, e mantidos em temperatura controlada de 22±2°C, sob ciclo claro-escuro de 12 h, recebendo água e ração ad libitum. A ração e água foram apenas retiradas 3 h antes da administração via gavagem. Nos primeiros dias de ambientação, os animais foram submetidos ao tratamento com ivermectina (anti-helmíntico) na dose de 5 mg/ L, por 3 dias consecutivos. Animais submetidos ao consumo livre-escolha foram isolados em caixas individuais após 7 dias de ambientação no biotério setorial, enquanto animais submetidos ao tratamento via gavagem foram mantidos em caixas com 5 animais do mesmo sexo durante todo o experimento. Animais naives usados em alguns testes experimentais representam não tratados com drogas e mantidos em caixas com 5 animais do mesmo sexo. Todos os experimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob número de protocolo PP00816. Além disso, todos os testes foram realizados no laboratório de psicofarmacologia do departamento de Farmacologia da UFSC.foram realizados no laboratório de psicofarmacologia do departamento de Farmacologia da UFSC.

3.2 CONSUMO VOLUNTÁRIO DE EtOH OU EtOH+ENp

O protocolo de consumo voluntário de EtOH ou livre-escolha entre duas garrafas é um modelo validado e amplamente utilizado para o estudo de consumo de uma solução de interesse em relação à água (MCCLEARN & RODGERS, 1959; MARDONES et al., 1953; RICHTER & CAMPBELL, 1940). O procedimento escolhido para o presente estudo foi baseado no protocolo tipo-binge previamente descrito por Simms et al. (2008) e George et al. (2012). Esses pesquisadores mostraram que animais que possuem acesso intermitente à solução de EtOH 20% desenvolve um padrão de consumo escalonar de EtOH e seus níveis de alcoolemia alcançam níveis semelhantes aos de

consumidores binge da clínica nas primeiras 2 h de acesso ao EtOH. Dessa forma, em nosso protocolo experimental os animais com acesso intermitente à solução de EtOH ou EtOH+ENp serão considerados como consumidores em padrão tipo-binge de EtOH.

Após o período de ambientação no biotério setorial, os animais foram separados em caixas individuais contendo serragem limpa e receberam ração e duas garrafas, contendo em uma delas água, e em outra garrafa, a solução experimental de EtOH 20% ou EtOH+ENp 20%. O acesso à solução experimental ocorreu em regime contínuo (24 h/ todos os dias) ou intermitente (24 h/ 2as, 4as e 6as - feiras), formando os seguintes grupos: EtOH contínuo (EtOH_cont), EtOH intermitente (EtOH_int), EtOH+ENp contínuo (EtOH+ENp_cont), EtOH+ENp intermitente (EtOH+ENp_int) e o grupo controle, conforme mostra a tabela 2. O grupo controle representa animais que foram igualmente isolados em caixas individuais, mas que não receberam a solução experimental. A solução de EtOH 20% corresponde a diluição de EtOH (p/v, etanol 99%, Synth®) com água potável, enquanto a solução EtOH+ENp 20%, a diluição de EtOH com uma solução preparada no laboratório de EN (ENp), a qual continha os principais componentes e dose da bebida energética Red Bull (em 250 mL): 21 g de sacarose, 5 g de glicose, 50 mg de inositol, 1 g de taurina, 80 mg de cafeína e 600 mg de glucuronolactona. O resultado do consumo de EtOH será representado como consumo de EtOH/ kg de peso corporal, calculado da seguinte forma: (Δ peso da garrafa em 24 h de acesso à solução experimental/ peso do animal em kg) x densidade (g/ ml) x g de EtOH na solução experimental. Todos os animais foram mantidos no mesmo biotério e na mesma estante, tendo suas posições alternadas semanalmente para reduzir a influência da localização do animal no consumo de EtOH (IZÍDIO et al., 2005). As garrafas foram alternadas a cada 24 h.

Tabela 2. Grupos do protocolo consumo voluntário de EtOH ou EtOH+ENp

Contínuo (24 h/ todos os dias)	Intermitente (24 h/ dias alternados)
EtOH	EtOH
EtOH+EN	EtOH+EN
Grupo Controle recebeu apenas água	

3.3 ATIVIDADE LOCOMOTORA

A avaliação da atividade locomotora e estereotipia é uma ferramenta bastante usada e útil para avaliação de comportamentos como tolerância, sensibilização e reatividade do animal a um ambiente novo (KOOB, 2000; KALIVAS et al., 1998).

Foi utilizado o equipamento EP149 Monitor de Atividades da Insight® (Fig. 2) para avaliação da atividade locomotora dos animais em ambos os tratamentos (consumo voluntário e gavagem). O equipamento era composto por uma caixa feita de acrílico (50 x 50 x 48 cm) que ficava sobre um suporte metálico equipado com 16 sensores infravermelho posicionados lateralmente. Esses sensores detectam o movimento do animal, transmitindo os sinais para um computador conectado ao equipamento. O teste foi realizado sob baixa iluminação (~10 lux) durante 30 min (grupo gavagem) ou 15 min (grupo consumo). Os primeiros 5 min analisados foram considerados como reatividade do animal a um ambiente novo e a locomoção total, uma medida da locomoção geral. Os animais submetidos ao consumo voluntário foram avaliados nos dias 0, 1, 6, 13, 20 e 26, ou seja, uma vez por semana. Animais tratados via gavagem foram avaliados apenas nos dias 1 e 6 do tratamento, após 15 min da administração. O parâmetro de atividade locomotora dos animais será representado em mm/s (velocidade).

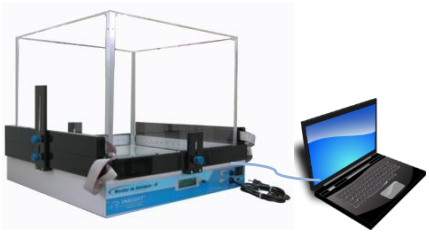


Figura 2. Monitor de atividades

3.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) é utilizado para mensurar comportamentos tipo-ansiedade de roedores, baseado no conflito destes animais de explorar um ambiente novo e o medo de áreas elevadas abertas (PELLOW et al., 1985; MONTGOMERY, 1955). O

aparato (Fig. 3) possui quatro braços elevados (52 cm de altura) com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, produzida em madeira revestida com fórmica. Os braços estão dispostos perpendicularmente, formando uma cruz. Destes, dois braços opostos são fechados por paredes de 40 cm de altura e dois braços são abertos com uma borda de 1 cm de altura em cada braço. A intersecção desses braços forma a plataforma central (10 x 10 cm) com acesso a todos os braços. O teste foi conduzido sob iluminação moderada (~50 lux na plataforma central) e registrados por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD na sala adjacente. Os animais foram avaliados após 24 h de abstinência da exposição ao consumo voluntário de 26 dias de EtOH e/ou ENp. Cada animal foi colocado na plataforma central, com a face voltada para um dos braços fechados, e avaliou-se o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados por 5 min (foi considerado entrada no braço quando o animal colocava as quatro patas dentro do braço). Estes dados foram utilizados para calcular o percentual de entradas nos braços abertos [% de entradas nos braços abertos = entradas nos braços abertos / (entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados) x 100] e o percentual de tempo gasto nos braços abertos [% de tempo gasto nos braços abertos = tempo nos braços abertos / (tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados) x 100], ambos utilizados como índices de ansiedade. O número de entradas nos braços fechados foi utilizado como medida da atividade locomotora (RODGERS & DALVI, 1997).

Figura 3. Labirinto em cruz elevado

3.5 RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Em 1950, Berlyne reportou pela primeira vez que ratos gastavam mais tempo explorando um objeto novo do que um objeto

familiar. No entanto, foi apenas em 1988 que esse conceito foi inserido na comunidade científica pelos pesquisadores Ennaceur & Delacour como um método para avaliação da função da memória. Este procedimento utiliza a tendência dos roedores de se aproximar e explorar novidades e tem sido replicado com sucesso em diferentes laboratórios, usando uma variedade de aparatos e objetos (BEVINS & BESHEER, 2006).

O teste de Reconhecimento de Objeto (RO) utilizado foi adaptado dos protocolos previamente descritos por Pires et al., 2009 e Norman & Eacott, 2004. Este teste foi realizado no 3º dia de abstinência de animais expostos a ambos os tratamentos, consumo voluntário e gavagem. O teste consistiu de 2 dias, dos quais o 1º dia foi a habituação na arena do Campo Aberto (100 x 100 cm) (Fig. 4) e o 2º dia, o teste de RO. O Campo Aberto (CA) era formado por paredes brancas de 40 cm de altura e base dividida por linhas pretas formando 25 quadrados de 20 x 20 cm. Os objetos utilizados foram 2 garrafas de material plástico de 1 L, sendo os objetos A e A´ idênticos (Fig. 5-a), transparentes e com detalhes em verde e amarelo, e o objeto B, uma garrafa levemente diferente do objeto A, feita de material fosco e com detalhes em vermelho (Fig. 5-b). A habituação foi realizada por 10 min sob baixa intensidade luminosa (~ 10 lux) e, ao final de cada sessão, o CA foi limpo com papel toalha e álcool 10%. O teste de RO consistiu de 2 sessões de 5 min: a apresentação dos objetos iguais (A e A´) e, após 30 min, a reapresentação dos objetos com a troca de um objeto familiar por um objeto novo (A e B). O intervalo de 30 min foi escolhido para avaliação da memória de curta-duração. O teste foi registrado por uma câmera de vídeo localizada acima do CA, conectado a uma TV e DVD na sala adjacente. O tempo em que o animal investigou cada objeto foi mensurado para o cálculo do percentual de reconhecimento de objetos: % discriminação dos objetos = [(tempo de investigação do objeto novo – tempo de investigação do objeto familiar) / (tempo total de investigação)]*100. Animais que não investigaram os objetos por pelo menos 10 s foram excluídos do teste.

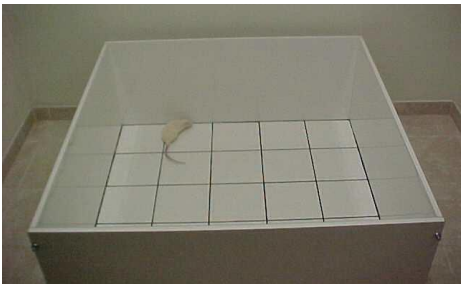


Figura 4. Campo aberto

(a) (b)

Figura 5. Objetos A e A´ (a) e B e A (b) do teste de reconhecimento de objetos

3.6 BUSCA PELA NOVIDADE

Em modelos animais, a busca pela novidade (BN) e a impulsividade têm sido usados para predizer a compulsão por autoadministração de drogas (PARKITNA et al., 2013). Para a avaliação desse traço comportamental foi utilizado o aparato de Preferência Condicionada de Lugar (PCL), descrito no item 3.10, e realizado no 5º dia de abstinência de animais expostos ao consumo voluntário de EtOH e/ou ENp por 26 dias. O teste de BN consistiu em colocar cada animal aleatoriamente em um dos compartimentos da PCL por 10 min, com a porta tipo guilhotina fechada. Passado esse período, a porta foi retirada para exploração de todos os compartimentos pelo animal por 10 min. Esse teste foi conduzido sob baixa iluminação (~10 min) e o tempo em que o animal permaneceu nos compartimentos familiar e novo foi registrado para o cálculo do percentual de busca pela novidade: % BN = [(tempo nos compartimentos novos – tempo no compartimento habituado) /600) *100].

3.7 EFEITOS DE PRIVAÇÃO AO ETANOL

O efeito de privação ao EtOH é considerado uma medida preditiva de recaída ao EtOH e pode ser associada aos efeitos disfóricos relacionados com abstinência aguda (GARCÍA-BURGOS et al., 2009; SANCHIS-SEGURA & SPANAGEL, 2006).

O efeito de privação foi avaliado após 7 dias de abstinência de animais expostos ao consumo voluntário de EtOH ou EtOH+EN (DE CARVALHO et al., 2012). Todos os grupos, incluindo o controle, tiveram acesso a solução de EtOH 10% por 48 h consecutivas, sendo as garrafas alternadas a cada 24 h. O consumo de EtOH foi mensurado em g/kg de peso corpóreo, usando a mesma equação anteriormente descrita no item 3.2.

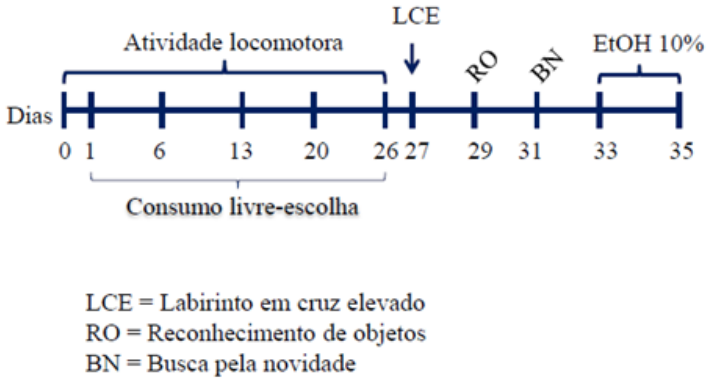


Figura 6. Desenho experimental do consumo voluntário. Os animais expostos a 26 dias de consumo em livre-escolha entre duas garrafas foram submetidos à avaliação da ambulação antes e durante o tratamento (dias 0, 1, 6, 13, 20 e 26) no monitor de atividade. Durante a abstinência, foram avaliados os comportamento do tipo-ansiedade no LCE (1), a função cognitiva através do teste de RO (2), o comportamento de busca pela novidade (3) e os efeitos de privação a EtOH (4).

3.8 TRATAMENTO INTRAGÁSTRICO (GAVAGEM)

O objetivo deste tratamento foi confirmar a função cognitiva dos animais submetidos ao consumo voluntário, uma vez que alguns estudos mostraram que quatro semanas de livre-escolha de EtOH não produzem déficits cognitivos (FARR et al., 2005). Dessa forma, este protocolo foi escolhido por produzir prejuízo cognitivo temporário (entre 3 a 6 dias após o tratamento) usando uma dose moderada de EtOH, e com recuperação das funções cognitivas nos dias posteriores (KUZMIN et al., 2011).

O protocolo consistiu de 6 dias consecutivos de administrações via gavagem (i.g.) de dose de 3,4 g/kg/dia (p/v) de EtOH combinado ou não com EN (Red Bull), na dose de 10,71 ml/kg/dia, uma dose que antagonizou a hipolocomoção produzida por 2,5 g/kg de EtOH em camundongos (FERREIRA et al., 2004). Os grupos do presente tratamento, portanto, foram: EtOH, EtOH+EN, EN e controle (água). Aproximadamente 3 h antes de cada administração os animais foram colocados em jejum (retirada de ração e água), a fim de que o estômago estivesse vazio para melhor a absorção das soluções.

3.9 DISCRIMINAÇÃO SOCIAL

O teste de Discriminação Social (DS) usa a capacidade de um rato adulto em discriminar um rato jovem familiar de um jovem novo (ENGELMANN et al. 1995). Este teste é considerado uma ferramenta bastante útil para avaliar o aprendizado e os processos de memória em roedores.

O protocolo foi baseado no trabalho de Watson et al (2012) e foi executado no 3º dia de abstinência após o tratamento via gavagem. Os animais foram isolados por 2 dias previamente a avaliação de DS, o qual consistiu de 2 fases: a apresentação de um animal jovem (J1) por 5 min em sua caixa de habituação e, após 30 min, a reintrodução de J1 juntamente com um outro animal jovem (J2) por outros 5 min. O tempo em que o animal adulto cheirou ou seguiu os animais jovens foram mensurados. A taxa de discriminação foi calculada através da seguinte equação: tempo de investigação entre J2/ J1. Animais que não investigaram o animal J1 por pelo menos 10 s durante a apresentação foram excluídos do teste.

3.10 PREFERÊNCIA CONDICIONADA DE LUGAR

A preferência condicionada de lugar (PCL) é utilizada para avaliar os efeitos reforçadores de drogas com potencial de abuso e uma avaliação preditiva de recaída (PANDOLFO et al., 2009; BARDO & BEVINS, 2000; CUNNIGHAM et al., 2000; TZSCHENTKE, 2007). Neste teste, o animal aprende a associar o efeito reforçador da droga com um determinado ambiente.

O aparato de PCL era constituído por três diferentes compartimentos separados por portas tipo guilhotina (10 x 10 cm). O compartimento central "neutro" (15 x 25 x 40 cm) dava acesso a outros dois compartimentos (30 x 25 x 40 cm) que apresentavam diferentes pistas visuais e táteis: um compartimento era preto com piso de madeira lisa e o outro, branco com listras verticais pretas e piso de alumínio. O experimento foi conduzido em uma sala com baixa iluminação (~10 lux) e o comportamento de cada animal era registrado através de uma câmera de vídeo posicionada acima das caixas e monitorada em uma sala adjacente por um circuito fechado de TV. Ao final de cada sessão, os animais retornavam para suas respectivas caixas de vivência e os aparatos eram limpos com papel toalha e solução de etanol a 20%.

Dados do nosso laboratório mostraram que são necessários no mínimo 20 sessões de condicionamentos com EtOH alternados com salina para condicionar ratos Wistar com EtOH. No entanto, como nosso objetivo foi avaliar se a pré-exposição ao EtOH e/ou EN poderia facilitar o condicionamento no teste da PCL os animais foram condicionados na PCL com sessões reduzidas de condicionamento. O protocolo de PCL (Fig. 7), portanto, consistiu de 2 dias de pré-condicionamento, 10 dias de condicionamento e 1 dia de pós-condicionamento. No pré e pós-condicionamento os animais possuíam acesso a todos os compartimentos por 10 min, a partir do compartimento central. No 2º dia de pré-condicionamento e no pós-condicionamento mensurou-se o tempo em que o animal permanecia em cada um dos compartimentos maiores. O tempo gasto no pré-condicionamento foi considerado como tempo basal de cada animal e comparado com o tempo gasto no pós-condicionamento. Animais que apresentavam marcante aversão (menos de 15% do tempo da sessão) ou preferência (mais de 85%) no tempo basal eram excluídos do experimento (DE CARVALHO et al., 2010).

O condicionamento consistiu de uma sessão diária de administração de 1 g/ kg de EtOH (solução de 15% (p/v), i.p.), alternadas com veículo (salina). O grupo controle de cada pré-

tratamento recebeu apenas veículo durante os 10 dias de condicionamento. Cada animal foi individualmente colocado em um dos compartimentos da PCL logo após a administração via i.p., onde permanecia por 30 min. O índice de preferência, o qual fornece um parâmetro para mensurar os efeitos reforçadores de EtOH, foi calculado pela diferença no tempo gasto no compartimento pareado com EtOH no pré e pós-condicionamento.

Figura 7. Preferência condicionada de lugar

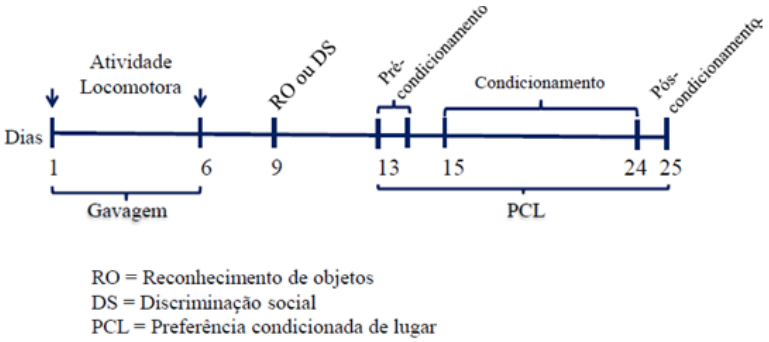


Figura 8. Desenho experimental do tratamento via gavagem. Novos grupos de animais foram submetidos a administrações de EtOH e/ou EN, via gavagem, por 6 dias consecutivos. A avaliação da ambulação no monitor de atividade foi realizada nos dias 1 e 6 do tratamento 15 min após receberem a administração via gavagem. No 3º dia pós-tratamento os animais foram avaliados nos testes de RO ou DS (grupos independentes), e a partir do 7º dia pós-tratamento foram condicionados no teste da PCL.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® 6.0. Para os testes com repetições, como a atividade locomotora, PCL, RO, DS e consumo de etanol, foi realizada ANOVA de medidas repetidas ou ANOVA de 2-vias, seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni. Para os testes LCE, NS, %RO, taxa de DS e os efeitos de privação ao EtOH foram usadas ANOVA de 1 via, seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni. Na análise de dose dos componentes de ENp, foi realizado o teste t de Student. Todos os dados estão apresentados como média ± E.P.M. e valores que ficaram fora de 2 desvios padrões foram excluídos da análise estatística. O nível de significância aceito para os testes foi de 5% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 CONSUMO VOLUNTÁRIO

4.1.1 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente sobre o consumo de EtOH

A figura 9 ilustra o resultado do aumento da ingestão de EtOH pelos grupos contínuo e intermitente de EtOH+ENp e o comportamento de consumo escalonar dos grupos intermitentes (EtOH_int e EtOH+ENp_int). Foi realizado ANOVA de medidas repetidas, com teste *post-hoc* de Bonferroni. A análise estatística revelou um efeito significativo para todos os fatores: tratamento [F (3, 54) = 60; P<0,0001], tempo (dias) [F (11, 594) = 8,2; P<0,0001] e interação entre os grupos [F (33, 594) = 2,5; P<0,0001].

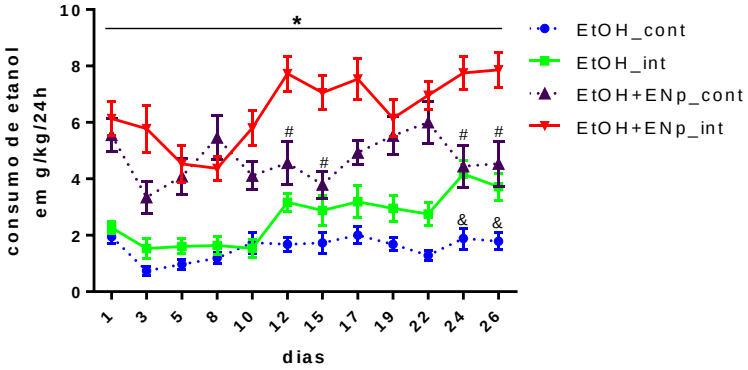


Figura 9. Consumo voluntário de EtOH de animais expostos ao regime contínuo ou intermitente de EtOH ou EtOH+ENp durante durante 26 dias. As curvas representam a média ± E.P.M. do consumo de EtOH em g/kg/24h (n = 14 ou 15). * indica diferença significativa entre os grupos EtOH+ENp *vs.* EtOH (ANOVA de medidas repetidas, P < 0,01); & EtOH_cont *vs.* EtOH_int (P < 0,05) e # EtOH+ENp_cont *vs.* EtOH+ENp_int (P < 0,0001).

Em paralelo, foram quantificados o consumo total médio dos componentes de ENp e a variação do peso dos animais durante o consumo voluntário. A tabela 3 ilustra os resultados obtidos através da

análise do teste t de Student, os quais indicam que o grupo intermitente consumiu maiores quantidades de cada substância de ENp quando comparado ao grupo contínuo. Como a concentração de ENp para ambos os grupos são equivalentes, a diferença estatística encontrada foi igual para todos os grupos (t = 4,487; P = 0,0001). A figura 10 ilustra o peso médio dos animais expostos à solução de EtOH ou EtOH+ENp durante os 26 dias de consumo livre-escolha. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos [F (4, 70) = 0,17; P = 0,95].

Tabela 3. Consumo total médio dos componentes de ENp, representados em mg ou g/ kg de peso corporal/ dia

COMPONENTES	EtOH+ENp_cont	EtOH+ENp_int
taurina (mg/kg)	72,15 ± 4,705	108,7 ± 6,656*
cafeína (mg/kg)	5,772 ± 0,3764	8,698 ± 0,5325*
inositol (mg/kg)	3,607 ± 0,8803	5,436 ± 0,3328*
glucuronolactona (mg/kg)	43,29 ± 2,823	65,23 ± 3,994*
açúcares (sacarose+glicose) (g/kg)	1,876 ± 0,1223	2,827 ± 0,1731*

NOTA: Os valores indicam média ± E.P.M. de cada componente. O teste t de Student para cada componente revelou diferença significativa entre EtOH+ENp_cont e EtOH+ENp_int (n = 14; * t = 4,487; P = 0,0001).

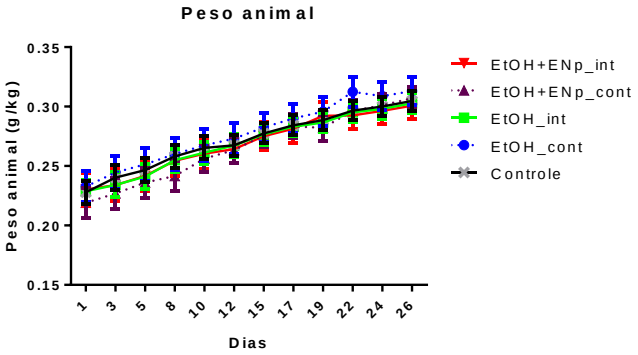


Figura 10. Peso dos animais ao longo do consumo livre-escolha de EtOH ou EtOH+ENp. As linhas representam a média ± E.P.M do peso dos animais (n =

14 ou 15). ANOVA de medidas mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do tratamento de 26 dias (P > 0,05).

4.1.2 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente sobre o consumo total de EtOH

A figura 11 ilustra o aumento da ingestão de EtOH produzido pela associação ENp e EtOH. Apesar da figura 8 ter revelado maior consumo de EtOH em 24h de acesso a solução experimental de ambos os grupos intermitente nos dias analisados, os grupos contínuos consumiram de forma equivalente ou maior quando somados todos os dias de tratamento. A ANOVA de 1-via revelou diferença significativa no consumo total de EtOH entre os grupos [(F (3, 54) = 74,07; P < 0,0001)].

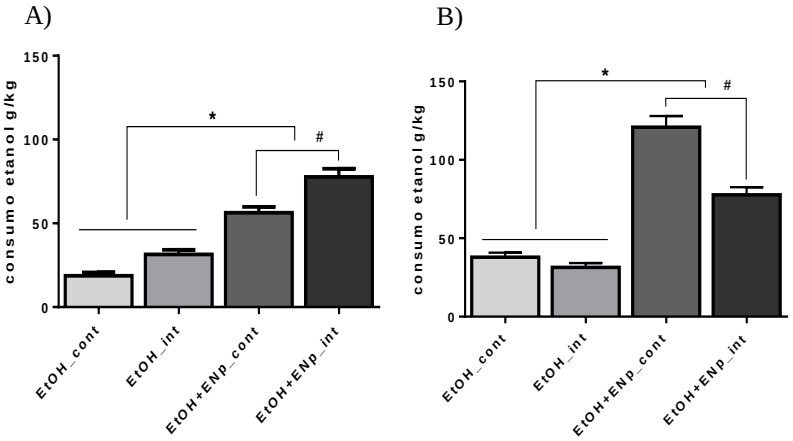
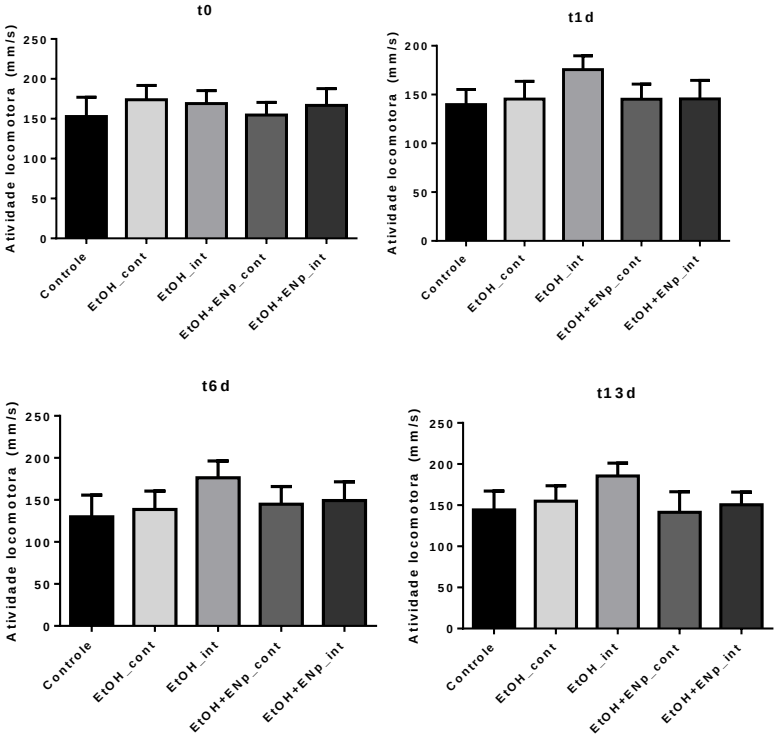


Figura 11. Consumo total de etanol, representados em g/kg de peso corpóreo, após 26 dias de livre-escolha. A) Área sobre a curva do consumo de EtOH da fig. 9. B) Consumo total de EtOH dos grupos contínuos (∑ = 26 dias). As barras representam média ± E.P.M (n = 14 ou 15). * indica diferença significativa entre os grupos EtOH *vs.* EtOH+ENp (ANOVA de 1-via, P < 0,0001); # indica diferença estatística entre EtOH+ENp_cont *vs.* EtOH+ENp_int (P < 0,001).

4.1.3 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente no comportamento locomotor dos animais

A figura 12 ilustra a atividade locomotora basal dos animais ao longo dos 26 dias de livre-escolha. O resultado mostra que o consumo de EtOH ou EtOH+ENp não alterou o comportamento de reatividade a ambiente novo nem a locomoção total de animais expostos a ambas as soluções durante os 26 dias de tratamento. Os animais foram colocados no monitor de atividade por 15 min nos dias 0, 1, 6, 13, 20 e 26 do tratamento. A ANOVA de 1-via revelou que não há diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados: tratamento [F (4, 39) = 0,23; P = 0,91] (n = 14 ou 15).



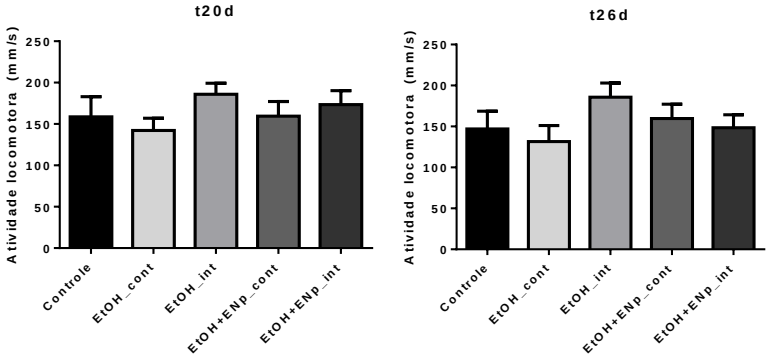


Figura 12. Atividade locomotora dos animais expostos a EtOH ou EtOH+ENp ao longo de 26 dias de consumo livre-escolha. O grupo controle representa animais isolados, sem acesso a EtOH ou EtOH+EDp durante os 26 dias de tratamento. O tempo 0 indica avaliação antes do consumo de EtOH, o dia 1 corresponde avaliação locomotora dos animais após 24 h de acesso à solução de EtOH. As barras representam média ± E.P.M. e os dados estão apresentados em 3 blocos de 5 min (n = 8 a 10). Não houve diferença significativa entre os grupos (primeiros 5 min e tempo total avaliado) (ANOVA de 1-via, P > 0,05).

4.1.4 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente no comportamento tipo-ansiedade avaliado após 24h de abstinência

A tabela 4 ilustra os resultados da avaliação do comportamento tipo-ansiedade no teste de L.C.E. após 24h de abstinência a EtOH ou EtOH+ENp. A ANOVA de 1-via revelou que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros analisados: % entrada nos braços abertos [F (4, 63) = 0,61; P = 0,65]; % tempo nos braços abertos [F (4, 63) = 0,95; P = 0,43]; % entrada nos braços fechados [F (4, 63) = 0,62; 0,65] e % tempo nos braços fechados [F (4, 63) = 0,96; P = 0,43]. O grupo controle são animais isolados e sem exposição a EtOH ou EtOH+ENp durante os 26 dias de livre-escolha; o grupo naïve são animais mantidos em caixas moradias em grupos de 5 animais do mesmo sexo, sem tratamento. (%E.B.A. = % entrada nos braços abertos; %E.B.F. = % entrada nos braços fechados; % T.B.A. = % tempo nos braços abertos; %T.B.F. = tempo nos braços fechados).

Tabela 4. Dados da avaliação do comportamento tipo-ansiedade avaliado 24 h após os 26 dias de exposição livre-escolha de EtOH ou EtOH+ENp em regime contínuo ou intermitente

Grupos / Medidas	Controle	EtOH contínuo	EtOH intermitente	EtOH+ENp contínuo	EtOH+ENp intermitente
%EBA	39,6±3,7	33,2±3,4	38,3±2,3	38,6±2,9	38,7±4,2
%EBF	60±3,7	67±3,4	62±2,3	61±2,9	61±4,0
%TBA	23±2,9	16,2±2,6	21,9±2,3	22,9±2,9	20,6±3,5
%TBF	77±3,0	84±2,7	78±2,3	77±3,0	79±3,5

4.1.5 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente sobre a função cognitiva avaliada no período de abstinência

A figura 13 mostra que animais tratados com solução experimental de EtOH ou EtOH+EDp apresentaram a função cognitiva preservada quando comparado ao grupo controle. Este grupo controle representa animais isolados e sem exposição a EtOH ou EtOH+EDp durante os 26 dias de livre-escolha; o grupo naïve são animais mantidos em caixas moradias em grupo de 5 animais do mesmo sexo, sem tratamento, e usados para validar nosso experimento. A ANOVA de medidas repetidas revelou diferença significativa na interação [$F (5, 61) = 5,195$; $P = 0,0005$], no tempo de investigação dos objetos novo e familiar [$F (1, 61) = 149,0$; $P < 0,001$] e no pareamento [$F (61, 61) = 6,707$; $P < 0,0001$] (Fig. 12-A). A ANOVA de 1-via (Fig. 12-B) revelou que houve diferença significativa no percentual de reconhecimento de objetos entre os grupos [$F (5, 62) = 7,698$; $P < 0,0001$].

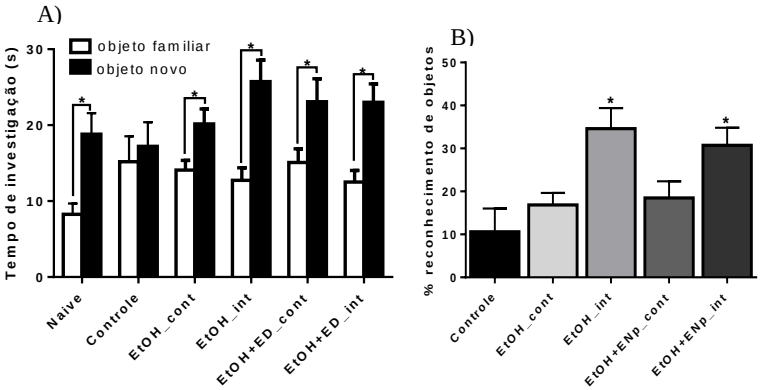


Figura 13. Memória de curta duração avaliada no teste de reconhecimento de objetos após 3 dias de abstinência do consumo voluntário de EtOH ou EtOH+ENp por 26 dias. O percentual de reconhecimento de objetos (RO) foi calculado da seguinte forma: % RO = [(tempo de investigação do objeto novo – tempo de investigação do objeto familiar) / (tempo total de investigação)] * 100. As barras representam a média ± E.P.M. (n = 10 – 12). * representa diferença significativa entre o tempo de investigação dos objetos novo e familiar (ANOVA de medidas repetidas, P < 0,05); # representa diferença significativa comparados aos grupos Controle, EtOH_cont e EtOH+ENp_cont (ANOVA de 1-via, P < 0,001).

4.1.6 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente sobre o comportamento de busca pela novidade no período de abstinência

A figura 14 ilustra o aumento do percentual de busca pela novidade de animais com acesso intermitente a EtOH ou EtOH+ENp no 5º dia de abstinência após 26 dias de consumo voluntário. A ANOVA de 1-via revelou diferença significativa entre os grupos [F (4, 58) = 4,475; P = 0,0032].

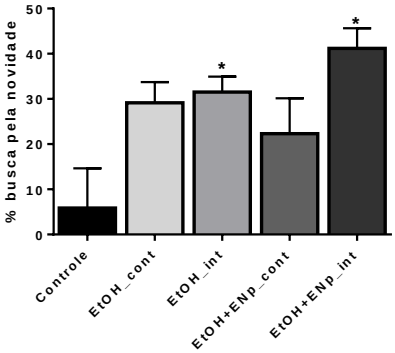


Figura 14. Comportamento de busca pela novidade após 5 dias de abstinência do consumo voluntário de EtOH ou EtOH+ENp por 26 dias. O tempo gasto no compartimento familiar e novo foi usado para o cálculo do percentual de busca pela novidade: %NS = [(tempo gasto no ambiente novo – tempo gasto no ambiente familiar) / 600] * 100. As barras representam a média ± E.P.M. (n = 11 - 13). * indica diferença significativa comparada ao grupo controle (ANOVA de 1-via, P = 0,0032).

4.1.7 Efeito da exposição à associação de EtOH e ENp em regime contínuo ou intermitente sobre os efeitos de privação a etanol avaliado durante o período de abstinência

A figura 15 ilustra o resultado do consumo de EtOH 10% por 48 h consecutivos após 7 dias de abstinência. Os dados mostram que EN não preveniu os efeitos de privação ao EtOH em animais que tiveram acesso intermitente em comparação ao grupo intermitente de EtOH (não houve diferença significativa entre ambos os grupos). Por outro lado, o grupo que teve acesso contínuo à EtOH+ENp sugere que EN pode ter prevenido os efeitos de privação ao EtOH. Isso revela que o padrão tipo-*binge* (grupos intermitentes) aumenta os riscos de recaída ao EtOH. A ANOVA de 1-via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni, revelou diferença significativa no tratamento [F (4, 68) = 6,573, P = 0,0002].

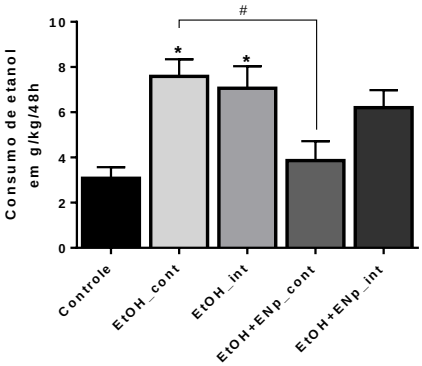


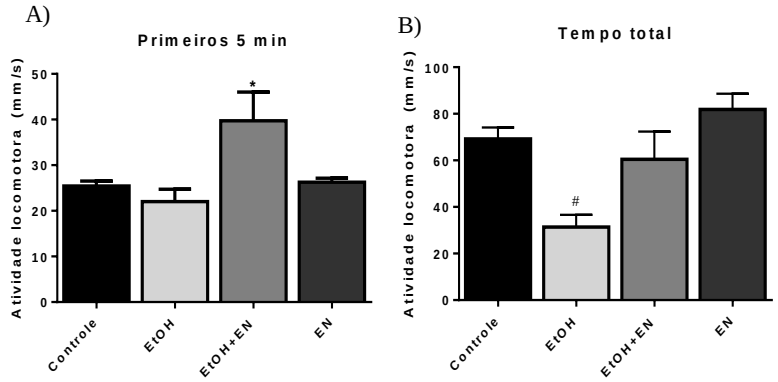
Figura 15. Efeitos de privação ao EtOH após 7 dias de privação do consumo voluntário de EtOH ou EtOH+ENp por 26 dias. As barras representam a média ± E.P.M. das 48 h de consumo de EtOH 10% expressa em g/kg (n = 14 ou 15). * representa diferença significativa comparada ao controle (ANOVA de 1-via, P < 0,001); # representa diferença significativa comparado ao grupo EtOH+EDp_cont (P < 0,01).

4.2 TRATAMENTO INTRAGÁSTRICO (I.G.)

4.2.1 Avaliação da atividade locomotora após administração intragástrica aguda e repetida da associação de EtOH e EN

A figura 16-A ilustra a hiperlocomoção produzida pela administração aguda de EtOH+EN nos primeiros 5 min de avaliação e a hipocolocomoção total produzida por EtOH no dia 1 do tratamento (Fig. 16-B). No 6º dia de tratamento (Fig. 16-C), não houve diferença significativa nos efeitos locomotores produzidos pela administração repetida de ambas as drogas nos primeiros 5 min de avaliação; e apenas houve diferença estatística entre os grupo EtOH e EN (Fig. 16-D). O grupo controle recebeu apenas água. A ANOVA 1-via mostrou diferença significativa no dia 1 em ambos os tempos avaliados [F (3, 43) = 4,880, P = 0,005] (Fig. 16 A e B); e diferença significativa no tempo total avaliado no dia 6 [F (3, 42) = 4,780; P = 0,005] (Fig. 16-D), mas não houve diferença significativa nos primeiros 5 min de avaliação [F (3, 42) = 2,550; P = 0,068] (Fig. 16-C).

Dia 1:



Dia 6:

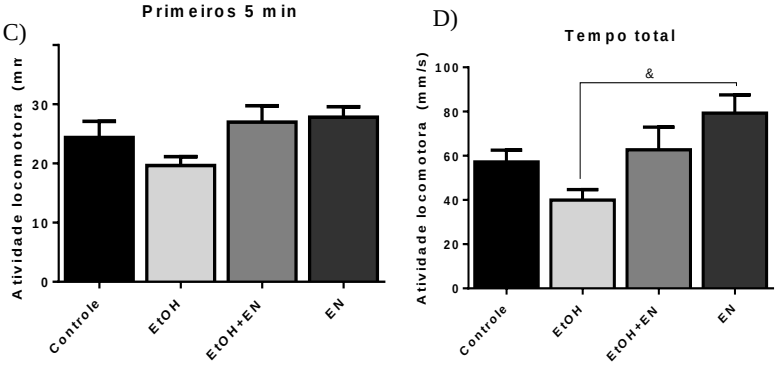


Figura 16. Atividade locomotora de animais submetidos à administração aguda e repetida de EtOH e/ou EN via gavagem. Os animais foram individualmente avaliados no monitor de atividades por 30 min após 15 min da administração i.g. de EtOH (3,4 g/kg/dia) e/ou EN (10,71 ml/kg/dia). A) representa os primeiros 5 min de avaliação dos animais submetidos à administração aguda; B) representa a atividade locomotora total dos animais submetidos à administração aguda; C) representa os primeiros 5 min de avaliação dos animais submetidos à administração via i.g. no dia 6 do tratamento; D) representa a atividade locomotora total dos animais submetidos à administração via i.g. no dia 6 do tratamento. As barras e linhas representam as médias ± E.P.M. de cada grupo (n = 11-13). * indica diferença significativa entre os grupos EtOH+EN *vs.* Controle e EtOH; # indica diferença significativa entre os grupos EtOH *vs.*

Controle e EN; & indica diferença significativa entre EtOH vs. EN (ANOVA de 1-via, P<0,05).

A Tabela 5 ilustra a dose administrada diariamente de cada componente de EN (*Red Bull*) dos grupos EtOH+EN ou EN, submetidos a administração via gavagem. Ambos os grupos (EtOH+EN e EN) receberam a mesma dose de EN.

Tabela 5: Dose diária administrada de cada componente do energético *Red Bull*, representados em mg ou g/kg de peso animal.

COMPONENTES	Dose administrada
taurina (mg/kg)	42,8
cafeína (mg/kg)	3,4
inositol (mg/kg)	2,1
glucuronolactona (mg/kg)	25,7
açúcares (sacarose+glicose) (g/kg)	1,1

4.2.2 Avaliação da função cognitiva após administração intragástrica repetida da associação EtOH e EN

As figuras 17 e 18 ilustram o prejuízo cognitivo produzido pela administração repetida de dose de 3,4 g/kg/dia de EtOH via gavagem. Ambos os testes foram realizados no 3º dia após o tratamento e representam grupos independentes. Para o teste de Reconhecimento de Objetos, a ANOVA de medidas repetidas (Fig. 17-A) revelou diferença significativa na interação [F (3, 41) = 9,9; P < 0,0001], no tempo [F (1, 41) = 16; P = 0,0003] e no pareamento [F (41, 41) = 2,9; P = 0,0005] do tempo de investigação entre os objetos familiar e novo. A ANOVA de 1-via (Fig. 17-B) revelou diferença significativa no tratamento [F (3, 42) = 7,215; P = 0,0005].

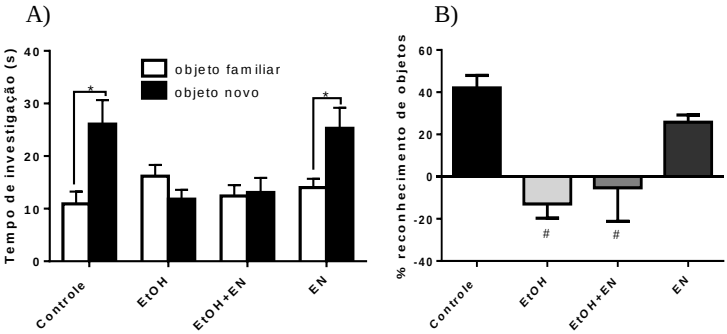


Figura 17. Memória de curta duração avaliada no teste de reconhecimento de objetos após 3 dias do fim das administrações via gavagem. O percentual de reconhecimento de objetos (RO) foi calculado da seguinte forma: % RO = [(tempo de investigação do objeto novo – tempo de investigação do objeto familiar) / (tempo total de investigação)] * 100. As barras representam média ± E.P.M (n = 11 ou 12). * indica diferença significativa entre o tempo de investigação do objeto novo e familiar (ANOVA medidas repetidas, P<0,05); # indica diferença significativa comparada ao grupo controle (ANOVA de 1-via, P = 0,0005).

No teste de discriminação social, a ANOVA de medidas repetidas (Fig. 18-A) revelou diferença significativa na interação [F (3, 36) = 5,3; P = 0,0038], no tempo [F (1, 36) = 23; P < 0,0001] e no pareamento [F (36, 36) = 8,6; P < 0,0001] do tempo de investigação dos animais J1 e J2. A ANOVA de 1-via (Fig. 18 – B) revelou diferença significativa entre os grupos [F (3, 36) = 5,510; P = 0,0032].

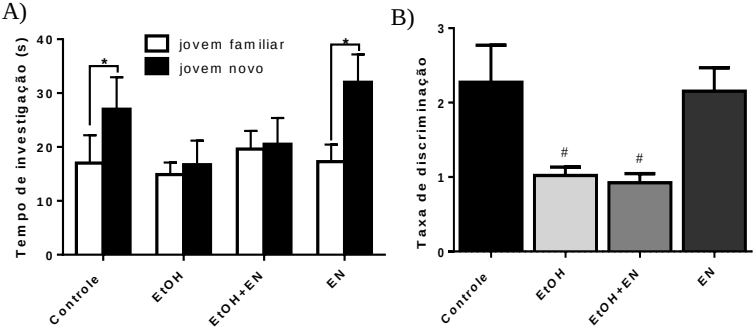


Figura 18. Memória de curta duração avaliada pelo teste de discriminação social após 3 dias do fim do tratamento via gavagem. A taxa de discriminação foi calculada usando a seguinte fórmula: (tempo de investigação de J2/ tempo de investigação de J1). As barras representam média ± E.P.M. (n = 10). * indica

diferença significativa no tempo de investigação entre os jovens novo e familiar (ANOVA de medidas repetidas, P<0,01); # indica diferença significativa comparada ao grupo controle (ANOVA de 1-via, P<0,05).

4.2.3 Avaliação dos efeitos reforçadores de etanol após administração intragástrica repetida da associação de EtOH e EN

A figura 19 ilustra que a pré-exposição à EtOH+EN intragástrica aumentou a preferência dos animais no teste da PCL. Sete dias após o fim do tratamento repetido da associação de EtOH e EN, os animais foram condicionados na PCL através de 10 ciclos de condicionamento (5 pareamentos com a droga alternados com salina). A ANOVA de medidas repetidas (Fig. 19-A) mostra que houve diferença significativa na interação [F (7, 72) = 3,4; P = 0,0024], no tempo [F (1, 72) = 47; P < 0,0001], no tratamento [F (7, 72) = 2,4; P = 0,0284] e no pareamento [F (72, 72) = 1,6; P = 0,0269] dos animais condicionados com EtOH. A ANOVA de 1-via (Fig. 19-B) revelou diferença significativa entre os grupos condicionados com EtOH 1 g/kg [F (3, 36) = 3,076; P = 0,0397].

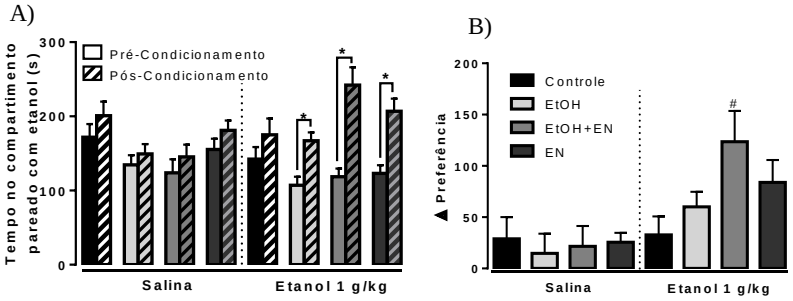


Figura 19. Efeitos reforçadores de EtOH avaliado no teste da PCL em ratos previamente tratados com EtOH e/ou EN via gavagem. O teste iniciou após 7 dias do fim do tratamento via gavagem e consistiu de 2 dias de pré-condicionamento, 10 dias de condicionamento e 1 dia de pós-condicionamento. O tempo gasto no compartimento pareado com EtOH no pré e pós-condicionamento foi mensurado e usado para calcular o índice de Preferência: Δ do tempo gasto no compartimento pareado com EtOH no pré e pós-condicionamento. As barras representam médias ± E.P.M. (n = 8 - 10). * indica diferença significativa entre o tempo gasto no pré e pós condicionamento (ANOVA de medidas repetidas, P < 0,0001); # indica diferença significativa em comparação com o grupo Controle (ANOVA de 1-via, P = 0,0096).

Tabela 6. Resumo de experimentos e resultados

TESTES	RESULTADOS
Consumo voluntário de EtOH ou EtOH+ENp por 26 dias	↑ *Consumo de EtOH dos grupos cont e int de EtOH+ENp comparado aos grupos EtOH*
Atividade locomotora durante o consumo voluntário (c.v.)	*Não houve diferença estatística*
Comportamento tipo-ansiedade após 24h de abstinência (c.v.)	*Não houve diferença estatística*
Memória de curta duração após 3 dias de abstinência (c.v.)	*Não houve déficit cognitivo dos grupos expostos à solução experimental*
Busca pela Novidade após 5 dias de abstinência (c.v.)	*Apenas os grupos com regime intermitente apresentaram maior % NS*
Efeitos de Privação ao EtOH após 7 dias de abstinência (c.v.)	*EN preveniu os efeitos de privação do grupo contínuo*
Atividade locomotora após administração aguda e repetida de EtOH e/ou EN via gavagem (i.g.)	*Hiper e hipolocomoção dos grupos EtOH+EN e EtOH, respectivamente, após administração aguda. Não houve diferença significativa entre os grupos no 6º dia de tratamento.*
Memória de curta duração após 3 dias de abstinência (i.g.)	*Prejuízo cognitivo dos grupos EtOH e EtOH+EN*
Efeitos reforçadores de EtOH após 7 dias de abstinência (i.g.) avaliada no teste de PCL	*Pré-tratamento com EtOH+EN facilitou o condicionamento na PCL*

5 DISCUSSÃO

A hipótese deste trabalho de que o consumo da associação de EtOH e EN pode facilitar a transição para o alcoolismo foi corroborada com os dados do presente estudo. Nossos resultados mostraram que animais submetidos ao consumo voluntário prolongado de EtOH+ENp apresentaram um elevado consumo de EtOH em 24 h de acesso e no total de 26 dias de tratamento quando comparados aos animais expostos apenas a solução de EtOH. Foi também mostrado que o padrão de consumo (contínuo ou intermitente) pode ser um fator relevante para o desenvolvimento da dependência, uma vez que o comportamento de busca pela novidade mostrou-se alterado em animais com acesso intermitente às soluções EtOH ou EtOH+ENp e os efeitos de privação ao EtOH não foram prevenidos em animais com acesso intermitente a EtOH+ENp. Além disso, EN parece não prevenir os prejuízos cognitivos causados pelo EtOH e a pré-exposição à associação EtOH+EN facilitou o condicionamento na PCL com reduzidas sessões de condicionamento.

Segundo os conceitos tradicionais de transição a dependência, o acesso intermitente à solução etanólica neste protocolo simula o perfil binge de consumo de EtOH (consumo escalonar e intensificado) (GEORGE et al., 2012). Esse padrão de consumo é considerado um comportamento de risco para a transição à dependência e alguns estudos mostraram que os repetidos episódios de abstinência podem produzir distúrbios no eixo HPA e aumento da sensibilidade dos receptores glicocorticóides, os quais estão envolvidos na resposta ao estresse (BECKER & HAPPEL, 2012; VENDRUSCOLO et al., 2012; SPANAGEL, 2009).

O resultado da avaliação da atividade locomotora basal dos animais (Fig. 12) foi diferente do esperado. Em um estudo realizado por Tukey et al. (2013), houve elevação da locomoção espontânea de ratos Sprague-Dawley pelo consumo de 25% de sacarose ao longo de 7 dias. Kofman et al. (2008) mostraram que a administração de 1,5 g/ kg/ dia de inositol por três semanas consecutivas aumentou a atividade locomotora basal de roedores. Harvey et al. (2001) mostraram que doze semanas de tratamento com 1,2 mg/ kg de inositol, via oral, em cobaias aumentou a densidade de receptores dopaminérgicos D_2 estriatais. Em nosso estudo, os animais expostos a associação EtOH+ENp consumiram aproximadamente 3,5 a 5 mg/ kg/ dia de inositol durante aproximadamente 4 semanas e a concentração de sacarose da solução

era aproximadamente 11%. Dessa forma, provavelmente a dose de inositol e de sacarose consumida pelos animais em nosso estudo foi subefetiva para causar tal fenômeno ou a resultante da combinação de todos os componentes EtOH+ENp pode ter anulado essas respostas. Mais estudos seriam necessários para avaliar se 26 dias de exposição a essa dose de inositol seria suficiente para alterar a densidade dos receptores dopaminérgicos. Por outro lado, o tratamento crônico com inositol poderia ser interessante para reverter a redução dos níveis de receptores D_2 estriatais de animais dependentes ou de ratos que preferem EtOH (STEFANINI et al., 1992; MCBRIDE et al., 1993). Não foi encontrado nenhum dado na literatura sobre os efeitos da interação de glucuronolactona, taurina e cafeína com EtOH na atividade locomotora basal de roedores em exposição prolongada.

O resultado do consumo voluntário mostra que a associação EtOH+ENp aumentou o consumo total de EtOH (Fig. 9, 11), sem alterar o peso animal. Esses resultados concordam com os dados epidemiológicos realizados em seres humanos – aumento da ingestão de quantidade de EtOH pela associação de EtOH e EN (ARRIA et al., 2011; O´BRIEN et al., 2008; NAIMI et al., 2003; KNIGHT et al., 2002). Diversos fatores podem ter influenciado esse comportamento, como o aumento da palatabilidade de EtOH causado pelos açúcares de EN (aproximadamente 11% de glicose e sacarose) e consequente aumento da ativação da via da recompensa, redução de alguns dos efeitos indesejados de EtOH e/ou algum mecanismo de interação específico entre alguns dos componentes de ENp e EtOH.

Diversos estudos em modelos animais já demonstraram que a sacarose misturado à solução de EtOH pode aumentar o consumo total de EtOH. Mathews et al. (2001) compararam o padrão de consumo de EtOH e a etanolemia de ratos Sprague-Dawley submetidos ao protocolo de livre-escolha em solução de EtOH (6%) combinado com sacarose (10%) ou com sacarina (0,125%). O grupo com acesso a EtOH+sacarose apresentou maior consumo de dose de EtOH em comparação com os grupos expostos a EtOH+sacarina ou EtOH apenas. Czachowski et al. (2003) e Slawecki et al (1997) também encontraram o mesmo efeito no consumo de EtOH em ratos Long-Evans com acesso a EtOH+sacarose. Além disso, esses estudos mostraram que o consumo de EtOH em g/kg aumentou equivalentemente às concentrações alcoólicas na solução de sacarose, sendo mais importante a concentração de sacarose (1 – 20 %) do que de etanol (5 - 20%) na solução no perfil de consumo de EtOH. Portanto, a sacarose per se parece aumentar substancialmente o consumo de EtOH quando ambas estão associadas e de forma proporcional a

concentração alcoólica da solução. Esse aumento do consumo causado pelo aumento da palatabilidade pode também estar relacionado com o aumento da ativação da via da recompensa.

Não apenas alimentos palatáveis podem aumentar a liberação de DA no NAc, como também cafeína, taurina e EtOH (FERRÉ & O´BRIEN, 2011; ERICSSON et al., 2006; AVENA et al., 2004; DAHCHOUR et al., 1996). A cafeína parece potencializar a liberação de DA pelo bloqueio dos receptores pré-sinápticos A_1 nos terminais dopaminérgicos e pelo bloqueio dos receptores A_{2A} pós-sináptico no estriado ventral. Nesta região, os receptores A_{2A} parecem formar dímeros com os receptores D_2 de DA, cuja interação é antagônica, ou seja, o bloqueio de receptores A_{2A} aumentará a função dos receptores D_2 simultaneamente ao aumento da liberação de DA produzido pelo EtOH (FERRÉ & O´BRIEN, 2011). A taurina, por sua vez, parece aumentar a liberação de DA pela ativação direta de GlyR presentes no NAc de forma dependente da ativação concomitante dos receptores nACh (ERICSSON et al., 2010, 2006; MOLANDER & SÖDERPALM, 2005; LOBO et al., 2004). Dessa forma, a associação dessas bebidas (EN+EtOH) possivelmente intensificaria a liberação de DA e a atividade dos receptores dopaminérgicos no estriado ventral, produzindo um efeito estimulante. De fato, a administração i.g. aguda da associação EtOH+EN aumentou a atividade locomotora dos animais nos primeiros 5 min de avaliação no monitor de atividades (Fig. 16-A). Esse aumento responsivo da atividade locomotora dos animais tratados com EtOH+EN poderia também ter uma correlação com o impacto a novidade. Sabe-se que o aumento desse comportamento animal em resposta a um efeito de uma droga de abuso está relacionado com o aumento dos efeitos reforçadores da mesma (BARDO et al., 1996; BARDO & DWOSKIN, 2004; BEVINS, 2001).

Diferente de mostrado por Ferreira et al. (2004) que viram apenas um antagonismo dos efeitos depressores de EtOH na atividade locomotora, em nosso estudo a associação dessas bebidas aumentou a atividade locomotora dos animais nos primeiros 5 min de avaliação (Fig. 16-A). Essas diferenças poderiam ter ocorrido possivelmente pelas diferentes doses de EtOH administrada, a espécie utilizada e/ou a representação dos dados, uma vez que Ferreira et al. (2004) representaram seus dados como média da avaliação dos 45 min divididos em 3 blocos de 15 min. Ferreira et al (2004) administraram uma dose de 2,5 g/ kg (i.g) de EtOH em camundongos, enquanto em nosso estudo foi administrado a dose de 3,4 g/ kg (i.g.) em ratos. A dose de EtOH sobre a locomoção de roedores parece ser importante para os

efeitos de Tau, que parece produzir efeito dose-dependente sobre os efeitos de EtOH (OLIVE, 2002). Aragon et al. (1992) encontraram um aumento da atividade locomotora de ratos Long-Evans tratados com Tau (30, 45 e 60 mg/kg, via oral) pela administração de 2 g/ kg (i.p.) de EtOH no teste de campo aberto, enquanto uma atenuação da locomoção com administração de dose de 1 g/ kg (i.p.) de EtOH na mesma espécie de animais. Ginsburg e Lamba (2008) viram uma atenuação da hiperlocomoção causada pela dose de 1,75 g/ kg de EtOH em associação com 1,75 g/ kg de Tau em camundongos. Esses resultados mostram que a Tau parece produzir efeitos estimulatórios em doses altas de EtOH, e reduzir os efeitos estimulatórios de uma dose baixa de EtOH em roedores. A cafeína associada ao EtOH parece aumentar a atividade locomotora de animais, independente da dose de EtOH administrada (HILBERT et al., 2013; KURIBARA et al., 1992). Portanto, possivelmente a espécie ou dose de EtOH administrada tenha produzido essas divergências.

Outra hipótese para o elevado consumo de EtOH seria pela redução de alguns dos efeitos indesejados de EtOH pelo ENp. Estudos em roedores mostraram que Tau e cafeína podem reduzir os efeitos hipnóticos produzidos pelo EtOH (BOGGAN et al., 1978; YACOUBI et al.; 2003). A cafeína, particularmente, parece reduzir também a ataxia e os efeitos hipnóticos produzidos pelo EtOH, além de modular os efeitos ansiolíticos de EtOH (FERRÉ & O´BRIEN, 2011; PREDIGER et al., 2006, 2004). Portanto, possivelmente a interação desses componentes com EtOH reduziria a aversão produzida pelo consumo de grandes quantidades de EtOH, o que contribuiria também para o elevado consumo de EtOH.

Outros estudos ainda mostraram que a associação de cafeína e EtOH per se poderia aumentar o consumo deste último. Kunin et al. (2000) mostraram um efeito dose-resposta em U invertido de cafeína no consumo de EtOH. A administração de dose de 5 mg/ kg de cafeína (via i.p.) antes de cada sessão de livre-escolha aumentou o consumo de EtOH, enquanto uma dose maior (10 mg/ kg) ou menor (2,5 mg/ kg) não produziu efeito no consumo de EtOH. Gilbert (1979) mostrou que a associação de cafeína na solução alcoólica facilitou o consumo de EtOH em ratos, enquanto De Carvalho et al. (2012) não encontraram diferença entre os animais com acesso a EtOH ou EtOH+cafeína em protocolo livre-escolha. Essas divergências possivelmente se devem a dose de cafeína administrada. Doses elevadas de cafeína, como no estudo realizado por De Carvalho et al. (2012) (animais administraram aproximadamente 40 a 50 mg/ kg de cafeína), parecem não alterar o

consumo de EtOH. Entretanto, doses em torno de 5 mg/ kg de cafeína possivelmente podem aumentar o consumo de EtOH (REZVANI et al., 2013; KUNIN et al., 2000). A dose de cafeína administrada pelos animais em nosso estudo foi de aproximadamente 6 a 8 mg/ kg, ou seja, uma dose que possivelmente pode elevar o consumo de EtOH. Além disso, é possível que um efeito diurético da cafeína possa contribuir para o aumento do consumo de EtOH. No entanto, possivelmente esse efeito seria tênue uma vez que diversos estudos anteriores já demonstraram que a cafeína afeta o perfil de consumo de EtOH de forma dose-dependente.

Estudos sobre os efeitos da interação entre EtOH e inositol ou glucuronolactona ainda são bastante escassas na literatura. A glucuronolactona é um metabólito natural formado através da metabolização de glucose no fígado e parece apresentar um papel positivo no desempenho de ratos testados no nado por exaustão (MCLELLAN & LIEBERMAN, 2012). Além disso, outros estudos sugerem que sua metabolização pelo fígado forma o ácido L-ascórbico, contribuindo com um agente antioxidante (CHATTERJEE et al., 1959; BURNS & EVANS, 1956; EISENBERG & FIELD, 1956). Dessa forma, a glucuronolactona parece aumentar a resistência durante a exaustão e contribuir como antioxidante no combate às espécies reativas de oxigênio produzidas durante o metabolismo de EtOH.

O inositol também deriva da glicose e é considerado um precursor na via metabólica de fosfatidilinositol (IP), um componente importante para os sistemas de sinalização dos receptores acoplados a Proteína G (BRINK et al., 2004). Alguns estudos sugerem que o inositol atua nos receptores serotoninérgicos 5-HT2, sem afetar diretamente as sinapses e os níveis encefálico de monoaminas (EINAT et al., 2001, 1999). Além disso, outros estudos mostraram que o inositol parece apresentar um efeito antidepressivo (BRINK et al., 2004; FISHER et al., 2003; HARVEY et al., 2002; EINAT et al., 2001, 1999).

Ainda sobre o consumo voluntário, é interessante notar que o grupo intermitente de EtOH+ENp parece apresentar um perfil de consumo escalonar mais intensificado do que o grupo intermitente de EtOH (Fig. 9). Uma possível hipótese para tal fenômeno, o qual poderia somar aos episódios de abstinência repetida, seria um possível desenvolvimento de tolerância farmacológica aos efeitos de EtOH e/ou EN, uma vez que estudos prévios já mostraram que indivíduos e animais desenvolvem tolerância aos efeitos de EtOH e cafeína com o uso repetido dessas substâncias. Por esse motivo, a atenuação da atividade locomotora dos animais tratados com EtOH e/ou EN avaliada no 6º dia

de administração intragástrica (Fig. 16 - C e D) poderia ter ocorrido devido ao desenvolvimento da tolerância farmacológica. Dessa forma, a fim de obter um efeito estimulante semelhante ao apresentado no dia 1 (Fig. 16-A), maiores doses de EtOH e/ou EN seriam necessários. No entanto, esse resultado pode também ser interpretado como uma habituação dos animais ao monitor de atividades, não tendo implicação dos componentes de EN ou EtOH sobre a locomoção.

Outro fator relevante dos grupos expostos ao regime intermitente de EtOH ou EtOH+ENp é o desenvolvimento de um comportamento mais aguçado de busca pela novidade (Fig. 14), um comportamento considerado de risco para o desenvolvimento da dependência às drogas (PARKITNA et al., 2013; BECKER & HAPPEL, 2012; GEORGE et al., 2012; VENDRUSCOLO et al., 2012; SPANAGEL, 2009). Esse traço comportamental também foi observado no percentual do teste de RO (Fig. 13-B), um teste também usado para avaliar esse comportamento. Esses resultados mostram que o consumo binge per se é capaz de alterar esse comportamento de risco para o desenvolvimento, seja pela exposição apenas ao EtOH ou a associação de EtOH+ENp.

O déficit cognitivo produzido pelas administrações i.g. de EtOH mostra que EN não preveniu os prejuízos da memória de curta duração (Fig. 17 e 18), apesar dos resultados do consumo voluntário mostrarem déficit cognitivo apenas do grupo controle (Fig. 13-A). Provavelmente esse resultado do grupo controle do consumo voluntário se deve ao isolamento social prolongado dos animais. Diversos estudos mostraram que quatro semanas de isolamento social produz estresse e depressão nos animais, além de ser suficiente para causar diversos danos neuronais, resultando, por exemplo, em prejuízos cognitivos (KAMAL et al., 2014; CIPPITELLI et al., 2012; STRANAHAN et al., 2006; HUONG et al., 2005; LAPIZ et al., 2003; BARTOLOMUCCI et al., 2003; HILAKIVI et al., 1989). Por outro lado, esse resultado confirma os dados da literatura sobre o uso de EtOH para aliviar ou prevenir sintomas emocionais negativos, como ansiedade e disforia (BECKER & HAPPEL, 2012; EDWARDS & KOOB, 2010). No entanto, é necessário ressaltar que o período de 26 dias de exposição ao EtOH ou EtOH+ENp preveniu os danos produzidos no encéfalo pelo estresse prolongado no protocolo livre-escolha. Possivelmente, em uma exposição mais prolongada desses componentes não haveria tal efeito protetor, mas danos neuronais produzidos pela própria exposição ao EtOH. Dessa forma, apesar de animais expostos às soluções experimentais durante o consumo voluntário não terem apresentados déficit cognitivo, o

resultado do tratamento i.g. mostrou que EN não foi efetivo em prevenir os danos cognitivos produzidos por EtOH (Fig. 17 e 18), um efeito deletério comumente observado em consumidores binge. Outro fator que poderia ser relevante para o resultado da DS (Fig. 18) seria um possível prejuízo olfativo dos animais produzidos pelos efeitos deletérios de EtOH. De fato, esse teste comportamental utiliza a capacidade do animal em discriminar o cheiro do animal familiar e o novo. No entanto, como o resultado do teste de RO (Fig. 17) foi semelhante ao de DS, o prejuízo olfativo dos animais tratados com EtOH ou EtOH+EN seria possivelmente tênue.

Apesar dos efeitos neuroprotetores de cafeína e Tau estarem bem estabelecidos na literatura (ESPINOSA et al., 2013; WU & PRENTICE, 2010; DAHCHOUR & DE WITTE, 2000), possivelmente o consumo binge de EN associado ao EtOH não previne dos efeitos deletérios deste último no encéfalo. Considerando que a função do PFC é essencial para as funções executivas dos mamíferos, como o controle inibitório do comportamento e os processos de tomada de decisão, nossos resultados sugerem que consumidores *binge* de EtOH ou EtOH+EN apresentarão danos neuronais equivalentes na função da região frontal do encéfalo. Além disso, possivelmente o consumo de maiores doses de EtOH, como ocorre nos consumidores da associação EtOH+EN, poderia implicar em danos cognitivos ou alterações neurofisiológicas ainda mais graves.

Os efeitos de privação ao EtOH é um teste preditivo para recaída ao uso da droga (MORSE & FLAVIN, 1992) e pode ser considerada um comportamento relevante para a transição à dependência (COLOMBO et al., 2003). A Fig. 15 revelou que a exposição intermitente de EtOH+ENp não preveniu dos efeitos de privação ao EtOH, uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos intermitentes de EtOH ou EtOH+ENp. Os grupos EtOH_cont e EtOH_int apresentaram os efeitos de privação ao EtOH como esperado, uma vez que quatro semanas de exposição ao EtOH em protocolo livre-escolha é capaz de produzir o desenvolvimento desse comportamento (LÊ & SHAHAM, 2002). Os efeitos de privação ao EtOH do grupo intermitente de EtOH+ENp provavelmente se deve aos repetidos episódios de abstinência durante os 26 dias de tratamento, os quais poderiam desregular a função do sistema de estresse e aumentar a motivação na busca pela droga (BECKER & HAPPEL, 2012; VENDRUSCOLO et al., 2012; SPANAGEL, 2009; SANCHIS-SEGURA & SPANAGEL, 2006). Dessa forma, a exposição intermitente ao EtOH ou EtOH+ENp, ou o consumo tipo-binge dessas bebidas,

parece produzir alterações semelhantes para o comportamento de recaída em animais. Curiosamente, EN preveniu esse comportamento em animais expostos ao regime contínuo. No entanto, a falta dos componentes açucarados na solução de EtOH 10% para avaliação dos efeitos de privação pode ter contribuído para uma resposta falso-negativa. Como os animais expostos de forma ilimitada à solução EtOH+ENp não experimentaram episódios de abstinência e apenas foram expostos à solução adocicada de EtOH durante os 26 dias de tratamento, possivelmente o sabor não-palatável do EtOH (sem os açúcares) no teste de efeitos de privação tenha limitado o consumo de EtOH por esse grupo. No entanto, considerando que os grupos EtOH+ENp_cont consumiram doses muito maiores de EtOH comparado ao seu grupo controle de EtOH (EtOH_cont) e o aumento dos efeitos recompensadores de EtOH+EN pela avaliação locomotora dos animais tratados via i.g. (Fig. 16-A) poderia incentivar o comportamento de busca pela droga, não se pode descartar que o consumo prolongado e diário de EtOH+ENp tenha produzido diferentes alterações no sistema de estresse ou na neuroplasticidade produzido pelo consumo repetido de EtOH quando comparado ao seu grupo controle (EtOH_cont). É interessante observar também que os efeitos hedônicos de EtOH ou EtOH+ENp não foram afetados durante o consumo voluntário, uma vez que o consumo de EtOH desse grupo apresentou-se praticamente estável. Dentre os constituintes com possíveis ações sobre esse comportamento, se de fato houve um efeito protetor de ENp sobre os efeitos de privação, seriam novamente a cafeína, o inositol e/ou a Tau.

O inositol parece produzir um alívio dos efeitos de abstinência aguda ao EtOH devido sua ação nos receptores serotoninérgicos. De fato, não houve alteração do comportamento tipo-ansiedade avaliados durante a abstinência aguda em nenhum dos grupos avaliados (tabela 4), mesmo daqueles que consumiram grandes quantidades de EtOH (grupos EtOH+EDp). No entanto, se de fato o efeito de inositol fosse significativo possivelmente haveria uma redução do consumo de EtOH ao longo do consumo voluntário, como mostrado por algumas pesquisas, devido seu efeito antidepressivo (BRINK et al., 2004; EINAT&BELMAKER, 2001; EINAT et al., 2001; LEMARQUAND et al., 1994). Dessa forma, possivelmente os efeitos de inositol sobre a privação ao EtOH seriam tênues.

De Carvalho et al. (2012) mostraram que a associação de EtOH e cafeína (1 g/L) em um protocolo de livre-escolha por 50 dias preveniu os efeitos de privação ao EtOH após 7 dias de abstinência. Porém, a dose de cafeína consumida pelos animais de De Carvalho et al. (2012)

foi de aproximadamente 40 a 50 mg/ kg, cerca de 7 vezes maior do que a dose ingerida pelos animais em nosso estudo (6~8 mg/ kg). Poucos estudos na literatura abordam os efeitos da administração concomitante e prolongada de cafeína e EtOH nos efeitos de privação ao EtOH. Por isso, mais estudos seriam necessários para avaliar se doses menores de cafeína produziria os mesmos efeitos.

A taurina poderia ter algum papel relevante sobre os efeitos de privação. Sabe-se que o antagonismo dos receptores kappa-opióide (KOR) impede o aumento dos níveis de corticosterona, bloqueia o comportamento de busca pela droga induzido pelo estresse, previne o comportamento tipo-depressivo e tipo-ansiogênico induzido pela abstinência, sem afetar os efeitos relacionados à recompensa, como por exemplo, sem alteração do consumo de sacarose ou a estimulação locomotora induzida por morfina na administração de antagonista KOR, como nor-BNI (VEER & CARLEZON JR, 2013). No consumo agudo de EtOH há a ativação de MOR e DOR para produzir os efeitos hedônicos da droga, enquanto a ativação de KOR ocorre durante a abstinência, produzindo os efeitos indesejados de retirada. De acordo com a teoria de motivação de processo-oponente (SOLOMON & CORBIT, 1974), se o EtOH medeia a estimulação de MOR ou DOR para produzir os efeitos hedônicos, então poderia haver um mecanismo compensatório para aumentar DYN ou a função de KOR (SIROHI et al., 2012). No entanto, isso produziria estados afetivos negativos, como o estresse, os quais anulariam os efeitos hedônicos produzidos pelo MOR e DOR. Seria mais coerente pensarmos se não haveria algum mecanismo para bloquear KOR ou inibir a liberação de DYN durante a administração aguda de EtOH a fim de que os efeitos hedônicos produzidos por MOR e DOR seja manifestado.

Alguns estudos mostraram que agonistas KOR parecem reduzir a liberação de DA no NAc e no PFC (SIROHI et al., 2012; SHIPPENBERG et al., 2007), concordando com a nossa hipótese sobre a redução da liberação de DYN ou o bloqueio de KOR durante a administração aguda de EtOH. Ericsson et al. (2010) demonstraram que a administração de EtOH (via i.p.) aumenta a liberação de DA e de Tau no NAc. Outros estudos usando a técnica de microdiálise mostraram que KOR localizados na PFC e VTA também regulam a atividade basal dos neurônios dopaminérgicos mesocorticais (MARGOLIS et al., 2006; TEJEDA et al., 2009). Apesar de ser apenas uma especulação, é possível que a taurina seja capaz de interagir, direta ou indiretamente, em algum mecanismo para reduzir a liberação de DYN, uma vez que a taurina também é encontrado endogenamente no organismo de mamíferos.

Alguns estudos mostraram que a administração (i.p.) de Tau produz alguns efeitos semelhantes aos efeitos produzidos por antagonistas de KOR, como efeito ansiolítico (KONG et al., 2006) e antidepressivo em roedores (IIO et al., 2012; MURAKAMI & FURUSE, 2010; WU & PRENTICE, 2010; KONG et al., 2006; CHEN et al., 2004). Além disso, níveis de Tau parecem estar reduzidos no encéfalo de ratos dependentes ao EtOH (IWATA et al., 1980), ou seja, em animais que estão na fase negativa da retirada da droga. Obviamente mais estudos são necessários para provar essa hipótese, mas se de fato a Tau for capaz de reduzir a liberação de DYN e, consequentemente, reduzir a ativação de KOR, os distúrbios no sistema de estresse poderia ser prevenido, uma vez que o consumo oral de Tau parece elevar os níveis séricos desse aminoácido (ROSA et al., 2013). Um mecanismo molecular que poderia possivelmente estar envolvido seria a ativação dos receptores inibitórios de glicina pela Tau reduziria a liberação de neurotransmissores, incluindo de DYN. Consequentemente, a redução da ativação de KOR preveniria os efeitos de privação ao EtOH (Fig 15). Apesar das discussões dos efeitos isolados dos constituintes do EN, é possível que ocorra uma interação dessas substâncias em conjunto.

A avaliação dos efeitos reforçadores de EtOH no teste de PCL (Fig. 19) mostrou que uma prévia exposição a doses moderadas de EtOH e/ou EN, via gavagem, facilitou o condicionamento no teste da PCL, possivelmente por aumentar a sensibilidade aos efeitos reforçadores de EtOH, uma vez que foram usadas reduzidas sessões de condicionamento. Esses dados estão de acordo com recentes evidências. Ferreira et al (2013) recentemente mostraram que a administração de EtOH e EN em camundongos que apresentam baixa sensibilização locomotora reverteu esse comportamento, ou seja, produziu sensibilização locomotora em camundongos que anteriormente apresentavam baixa sensibilização a dose desafio de EtOH. Hilbert et al. (2013) mostraram aumento da preferência de camundongos C57/B6 condicionados com a associação de cafeína (3 e 15 mg/ kg) e EtOH (1,75 g/ kg) quando comparados a administração dessas drogas isoladamente no teste da PCL. Patkina e Zvartau (1998), por outro lado, viram apenas preferência em doses baixas (1,5 a 3 mg/ kg, i.p.) de cafeína, enquanto que doses maiores (6 a 50 mg/ kg, i.p.) produzia aversão no teste da PCL em ratos. Em nosso estudo, foi administrada uma dose aproximada de 3,5 mg/ kg de cafeína (Tabela 5) em ratos, uma dose que poderia contribuir para a preferência na PCL. A taurina parece também aumentar a preferência na PCL quando condicionados com dose estimulatória de EtOH (1 g/kg), enquanto que em doses aversivas

(>2 g/kg) parecem apenas reduzir os efeitos aversivos do EtOH em ratos (QUERTEMONT et al., 1997). O inositol poderia ter uma ação indireta no reforço. Quando consumido pela dieta, o inositol é incorporado na membrana das células neuronais como fosfolipídio de inositol onde atua como um metabólito precursor para receptores acoplados a Proteína G (HARVEY et al., 2002). Já foi demonstrado por López-Téllez et al. (2010) que a atividade ótima de IP3 é essencial para o funcionamento normal da memória de curta-duração. Além disso, o aumento da plasticidade sináptica resulta de um aumento no potencial de inositol trifosfato (IP3) em produzir a facilitação do potencial de ação evocado pela sinalização de Ca2+, os quais são críticos para a indução de LTP. Este aumento no efeito de IP3, os quais duram por uma semana e não mais que um mês poderia facilitar a memória associativa de drogas durante o condicionamento na PCL e, consequentemente, facilitar a resposta nesse teste (LÓPEZ-TÉLLEZ et al., 2010). O grupo de Zhai et al. (2008) mostraram que a sacarose administrada previamente às sessões de condicionamento suprimiu a expressão da PCL induzida por morfina. Em nosso estudo, os animais receberam administrações de EtOH+EN ou EN uma semana antes do início do condicionamento na PCL com EtOH. Portanto, possivelmente a sacarose não contribuiu para prevenir tal efeito. Não há evidências dos efeitos da glucuronolactona na PCL.

Em suma, nossos resultados da PCL, somados aos resultados anteriores, sugerem que a associação de EtOH e EN pode aumentar os efeitos reforçadores do EtOH e contribuir para o desenvolvimento da dependência.

6 CONCLUSÕES

A associação de EtOH e EN parece facilitar a transição à dependência, uma vez que a exposição à essas bebidas combinadas aumentou o consumo total de EtOH, facilitou a resposta na PCL e aumentou a reatividade do animal após administração aguda da associação EtOH+EN via i.g. Além disso, a exposição tipo-binge de EtOH ou EtOH+EN parece aumentar o comportamento de risco, como a busca pela novidade, produz efeitos de privação ao EtOH e os prejuízos cognitivos semelhantes.

Mais estudos ainda são necessários para entender melhor os mecanismos de ação da interação dos componentes de EN e EtOH. Entretanto, a taurina parece ser alvo promissor em algum efeito protetor de privação a EtOH.

Com base neste trabalho, enfatizamos que o consumo da associação de EtOH e EN deve ser realizada com moderação e precaução, e sua venda e uso restringidos e regulamentados pelos órgãos governamentais de saúde para melhor informação da população e prevenção do desenvolvimento do alcoolismo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFORD C, COX H, WESCOTT R. (2001) The effects of red bull energy drink on human performance and mood. Amino Acids 21(2):139– 50.

ANITEI, M.; SCHUHFRIED, G.; CHRAIF, M (2011). The influence of energy drinks and caffeine on time reaction and cognitive processes in young Romanian students. Procedia - Social and Behav Sci 30, 662 – 670.

ARAGON, C. M. G.; TRUDEAU, L. E.; AMIT, Z. (1992). Effect of taurine on ethanol-induced changes in open-field locomotor activity. Psychopharmacology (Berlin) 107:337–340.

ARRIA, A.M.; CALDEIRA, K.M.; KASPERSKI, S.J. et al (2011). Energy drink consumption and increased risk for alcohol dependence. Alcohol Clin Exp Res. Feb, 35 (2): 365-75.

ASATRYAN, L.; NAM, H.W.; LEE, M.R. et al (2011). Implication of the Purinergic System in Alcohol Use Disorders. Alcohol. Clin. Exp. Res. 35, 584-594.

AVENA, N.M.; LONG, KA.; BARTLEY G.H (2005). Sugar-dependent rats show enhanced responding for sugar after abstinence: Evidence of a sugar deprivation effect. Physiology & Behavior 84, 359–362.

BAICY, K.; LONDON, E.D. (2007). Corticolimbic dysregulation and chronic methamphetamine abuse. Addiction Apr;102 Suppl 1:5-15.

BARDO, M.T.; DONOHEW, R.L.; HARRINGTON, N. G. (1996). Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. Behavioural Brain Research, 77, 23–43.

BARDO M.T.; BEVINS, R.A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? Psychopharmacol 153: 31-43.

BARDO, M. T.; DWOSKIN, L. P. (2004). Biological connection between novelty- and drug-seeking motivational systems. In R. A.

Bevins, & M. T. Bardo (Eds.), Nebraska symposium on motivation: Vol. 50. Motivational factors in the etiology of drug abuse (pp. 127–158). Lincoln, NE: University of Nebraska Press.

BARTOLOMUCCI, A.; PALANZA, P.; SACERDOTE, P. et al (2003) Individual housing induces altered immuno-endocrine response to psychological stress in male mice. Psychoneuroendocrinology 28:540–558.

BECHARA, A (2003). Risky Business: Emotion, Decision-Making, and Addiction. Journal of Gambling Studies, Vol. 19, No. 1, Spring.

BECKER, H.C.; HAPPEL, K.I. (2012). Effects of alcohol dependence and withdrawal on stress responsiveness and alcohol consumption. Alcohol Res. 34(4):448-58.

BERESFORD TP, ARCINIEGAS DB, ALFERS J et al (2006). Hippocampus volume loss due to chronic heavy drinking. Alcoholism, clinical and experimental research 30:1866–70.

BERRY, M. S.; PENTREATH, V. W. (1980) The neurophysiology of alcohol. Psychopharmacology of Alcohol, pp. 43-72, Raven Press, New York.

BEVINS, R. A. (2001). Novelty seeking and reward: Implications for the study of high-risk behaviors. Current Directions in Psychological Science, 10, 189–193.

BEVINS, R.A.; BESHEER, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to sample learning task to study 'recognition memory'. Nat Protoc 1(3):1306-11

BLASI, G.; GOLDBERG, T.E.; WEICKERT, T. et al (2006). Brain regions underlying response inhibition and interference monitoring and suppression. Eur. J. Neurosci, v. 23, p. 1658–1664.

BLEDNOV, Y.A.; STOFFEL, M.; CHANG, S.R. et al (2001) Potassium channels as targets for ethanol: Studies of G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channel 2 (GIRK2) null mutant mice. J Pharmacol Exp Ther 298(2):521–530.

BODHINATHAN, K.; SLESINGER, P.A. (2013). Molecular mechanism underlying ethanol activation of G-protein–gated inwardly rectifying potassium channels. PNAS, November 5, vol. 110, no. 45, p. 18309–18314.

BRINK, CB; VILJOEN, SL; DE KOCK, SE et al. (2004) Effects of myo-inositol versus fluoxetine and imipramine pretreatments on serotonin 5ht2a and muscarinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma cells. Metabolic Brain Disease, Vol. 19, Nos. 1/2, June.
BRUNTON, LL; CHABNER, BA; KNOLLMANN, BC (2011). Inpud: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e.

BURNS, J. J.; EVANS, CC (1956). The synthesis of l-ascorbic acid in the rat from d-glucuronolactone and l-gulonolactone. J. Biol. Chem. 223:897-905.

CAMARINI, R; PIRES, MLN; CALIL, HM. (2000) Involvement of the opioid system in the development and expression of sensitization to the locomotor-activating effect of ethanol. Int J Neuropsychophar 3, 303±309.

CAMPANELLA, S.; PEIGNEUX, P.; PETIT, G.; et al. (2013) Increased cortical activity in binge drinkers during working memory task: a preliminary assessment through a functional magnetic resonance imaging study. PLoS One. Apr 25;8(4):e62260.

CARTA, M.; ARIWODOLA, O.J.; WEINER, J.L.; VALENZUELA, C.F. (2003) Alcohol potently inhibits the kainite receptor-dependent excitatory drive of hippocampal interneurons. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100:6813–6818.

CHATTERJEE, I. B.; CHATTERJEE, G. C.; GHOSH, N. C. et al.(1960) Biological synthesis of l-ascorbic acid in animal tissues: conversion of d-glucuronolactone and l-gulonolactone into l-ascorbic acid. Biochem. J 76, 279.

CHEN, S.W.; KONG, W.X.; ZHANG, Y.J. et al. (2004) Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevated plus-maze. Life Sci 75:1503–11.

CIPPITELLI, A; DAMADZIC, R; HAMELINK, C. et al. (2012) Binge-like ethanol consumption increases corticosterone levels and neurodegneration whereas occupancy of type II glucocorticoid receptors with mifepristone is neuroprotective. Addiction Biology.

COLOMBO, G; SERRA, S; BRUNETTI, G et al (2003). Suppression by baclofen of alcohol deprivation effect in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. Drug and Alcohol Dependence 70, 105-108.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DE SÃO PAULO (2003). Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento. 2 ed. São Paulo/ Associação médica brasileira, p. 33.

CRABBE, J.C.; HARRIS, R.A.; KOOB, G.F. (2011) Preclinical studies of alcohol binge drinking. Ann N Y Acad Sci 1216:24–40.
CREGO, A.; RODRIGUEZ-HOLGUÍN, S.; PARADA, M et al. (2010) Reduced anterior prefrontal cortex activation in young binge drinkers during a visual working memory task. Drug Alcohol Depend. Jun 1;109(1-3):45-56.

CUNHA, R.A. (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: fromA1 receptor activation to A2A receptor blockade. Purinergic Signal 1, 111-134.

CUNHA, R.A. (2008). Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. Neurochem Int 52: 65-72.

CUNNINGHAM, C.L.; FIDLER, T.L.; HILL, K.G. (2000). Animal models of alcohol´s motivational effects. Alcohol Res Health 24:85-92.

CZACHOWSKI, CL.; LEGG, BH.; SAMSON, HH. (2003) Assessment of sucrose and ethanol reinforcement: the across-session breakpoint procedure. Physiology & Behavior 78, 51– 59.

DAHCHOUR, A; QUERTEMONT, E; DE WITTE, P (1996). Taurine increases in the nucleus accumbens microdialysate after acute ethanol administration to naive and chronically alcoholised rats. Brain Research 73, 9-19.

DAHCHOUR, A.; DE WITTE, P. (2000) Taurine blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate of ethanol-dependent rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior, Vol. 65, No. 2, pp. 345–350.

DAI, X.; THAVUNDAYIL, J.; GIANOULAKIS, C. (2005). Differences in the peripheral levels of beta- endorphinin response to alcohol and stress as a function of alcohol dependence and family history of alcoholism. Alcohol.Clin.Exp.Res. 29, 1965–1975.

DALL'LGNA, O. P.; PORCIÚNCULA, LO.; SOUZA, DO. et al (2003). Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of b-amyloid neurotoxicity. British Journal of Pharmacology 138, 1207–1209.

DAR, M.S., MUSTAFA, S.J., WOOLES, W.R., (1983). Possible role of adenosine in the CNS effects of ethanol. Life Sci. 33, 1363– 1374.

DE CARVALHO CR, PANDOLFO P, PAMPLONA FA, et al. (2010) Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats. Behav Brain Res. Mar 17;208(1):231-6.

DE CARVALHO, CR; DA CRUZ, JS; TAKAHASHI, RN (2012). Prolonged Exposure to Caffeinated Alcoholic Solutions Prevents the Alcohol Deprivation Effect in Rats. Journal Of Caffeine Research, V. 2, No 2.

DI CHIARA, G (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. Behav Brain Res 13175 (1-2):75-114

EDENBERG, H.J.; XUEI, X.; CHEN, H.J. et al (2006). Association of alcohol dehydrogenase genes with alcohol dependence: a comprehensive analysis. Hum Mol Genet, 15:1539–1549.

EDWARDS, S.; KOOB, G.F. (2010). Neurobiology of dysregulated motivational systems in drug addiction. Future Neurol. 5:393–401.

EINAT, H.; BELMAKER, R.H.; KOPILOV, M. et al (1999) Rat brain monoamines after acute and chronic myo-inositol treatment. Eur Neuropsychopharmacol;10:27–30.

EINAT, H.; CLENET, F.; SHALDUBINA, A. et al (2001). The antidepressant activity of inositol in the forced swim test involves 5-HT2 receptors. Behavioural Brain Research 118, 77–83.

EINAT, H; BELMAKER, R.H. (2001). The effects of inositol treatment in animal models of psychiatric disorders. Journal of Affective Disorders 62, 113–121.

EISENBERG, F. JR.; FIELD, JB (1956). The enzymatic hydrolysis of glucuronolactone. J. Biol. Chem. 222:293-300.

ENGELMANN M, WOTJAK CT, LANDGRAF R (1995) Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. Physiol Behav 58:315–321.

ERICSON, M; MOLANDER, A; STOMBERG, R et al (2006). Taurine elevates dopamine levels in the rat nucleus accumbens; antagonism by strychnine. European Journal of Neuroscience, V. 23, pp. 3225–3229.

ERICSON, M; CHAU, P; CLARKE, RB. et al (2010). Rising taurine and ethanol concentrations in nucleus accumbens interact to produce dopamine release after ethanol administration. Addiction Biology, 16, 377–385, 2010.

ESPINOSA, J.; ROCHA, A; NUNES, F. et al (2013). Caffeine Consumption Prevents Memory Impairment, Neuronal Damage, and Adenosine A2a Receptors Upregulation in the Hippocampus of a Rat Model of Sporadic Dementia. Journal of Alzheimer's Disease 34, 509–518.

FARR, S.A.; SCHERRER, J.F.; BANKS, W.A. et al (2005). Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. Alcohol Clin Exp Res Jun;29(6):971-82.

FEIL, J.; SHEPPARD, D.; FITZGERALD, P.B et al (2010). Addiction, compulsive drug seeking, and the role of frontostriatal mechanisms in regulating inhibitory control. Neurosci Biobehav Rev, v. 35, 2, p. 248-75.

FEIN G, GREENSTEIN D, CARDENAS VA et al. (2013) Cortical and subcortical volumes in adolescents with alcohol dependence but without substance or psychiatric comorbidities. Psychiatry Res 214:1–8.

FERRÉ, S; O'BRIEN, MC (2011). Alcohol and caffeine: the perfect storm. J of caffeine Res, V.1, N 3

FERREIRA, S.E.; MELLO, M.T.; SOUZA-FORMIGONI, M.L. (2004). Can energy drinks affect the effects of alcoholic beverages? A study with users. Rev Assoc Med Bras 50(1):48– 51.

FERREIRA, S.E.; QUADROS, I.M.H.; TRINDADE, A.A. et al (2004). Can energy drinks reduce the depressor effect of ethanol? An experimental study in mice. Physiology & Behavior 82 (2004) 841–847.

FERREIRA, S.E.; DE MELLO, M.T.; POMPEIA, S. et al (2006). Effects of energy drink ingestion on alcohol intoxication. Alcohol Clin. Exp. Res. 30, 598–605.

FERREIRA, S.E.; ABRAHAO, K.P.; SOUZA-FORMIGONI, ML (2013). Expression of behavioral sensitization to ethanol is increased by energy drink administration. Pharmacol Biochem Behav. Sep;110:245-8

FIELD M, SCHOENMAKERS T, WIERS RW (2008). Cognitive processes in alcohol binges: a review and research agenda. Curr Drug Abuse Rev. Nov;1(3):263-79.

FISHER, SK; NOVAK, JE; AGRANOFF, BW (2002). Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. Journal of Neurochemistry, 2002, 82, 736–754.

FREDHOLM, BB; BÄTTIG, K; HOLMÉN, J et al (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. Pharmacol Rev. 51:83-133

FROSINI, M.; SESTI, C.; DRAGONI, S. et al. (2003) Interactions of taurine and structurally related analogues with the GABAergic system and taurine binding sites of rabbit brain. British Journal of Pharmacology 138, 1163–1171

GARCÍA-BURGOS, D; GONZA´LEZ, F; MANRIQUE, T. et al (2009). Patterns of ethanol intake in preadolescent, adolescent, and adult Wistar rats under acquisition, maintenance, and relapse-like conditions. Alcohol Clin Exp Res. 33:722–728.

GEORGE O, SANDERS C, FREILING J, et al (2012). Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. PNAS, Oct 30;109(44):18156-61.

GIANOULAKIS, C.; KRISHNAN, B.; THAVUNDAYIL, J. (1996). Enhanced sensitivity of pituitary beta-endorphin to ethanol in subjects at high risk of alcoholism. Arch.Gen. Psychiatry 53, 250–257.

GILBERT, RM. (1979) Augmentation of alcohol consumption by caffeine in malnourished rats. J Stud Alcohol. 40:19–27.

GILPIN, NW; KARANIKAS, CA; RICHARDSON, HN (2012). Adolescent binge drinking leads to changes in alcohol drinking, anxiety, and amygdalar corticotropin releasing factor cells in adulthood in male rats. Plos One, Feb. V.7, issue 2, e31466.

GINSBURG, BC.; LAMBA, RJ (2008). Taurine and ethanol interactions: Behavioral effects in mice. European Journal of Pharmacology V. 578, Issues 2–3, 14 Jan p. 228–237.

GOLDBERG, L. (1943). Quantitative studies on alcohol tolerance in man. Acta Physiologica Scandinavica Supplementum 5, 1–128.

HANSON, D.J. (1995) Preventing Alcohol Abuse: Alcohol, Culture, and Control. Westport, CT: Praeger. Alcoholism 27, 127–130.

HARPER, C; MATSUMOTO, I (2005). Ethanol and brain damage. Current Opinion in Pharmacology 5:73–78.

HARRIS, R.A.; TRUDELL, J.R.; MIHIC, S.J. (2008). Ethanol's molecular targets. Sci. Signal. 1, re7.

HARVEY, BH.; SCHEEPERS, A; BRAND, L et al (2001). Chronic inositol increases striatal D2 receptors but does not modify

dexamphetamine-induced motor behavior Relevance to obsessive±compulsive disorder. Pharm Bioch and Beh 68 245-253.

HARVEY, B.H.; BRINK, C.B.; SEEDAT, S. et al (2002). Defining the neuromolecular action of myo-inositol Application to obsessive–compulsive disorder. Progress in Neuro-Psychopharm & Biol Psych 26, 21– 32.

HAYES, KC; STURMAN ,JA (1981). Taurine deficiency: a rationale for taurine depletion. Adv Exp Med Biol. 1981;139: 79-87.

HERZ, A. (1997). Endogenous opioid systems and alcohol addiction. Psychopharmacology (Berl). Jan;129(2):99-111.

HILAKIVI, L.A.; OTA, M.; LISTER, R.G. (1989) Effect of isolation on brain monoamines and the behavior of mice in tests of exploration, locomotion, anxiety and behavioral ‘despair’. Pharmacol Biochem Behav 33(2):371–374.

HILBERT, M.L.T.; MAY, C.E.; GRIFFIN III, W.C. (2013). Conditioned reinforcement and locomotor activating effects of caffeine and ethanol combinations in micePharmacology, Biochemistry and Behavior 110, 168–173.

HILL, K.G.; ALVA, H.; BLEDNOV, Y.A.; CUNNINGHAM, C.L. (2003) Reduced ethanol-induced conditioned taste aversion and conditioned place preference in GIRK2 null mutant mice. Psychopharmacology (Berl) 169(1):108–114.

HOWLAND, J; DAMARIS, R.J (2012). Risks of Energy Drinks Mixed With Alcohol. Jama J 1-2.

HUONG, N.T.; MURAKAMI, Y.; TOHDA, M. et al (2005). Social isolation stress-induced oxidative damage in mouse brain and its modulation by majonoside-R2, a Vietnamese ginseng saponin. Biol Pharm Bull. Aug;28(8):1389-93.

IIO, W; MATSUKAWA, N; TSUKAHARA, T et al (2012). The effects of oral taurine administration on behavior and hippocampal signal transduction in rats. Amino Acids, 19 April 2012.

IWATA, H.; MATSUDA, T.; LEE, E. et al (1980). Effect of ethanol on taurine concentration in the brain. Experientia 36, Birkh~iuser Verlag, Basel.

IZIDIO, GS; LOPES, DM; SPRICIGO, L Jr, et al (2005). Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. Genes Brain Behav. 2005 Oct;4(7):412-9.

JARJOUR, S.; BAI, L.; GIANOULAKIS, C.(2009). Effect of acute ethanol administration on the release of opioid peptides from the mid-brain including the ventral tegmental area. Alcohol.Clin.Exp.Res. 33, 1033–1043.

JOSLYN, G.; BRUSH, G.; ROBERTSON, M. et al (2008). Chromosome 15q25.1 genetic markers associated with level of response to alcohol in humans. Proc Natl Acad Sci USA, 105:20368–20373.

KALIVAS, P.W.; STEWART, J. (1991). Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. Brain Res Brain Res Rev. 1991 Sep-Dec;16(3):223-44.

KAMAL, A.; RAMAKERS, G.M.; ALTINBILEK, B. et al (2014). Social isolation stress reduces hippocampal long-term potentiation: Effect of animal strain and involvement of glucocorticoid receptors. Neuroscience. Jan 3;256:262-70.

KNIGHT, JR; WECHSLER, H; KUO, M. et al.(2002). Alcohol abuse and dependence among U.S. college students. J Stud Alcohol. 2002 May;63(3):263-70.

KOFMAN, O; AGAM, G; SHAPIRO, J et al (1998). Chronic dietary inositol enhances locomotor activity and brain inositol levels in rats. Psychopharm 139: 239-242.

KONG, W; CHEN, SW; LI, YL et al (2006). Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 83, 271–276.

KOOB GF, LE MOAL M (1997). Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. Science 278:52–58

KOOB, G.F. (2000). Animal Models in Craving Research. Addiction 95, (Supplement 2), S73-S81.

KOOB, G.F.; LE MOAL, M (2006). Neurobiology of Addiction. Academic Press, Elsevier Inc., London.

KOOB, G.F. (2013). Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder. Front Psych, Aug, V. 4, Article 72.

KPONEE KZ, SIEGEL M, JERNIGAN DH (2014). The use of caffeinated alcoholic beverages among underage drinkers: Results of a national survey. Addict Behav., Jan;39(1):253-8

KUNIN, D; GASKIN, S; ROGAN, F. et al (2000). Caffeine promotes ethanol drinking in rats. Examination using a limited-access free choice paradigm. Alcohol.21: 271–277.

KURIBARA H, ASAHI T, TADOKORO S (1992). Ethanol enhances, but diazepam and pentobarbital reduce the ambulation-increasing effect of caffeine in mice. Arukoru Kenkyuto Yakubutsu Ison., 1992 Oct;27(5):528-39.

KUZMIN, A; LILJEQUIST, S; MEIS, J et al (2011). Repeated moderate-dose ethanol bouts impair cognitive function in Wistar rats. Addiction Biology, 2011; 17, 132–140

LAM, M.P., MARINELLI, P.W.; BAI, L. et al. (2008). Effects of acute ethanol on opioid peptide release in the central amygdala: an in vivo microdialysis study. Psychopharmacology(Berl.) 201, 261–271.

LAPIZ MDS, FULLORD A, MUCHIMAPURA S, et al (2003) Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. Neurosci Behav Physiol 33(1):13–29.

LÊ, A.D.; SHAHAMB, Y (2002). Neurobiology of relapse to alcohol in rats. Pharmacology & Therapeutics 94, 137– 156.

LEMARQUAND, D; PIHL, RO; BENKELFAT, C (1994). Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. Biol Psychiatry 36: 395–421.

LESLIE, FM; MOJICA, CY; REYNAGA, DD (2013). Nicotinic Receptors in Addiction Pathways. Mol Pharmacol 83:753–758, April.
LEVANTAMENTO NACIONAL DE ÁLCOOL E DROGAS (LENAD - II). Consumo de álcool no Brasil: tendências entre 2006 e 2012. INPAD. 2012.

LIN, C-T.; SU, Y.T.; SONG, G-X et al (1985). Is taurine a neurotransmitter in rabbit retina? Brain Res 337:293-298.

LIU, J.; YANG, AR; KELLY, T. et al (2011). Binge alcohol drinking is associated with GABAA α2-regulated Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in the central amygdala. PNAS March, v. 108, no. 11, 4465–4470.

LOBO, I.A; MASCIA, M.P.; TRUDELL, J.R. et al (2004). Channel gating of the glycine receptor changes accessibility to residues implicated in receptor potentiation by alcohols and anesthetics. J. Biol. Chem. 279:33919-33927.

LÓPEZ-TÉLLEZ, JF.; LÓPEZ-ARANDA, MF.; NAVARRO-LOBATO, I et al (2010). Prefrontal Inositol Triphosphate Is Molecular Correlate of Working Memory in Nonhuman Primates. The Journal of Neuroscience, Feb 24, 30(8):3067–3071.

LOVINGER, D.M., (1997). Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 356, 267-282.

MARDONES J, SEGOVIA N, HEDERRA A (1953) Heredity of experimental alcohol preference in rats. II. Coefficient of heredity. Q J Stud Alcohol 14:1–2.

MARGOLIS, EB; LOCK, H; CHEFER, VI et al (2006). Kappa opioids selectively control dopaminergic neurons projecting to the prefrontal cortex. PNAS, 103:2938–42.

MARINELLI, P.W.; QUIRION, R., GIANOULAKIS, C.(2003).A microdialysis profile of beta- endorphin and catecholamines in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. Psychopharmacology (Berl.) 169, 60–67.

MARINELLI, P.W.; QUIRION, R., GIANOULAKIS, C.(2004). An in vivo profile of beta-endorphin release in the arcuate nucleus and nucleus accumbens following exposure to stress or alcohol. Neuroscience 127, 777–784.

MARINELLI, P. W.; BAI, L.; QUIRION, R.; GIANOULAKIS, C. (2005). A microdialysis profile of Met-enkephalin release in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. Alcohol.Clin.Exp. Res. 29, 1821–1828.

MARINELLI, P. W.; LAM, M.; BAI, L.; et al. (2006). A microdialysis profile of dynorphin A (1-8) release in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. Alcohol.Clin. Exp.Res. 30, 982–990.

MATTHEWS, DB.; OVERSTREET, DH.; REZVANI, AH.et al (2001). Effects of sweetened ethanol solutions on ethanol self-administration and blood ethanol levels. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 68, 13±21.

MAURAGE, P; JOASSIN, F; SPETH, A et al (2012). Cerebral effects of binge drinking: respective influences of global alcohol intake and consumption pattern. Clin Neurophysiol. May;123(5):892-901.

MCBRIDE, W. J.; CHERNET, E.; DYR, W. et al (1993). Densities of dopamine D2 receptors are reduced in CNS regions of alcohol-preferring P rats. Alcohol 10, 387–390.

MCCLEARN GE, RODGERS DA (1959) Differences in alcohol preference among inbred strains of mice. Quart J Stud Alcohol 20:691–695.

MCKEE, M. Alcohol in Russia. Alcohol Alcoholism (1999), v.34, n.6, p.824-829.

MCLELLAN, T.M.; LIEBERMAN, H.R. (2012). Do energy drinks contain active components other than caffeine? Nutr Rev. Dec;70(12):730-44.

MEDINA KL, MCQUEENY T, NAGEL BJ, et al (2008). Prefrontal cortex volumes in adolescents with alcohol use disorders: unique gender effects. Alcohol Clin Exp Res 2008;32:386–94.

MOLANDER, A.; SÖDERPALM, B. (2005). Accumbal strychnine-sensitive glycine receptors: an access point for ethanol to the brain reward system. Alcohol. Clin. Exp. Res. 29, 27–37.

MONTEROSSO JR, ARON AR, CORDOVA X et al (2005). Deficits in response inhibition associated with chronic methamphetamine abuse. Drug Alcohol Depend. Aug 1;79(2):273-7. Epub 2005 Mar 31.

MONTGOMERY KC (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exporatory behavior. J Comp Physiol Psychol 48:254-260.

MORALES, M.; PICKEL, VM (2011). Insights to drug addiction derived from ultrastructural views of the mesocorticolimbic system. Ann N Y Acd Sci., 2011.

MORSE, R.M., FLAVIN, D.K. (1992). The definition of alcoholism. J. Am. Med. Assoc. 268, 1012-1014.

MURAKAMI, T.; FURUSE, M (2010). The impact of taurine- and beta-alanine-supplemented diets on behavioral and neurochemical parameters in mice: antidepressant versus anxiolytic-like effects. Amino Acids 39:427–434.

NAGY, L.E. (2004) MOLECULAR ASPECTS OF ALCOHOLMETABOLISM: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury. Annu. Rev. Nutr. 24:55–78.

NAIMI TS, et al. (2003) Binge drinking among US adults. JAMA 289(1):70–75

NAM, HW; BRUNER, RC.; CHO, DS (2013). Adenosine Signaling in Striatal Circuits and Alcohol Use Disorders. Mol. Cells 36, 195-202, Sept 30.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (2004) NIAAA Council approves definition of binge drinking. NIAAA Newsletter 04-5346(3).

NESTLER, E.J. (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? Nat. Neu-rosci. 8, 1445–1449.

NESTLER, E.J., CARLEZON, W.A.JR.(2006).Themesolimbic dopamine reward circuit in depression. Biol. Psychiatry 59, 1151–1159. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.09.018

NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E.; MALENKA, R.C (2009). Molecular neuropharmacology: A foundation for a clinical neuroscience. 2 ed., Mc GrawHill.

NORMAN, G., EACOTT, M.J. (2004). Impaired object recognition with increasing levels of feature ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. Behav Brain Res 148, 79-91.

O'BRIEN, MC; MCCOY, TP; RHODES, SD et al (2008). Caffeinated Cocktails: energy drink consumption, high-risk drinking, and alcohol-related consequences among college students. Acad Emerg Med 2008; 15:453–460.

O'BRIEN, ES; LEGASTELOIS, R; HOUCHI, H. et al (2011). Fluoxetine, Desipramine, and the Dual Antidepressant Milnacipran Reduce Alcohol Self-Administration and/or Relapse in Dependent Rats. Neuropsychopharm 36, 1518–1530.
OLIVE, M. F. (2002) Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system. Amino Acids 23: 345–357.

OTERI, A; SALVO, F; CAPUTI, AP et al (2007). Intake of Energy Drinks in Association With Alcoholic Beverages in a Cohort of Students of the School of Medicine of the University of Messina. Alcohol Clin Exp Res, Vol 31, No 10, pp 1677–1680.

PANDOLFO, P.; VENDRUSCOLO, L.F.; SORDI, R. et al (2009). Cannabinoid-induced conditioned place preference in the spontaneously hypertensive rat-an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. Psychopharm (Berl). 2009 Aug;205(2):319-26.

PARADA, M.; CORRAL, M.; MOTA, N et al (2012). Executive functioning and alcohol binge drinking in university students. Addict Behav. Feb;37(2):167-72.

PATKINA, NA; ZVARTAU, EE (1998). Caffeine place conditioning in rats: comparison with cocaine and ethanol. Eur Neuropsychopharm 8, 287–291.

PARKITNA JR, SIKORA M, GOŁDA S et al (2013). Novelty-seeking behaviors and the escalation of alcohol drinking after abstinence in mice are controlled by metabotropic glutamate receptor 5 on neurons expressing dopamine d1 receptors. Biol Psychiatry. Feb 1;73(3):263-70.

PATZ, MD.; DAY, HE.W.; BUROW, A et al (2006). Modulation of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis by caffeine. Psychoneuroendocrinology 31, 493–500.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. et al (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Meth 14: 149-167.

PETIT, G; MAURAGE, P; KORNREICH, C. et al (2013). Binge Drinking in Adolescents: A Review of Neurophysiological and Neuroimaging Research. Alcohol and Alcoholism Vol. 0, No. 0, pp. 1–9.

PIAZZA, PV; DEROCHE-GAMONET, V (2013). A multistep general theory of transition to addiction. Psychopharmacology (Berl) Oct;229(3):387-413.

PIRES, V.A.; PAMPLONA, F.A.; PANDOLFO, P. et al (2010). Chronic caffeine treatment during prepubertal period confers long-term cognitive benefits in adult spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Behavioural Brain Research 215 (2010) 39–44.

PREDIGER RD, BATISTA LC, TAKAHASHI RN (2004). Adenosine A1 receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. Eur J Pharmacol 499: 147–154.

PREDIGER, RD; SILVA, GE da; BATISTA, LC. et al (2006). Activation of Adenosine A1 Receptors Reduces Anxiety-Like Behavior During Acute Ethanol Withdrawal (Hangover) in Mice. Neuropsychopharm 31, 2210–2220.

PREDIGER, RD (2010). Effects of caffeine in Parkinson's disease: from neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. J Alzheimers Dis. 2010;20 Suppl 1:S205-20.

QUERTEMONT, E; GOFFAUX, V; VLAMINCK, AM et al (1998). Oral Taurine Supplementation Modulates Ethanol-Conditioned Stimulus Preference. Alcohol, Vol. 16, No. 3, pp. 201–206.

REID, LD; HUNTER, GA (1984). Morphine and naloxone modulate intake of ethanol. Alcohol. Jan-Feb; 1 (1):33-7.

REISSIG, C.J.; STRAIN, E.C.; GRIFFITHS, R.R (2009). Caffeinated energy drinks—A growing problem. Drug and Alcohol Dependence 99, 1–10.

REZVANI, A.H.; SEXTON, H.G.; JOHNSON, J. et al (2013). Effects of caffeine on alcohol consumption and nicotine self-administration in rats. Alcohol Clin Exp Res. Sep; 37(9): 1609-17.

RICHTER CP, CAMPBELL KH (1940) Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats. Science 91:507–508.

ROBBINS, T.W., ERSCHE, K.D., EVERITT, B.J. (2008). Drug addiction and the memory systems of the brain. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1141, 1-21

RODGERS, R.J.; DALVI, A (1997). Anxiety, defence and the elevated plus- maze. Neurosci Biobehav Rev, 21: 801–810.

ROSA, FT; FREITAS, EC; DEMINICE, R.et al (2013). Oxidative stress and inflammation in obesity after taurine supplementation: a double-blind, placebo-controlled study. Eur J Nutr. Sep 25.

SANCHIS-SEGURA C, SPANAGEL R (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. Addiction Biology 2006; 11:2–38.

SEIDL, R.; PEYRL, A.; NICHAM, R. et al (2000). A taurine and caffeinecontaining drink stimulates cognitive performance and well-being. Amino Acids 2000;19(3–4):635– 42.

SESACK, SR; GRACE, AA (2010). Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. Neuropsychopharm (2010) 35, 27–47.

SIMMS, J.A. et al. (2008) Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. Alcohol Clin Exp Res 32(10):1816–1823.

SIROHI, S; BAKALKIN, G; WALKER, BM (2012). Alcohol-induced plasticity in the dynorphin/ kappa-opioid receptor system. Frontiers in Mol Neurosc Sept, V.5, Article 95.

SLAWECKI, CJ; SAMSON, HH; HODGE, CW (1997). Differential changes in sucrose/ethanol and sucrose maintained responding by independently altering ethanol or sucrose concentration. Alcohol Cliii Exp Res, Val 21, No 2, pp 250-260.

SMITH, J.E.; CO, C.; MCINTOSH, S. et al (2008). Chronic binge-like moderate ethanol drinking in rats results in widespread decreases in brain serotonin, dopamine, and norepinephrine turnover rates reversed by ethanol intake. J Neurochem S2134-2155.

SOLOMON, R. L; CORBIT, J .D. (1974). An opponent-process theory of motivation. I. Temporal Dynamics of affect. Psychol.Rev. 81, 119–145.

SPANAGEL, R (2009). Alcoholism: A Systems Approach From Molecular Physiology to Addictive Behavior. Physiol Rev 89: 649–705.

STEFANINI, E.; FRAU, M.; GARAU, M. G. et al. (1992). Alcohol-preferring rats have fewer dopamine D2 receptors in the limbic system. Alcohol and

STEKETEE, J. D.; KALIVAS, P. W. (2011). Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. Pharmacol.Rev. 63, 348– 365. doi:10.1124/pr.109.001933

STEPHENS, D.N.; DUKA, T. (2008). Cognitive and emotional consequences of binge drinking: role of amygdala and prefrontal cortex. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Oct 12;363(1507):3169-79.

STOCK, AK; BESTE, C (2013). Binge drinking and the differential influence of ethanol on cognitive control subprocesses: a novel field of neurotoxicology. Arch Toxicol, Nov

STRANAHAN AM, KHALIL D, GOULD E (2006) Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. Nat Neurosci 9(4):526–533.

TABAKOFF, B., HOFFMAN, P.L., (1996). Alcohol addiction: an enigma among us. Neuron 16, 909-912.

TAPERT SF, BROWN GG, BARATTA MV, et al (2004). FMRI bold response to alcohol stimuli in alcohol dependent young women. Addict Behav 29:33–50.

TEJEDA, HA (2009). Modulation of Extracellular Dopamine in the Pre-frontal Cortex by Local and Ventral Tegmental Area Kappa-Opioid Receptors. Society for Neuroscience Meeting, Chicago. Abstract no: 751.7.

THOMAS, M.J., KALIVAS,P.W.; SHAHAM, Y.(2008). Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. Br. J. Pharmacol. 154, 327–342.doi: 10.1038/bjp.2008.77

THOMBS, DL; O'MARA, RJ; TSUKAMOTO, M. et al (2010). Event-level analyses of energy drink consumption and alcohol intoxication in bar patrons. Addictive Behaviors 35, 325–330.

TUKEY, DS; FERREIRA, JM; ANTOINE, SO et al (2013). Sucrose ingestion induces rapid AMPA receptor trafficking. J Neurosc April 3, 33(14):6123– 6132.

TZSCHENTKE TM (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. Addict Biol, 12:227-462.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SÃO PAULO (UNESP VIRTUAL, 2002). Disponível em < http://www.virtual.epm.br/material/depquim/4flash.htm>. Acesso dia 28 jan 2014.

VEER, V; CARLEZON WA JR (2013). Role of kappa-opioid receptors in stress and anxiety-related behavior. Psychopharm (Berl). Oct;229(3):435-52.

VENDRUSCOLO, LF; GUEYE, AB; VENDRUSCOLO, JCM et al (2010). Reduced alcohol drinking in adult rats exposed to sucrose during adolescence. Neuropharm 59, 388 - 394.

VENDRUSCOLO LF, BARBIER E, SCHLOSBURG JE et al (2012). Corticosteroid-dependent plasticity mediates compulsive alcohol drinking in rats. J Neurosci. May 30; 32(22): 7563-71.

VERDEJO-GARCÍA, A.; RIVAS-PÉREZ, C.; LÓPEZ-TORRECILLAS, F. et al (2006). Differential impact of severity of drug use on frontal behavioral symptoms. Addict Behav, v. 31, p. 1373–1382.

WARD, R.J; KEST, W.; BRUYEER, P (2001). Taurine modulates catalase, aldehyde dehydrogenase, and ethanol elimination rates in rat brain. Alc and Alcohol, v. 36, n.1, p.39-43.

WATANABE, A; HOBORA, N; NAGASHIMA, H. (1985). Lowering of liver acetaldehyde but not etanol concentration by pretreatment with taurine in ethanol-loaded rats. Experientia 41, 1421-1422.

WATSON DJ, MARSDEN CA, MILLAN MJ et al (2012). Blockade of dopamine D_3 but not D_2 receptors reverses the novel object discrimination impairment produced by post-weaning social isolation: implications for schizophrenia and its treatment. Int J Neuropsychopharm. May;15(4):471-84.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (OMS). Alcohol and Injury in Emergency Departments: Summary of the Report from the WHO Collaborative Study on Alcohol and Injuries, WHO: Geneva, Switzerland, 2011. Disponível em <http://www.who.int/en/>, acesso dia 22 Out 2013.

WU, JY; PRENTICE, H (2010). Role of taurine in the central nervous system. Journal of Biomedical Science, 17(Suppl 1):S1.

XIAO L, BECHARA A, GONG Q et al. (2013) Abnormal affective decision making revealed in adolescent binge drinkers using a functional magnetic resonance imaging study. Psychol Addict Behav 27:443–54.

YACOUBI, M. EL; LEDENT, C.; PARMENTIER, M. et al (2003). Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A2A receptor blockade. Neuropharm 45, 977–985.

YÜCEL, M.; LUBMAN, D.I (2007). Neurocognitive and neuroimaging evidence of behavioural dysregulation in human drug addiction: implications for diagnosis, treatment and prevention. Drug Alcohol Rev, v. 26, p. 33–39.

ZAHR, NM; MAYER, D; ROHLFING, T. et al (2014). Rat strain differences in brain structure and neurochemistry in response to binge alcohol. Psychopharm 231:429–445.

ZHAI, H; WU, P; XU, C (2008). Blockade of cue- and drug-induced reinstatement of morphine-induced conditioned place preference with intermittent sucrose intake. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 90, 404–408.