



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

ANA CLARA CAETANO SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA NAS
RESPOSTAS NEUROCOMPORTAMENTAIS DO TIPO ANSIOSAS EM
CAMUNDONGOS ADOLESCENTES**

Uberlândia

2025

ANA CLARA CAETANO SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA NAS RESPOSTAS
NEUROCOMPORTAMENTAIS DO TIPO ANSIOSAS EM CAMUNDONGOS
ADOLESCENTES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Molini Leão

Coorientador: Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel

Uberlândia

2025

Dedico este trabalho aos meus pais, que sob muito sol, fizeram-me chegar até aqui, na sombra. Que deixaram de viver os próprios sonhos para que eu pudesse sonhar os meus. Sem vocês, nada disso teria sido vivido.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a luz em meu caminho, a força nos momentos difíceis e a paz que me guiou até aqui. Sem Sua graça e amparo, esta jornada não teria sido possível.

Aos meus pais, Gizele e Vicente, por cada sacrifício silencioso, cada renúncia e cada palavra de incentivo. Vocês são a base sobre a qual construí meus sonhos, e este trabalho é, em parte, fruto do amor e paz que sempre me ofereceram.

Ao meu irmão, Mateus Caetano, pela cumplicidade, por ser companhia nos momentos bons e apoio nos desafios. Pelas palavras de incentivo, pelos gestos de carinho e por, de alguma forma, sempre estar presente nesta caminhada. Sua presença tornou tudo mais leve e significativo.

Ao meu namorado, Arthur Prates, por ser meu porto seguro em meio às incertezas, por me oferecer todo o apoio emocional nos momentos de cansaço e desânimo. Sua paciência, compreensão e incentivo foram fundamentais para que eu seguisse firme até o fim desta caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Molini Leão, e coorientador, Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel, sou imensamente grata pela paciência, pelo conhecimento compartilhado e por acreditarem no potencial deste trabalho. Vocês foram fundamentais para a concretização deste estudo e para todo o aprendizado ao longo do caminho.

Aos meus colegas de laboratório, Caio Jovita, Caio Arend e Luís Felipe Costa, pela parceria, pelo apoio e por cada momento compartilhado ao longo desta jornada. O convívio com vocês tornou o ambiente de pesquisa mais enriquecedor, colaborativo e inspirador.

Aos meus professores, da graduação e de etapas anteriores, que me inspiraram a buscar sempre mais conhecimento.

A UFU, ao ICBIM e ao DEFAR, por proporcionarem a estrutura necessária para a consolidação desta pesquisa.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os transtornos relacionados ao uso de álcool configuram um grave problema de saúde pública global, sendo o consumo precoce durante a adolescência um fator de risco importante para o desenvolvimento da dependência. Essa fase é marcada por intensas mudanças encefálicas, como a redução da substância branca, aumento da poda sináptica e perda de conectividade entre regiões, afetando estruturas como o córtex pré-frontal, essencial para a tomada de decisões e o controle de impulsos. O uso abusivo de álcool nesse período pode comprometer a memória, a regulação emocional e aumentar a vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos, como os transtornos de ansiedade. No sistema nervoso central, o sistema endocanabinoide (eCB) atua como modulador de funções emocionais, principalmente por meio dos ligantes endógenos anandamida (AEA) e 2-araquidonilglicerol (2-AG), que interagem com os receptores canabinoides CB1 e CB2. Apesar da relevância do eCB na modulação emocional, ainda há poucas investigações sobre seu papel nos efeitos do etanol durante a adolescência, especialmente em regiões como a amígdala, o córtex pré-frontal e o hipocampo, áreas-chave nos estudos sobre ansiedade. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da intoxicação alcoólica na adolescência sobre comportamentos tipo-ansiosos e sobre a expressão do receptor CB1 no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala de camundongos C57BL/6J. Os animais foram submetidos à intoxicação alcoólica e avaliados nos testes comportamentais do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Caixa Claro-Escuro. Posteriormente, os encéfalos foram coletados para análise da expressão do gene CB1. No LCE, os animais intoxicados apresentaram redução significativa no tempo de permanência nos braços abertos, indicando comportamento do tipo ansioso aumentado. Na análise molecular, observou-se diminuição significativa da expressão de CB1 na amígdala dos animais intoxicados, sem alterações no córtex pré-frontal e hipocampo. Esses achados sugerem o envolvimento da amígdala e do sistema endocanabinoide na mediação dos efeitos ansiosos induzidos pelo etanol.

Palavras-chave: etanol, ansiedade, adolescência, comportamento, sistema endocanabinoide

ABSTRACT

Alcohol-related disorders are a serious global public health issue, with early consumption during adolescence being a major risk factor for the development of dependence. This developmental period is marked by intense brain changes, including white matter reduction, increased synaptic pruning, and loss of connectivity between regions, particularly affecting structures such as the prefrontal cortex, which is critical for impulse control and decision-making. Alcohol abuse during adolescence can impair memory, emotional regulation, and increase vulnerability to psychiatric disorders, including anxiety disorders. In the central nervous system, the endocannabinoid system (eCB) plays a modulatory role in emotional processing, primarily through the endogenous ligands anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), which act on cannabinoid receptors CB1 and CB2. Despite the eCB's relevance in emotional modulation, few studies have investigated its role in the effects of ethanol during adolescence, especially in anxiety-related brain regions such as the amygdala, prefrontal cortex, and hippocampus. This study aimed to evaluate the effects of adolescent alcohol intoxication on anxiety-like behaviors and CB1 receptor expression in these regions in male and female C57BL/6J mice. Animals were subjected to an ethanol intoxication protocol and evaluated using the Elevated Plus Maze (EPM) and Light-Dark Box tests. Brains were then collected for CB1 gene expression analysis. In the EPM, intoxicated animals showed a significant reduction in time spent in open arms, indicating increased anxiety-like behavior. Molecular analysis revealed a significant decrease in CB1 expression in the amygdala, with no changes in the prefrontal cortex or hippocampus. These findings suggest that the amygdala and eCB system are involved in ethanol-induced anxiety-like responses.

Keywords: ethanol, anxiety, adolescence, behavior, endocannabinoid system

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Esquema representativo do protocolo de intoxicação alcoólica	14
Figura 2- Esquema representativo do protocolo para avaliação de comportamentos ansiosos.....	14
Figura 3- Aparato do Labirinto em Cruz Elevado.....	15
Figura 4- Aparato do Teste da Caixa Claro-Escuro	16
Figura 5- Sítios de coleta da área do córtex pré-frontal	17
Figura 6- Sítios de coleta da área da amígdala.....	17
Figura 7- Sítios de coleta da área hipocampal.....	18
Figura 8- Comportamentos Espaço-Temporais dos camundongos no LCE.	20
Figura 9- Comparação dos parâmetros comportamentais avaliados na caixa claro-escuro	21
Figura 10- Análise relativa da expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) do gene CNR1 no córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivos gerais.....	12
3.2. Objetivos específicos.....	12
4. METODOLOGIA.....	13
4.1. Animais	13
4.2. Substâncias	13
4.3. Protocolo de Intoxicação Alcoólica	13
4.4. Avaliação das respostas comportamentais do tipo-ansiedade após a intoxicação alcoólica.....	14
4.4.1. Labirinto em Cruz Elevado	14
4.4.2. Caixa Claro-Escuro	15
4.5. Coleta dos encéfalos.....	16
4.6. Extração de RNA, síntese do c-DNA e RT-qPCR.....	18
4.7. Análise Estatística	18
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO.....	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXO A – Certificado de Comissão de Ética na Utilização de Animais	39

1. INTRODUÇÃO

A adolescência é um período de desenvolvimento caracterizado por mudanças significativas em diversos sistemas no organismo do adolescente. Caracteriza a adolescência o período que compreende a idade de 10 até 20 anos (OMS, 1965). Tais mudanças significativas também se aplicam ao desenvolvimento neural e emocional, ou seja, são observadas alterações na arquitetura cerebral e também na expressão de comportamentos e emoções (Giedd, 2008). Dentre as muitas alterações que ocorrem nesse período de transição entre a infância e a vida adulta, inclui-se o declínio do volume de substância cinzenta devido à redução de conexões sinápticas, em um processo conhecido como poda sináptica — um mecanismo de refinamento neural que elimina conexões sinápticas pouco utilizadas para otimizar a eficiência do cérebro (Bezerra *et al.*, 2023). Além disso, ocorre a intensa mielinização das fibras nervosas, que resulta no aumento da espessura da substância branca e em uma maior eficiência na condução dos impulsos nervosos. Essa fase também é marcada por mudanças complexas nos sistemas de processamento neural e por características comportamentais únicas, como aumento da impulsividade, busca por novas sensações e desejo de correr riscos (Van Hees *et al.*, 2022).

O sistema nervoso central (SNC) não está completamente maduro até pelo menos os 25 anos, uma vez que há um descompasso temporal entre a maturação dos sistemas límbicos subcorticais — responsáveis pela detecção de recompensa e emoção — e das regiões pré-frontais de controle executivo. Durante a adolescência, as estruturas límbicas amadurecem precocemente, enquanto o córtex pré-frontal, que sustenta funções executivas, é uma das últimas regiões do cérebro a amadurecer completamente (Romer; Reyna; Satterthwaite, 2017). Esse desequilíbrio funcional torna os adolescentes mais propensos a respostas emocionais intensas e comportamentos de risco. Embora consigam reconhecer cognitivamente os perigos dessas ações, a imaturidade do córtex pré-frontal está associada à falta de controle inibitório, o que facilita a adoção de comportamentos impulsivos e inadequados (Casey; Glatt; Lee, 2008)

Além disso, a adolescência geralmente pode ser o período para a primeira exposição a uma série de agentes exógenos potencialmente tóxicos, tais como o álcool. . O álcool é a substância mais frequentemente consumida entre os adolescentes. Segundo dados da OMS, 23,5% dos adolescentes em todo o mundo relatam o consumo de etanol, com as maiores taxas observadas na região da Europa (45,9%) e das Américas (43,9%)

(OMS, 2024). O transtorno por uso dessa substância é uma condição crônica caracterizada pelo consumo compulsivo de álcool, perda de controle sobre a ingestão da substância e a persistência do uso mesmo diante de consequências negativas sociais, físicas ou psicológicas (American Psychiatric Association, 2013). De acordo com os critérios do DSM-5, o transtorno por uso de álcool é classificado em graus de severidade (leve, moderado ou grave) conforme o número de critérios diagnósticos preenchidos, como fissura, tolerância, abstinência e comprometimento do funcionamento diário.

O etanol exerce efeitos significativos sobre os sistemas neurotransmissores GABAérgico e glutamatérgico, impactando diretamente o funcionamento do sistema nervoso central. Conforme descrito na revisão de Costardi *et al.* (2015), o etanol atua como um modulador alósterico positivo dos receptores GABA-A, intensificando a inibição neuronal e provocando efeitos como sedação, prejuízo na coordenação motora e diminuição da ansiedade. Por outro lado, o etanol inibe a função dos receptores NMDA, que são fundamentais na neurotransmissão excitatória mediada pelo glutamato. Essa inibição compromete processos cognitivos como aprendizado, atenção e memória, além de afetar a plasticidade sináptica. Com o uso crônico, o cérebro busca compensar essas alterações por meio de mecanismos de neuroadaptação.

No sistema GABAérgico, ocorrem alterações na função dos receptores GABA-A, incluindo mudanças na expressão e na composição das subunidades receptoras. Essas adaptações podem contribuir para o desenvolvimento de tolerância ao álcool, dependência e sintomas de abstinência, como hiperexcitabilidade do sistema nervoso central (Grobin *et al.*, 1998). Já no sistema glutamatérgico, o consumo crônico induz uma sensibilização dos receptores glutamatérgicos, levando a uma maior excitabilidade neuronal e a um aumento na resposta aos estímulos glutamatérgicos. Isso pode contribuir para os efeitos neurotóxicos observados em usuários crônicos de álcool, bem como para a maior suscetibilidade a distúrbios emocionais e dependência de substâncias (Roberto *et al.*, 2004).

Conforme Lees e colaboradores (2020), a exposição ao álcool na adolescência está associada a redução do volume e integridade da substância branca, aumento da poda sináptica com consequente redução da substância cinzenta, levando à perda de sinapses significativas e comprometendo a conectividade cerebral (Lees *et al.*, 2020). Ademais, funções como planejamento, tomada de decisão e controle de impulsos, podem ser particularmente vulneráveis devido às alterações que o etanol provoca no córtex pré-

frontal (Spear, 2018).

Durante a adolescência, o cérebro passa por um intenso processo de remodelação neuroquímica, especialmente nos sistemas glutamatérgico e GABAérgico, os quais são alvos importantes da ação do etanol. O pico de ativação do glutamato aos receptores NMDA ocorre no início da adolescência, seguido por uma redução significativa desses receptores até a idade adulta, processo associado à poda sináptica e à diminuição da plasticidade em regiões límbicas, como o núcleo accumbens (Miller *et al.*, 1990). Simultaneamente, os receptores GABA-A também passam por uma reorganização significativa, com alterações na expressão de diferentes subunidades que modulam suas propriedades farmacológicas, incluindo a resposta ao etanol. Como esses sistemas ainda estão em maturação, a exposição ao álcool nesse período pode afetar negativamente a neuroplasticidade, a neurogênese e a estabilização dos circuitos inibitórios, aumentando a vulnerabilidade a transtornos como a ansiedade e a dependência química na vida adulta (Crews; He; Hodge, 2007).

O consumo de álcool na adolescência também pode levar a déficits cognitivos e comportamentais persistentes, afetando a capacidade de aprendizado verbal, memória, atenção e regulação emocional ao longo da vida (Hanson *et al.*, 2011). Em conjunto, está claro que, devido à alta plasticidade cerebral, a adolescência é um período sensível para o desenvolvimento de transtornos mentais, como transtornos de ansiedade e bipolaridade, depressão, psicoses, transtornos alimentares, dependência de álcool, substâncias psicoativas e medicamentos (Chwedorowicz *et al.*, 2017).

Os transtornos de ansiedade são comumente descritos como um estado prolongado de tensão, caracterizado por medo exacerbado e preocupação constante diante de eventos futuros incertos e potencialmente negativos, que induzem forte angústia emocional, doenças somáticas, além de déficits cognitivos e comportamentais, e, por sua vez, prejudicam o funcionamento social normal e afetam negativamente a qualidade de vida (Duval; Javanbakht; Liberzon, 2015). Estudos anteriores identificaram diversas estruturas cerebrais fundamentais envolvidas nos transtornos de ansiedade, destacando seu papel tanto na geração quanto na modulação de respostas de medo e ansiedade. Entre essas estruturas estão a amígdala, o córtex pré-frontal, o núcleo leito da estria terminal (BNST), o hipocampo, o estriado, a ínsula anterior, o córtex cingulado anterior (dACC), o hipotálamo e o tálamo (Xie *et al.*, 2021).

Sendo assim, o tálamo integra entradas sensoriais dos córtices sensoriais primários e envia sinais para a amígdala, que, juntamente com o dACC, participa do processamento das respostas emocionais e somáticas da ansiedade, integrando e transmitindo informações sensoriais ao hipotálamo, aos gânglios da base e ao tronco cerebral para gerar comportamentos defensivos como aqueles relacionados à fuga, luta e avaliação de risco (Tovote; Fadok; Lüthi, 2015). O hipocampo, por sua vez, codifica informações contextuais relacionadas à ameaça, sendo implicado na modulação/extinção do medo e desempenhando um papel na regulação negativa da amígdala em ambientes seguros (Maren, 2001). O córtex pré-frontal (PFC) envia projeções para a amígdala que exerce controle regulatório sobre a resposta ao medo, modulando o comportamento de acordo com informações complexas recebidas do hipocampo e do tálamo (Tottenham e Galván, 2017).

A amígdala, o estriado, a ínsula anterior e o córtex cingulado anterior, por serem regiões envolvidas na identificação de estímulos aversivos e na geração de respostas de medo, frequentemente apresentam anormalidades estruturais e hiperatividade em indivíduos com transtornos de ansiedade, quando comparados a pessoas controles (Alvarez *et al.*, 2008). É importante ressaltar também que o hipocampo ventral, a amígdala basolateral e o mPFC formam um circuito interconectado que desempenha um papel vital no aprendizado e extinção do medo. Dessa forma, o hipocampo e o córtex pré-frontal são regiões envolvidas na regulação da resposta à ameaça e, assim, a ativação dessas regiões também é mais intensas em indivíduos com transtornos de ansiedade (Lau e Waters, 2014).

Além dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico acima citados, outros neurotransmissores e sistemas de neurotransmissão parecem estar envolvidos na modulação comportamental defensiva e, entre eles podemos citar os sistemas serotoninérgico, adrenérgico, dopaminérgico, CRFérgico, canabinoide e outros. Nesse sentido, o sistema endocanabinoide é um sistema neuromodulador que desempenha funções importantes no desenvolvimento do sistema nervoso central, na plasticidade sináptica e na resposta a estímulos endógenos e ambientais (Lu e Mackie, 2021). Esse sistema é composto por canabinoides endógenos, receptores de canabinoides e as enzimas responsáveis pela síntese e degradação dos endocannabinoides (Basavarajappa, 2019). Os receptores canabinoides mais bem caracterizados são o CB1 e o CB2 e, seus principais agonistas endógenos são a anandamida (AEA) e o 2- araquidonoilglicerol (2-AG). Dessa

forma, a AEA é sintetizada por várias enzimas, como a n-acil-fosfatidil-etanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD), e degradada principalmente pela amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH). O 2-AG, por sua vez, é produzido pelas diacilglicerol-lipase (DAGL) e inativado pela monoacilglicerol lipase (MAGL) (Araújo; Almeida; Araújo, 2023).

Os receptores canabinoides CB1 e CB2 são receptores acoplados à proteína G do tipo inibitório (Gi/o), dessa forma, quando ativados, eles inibem a adenilato ciclase, reduzindo os níveis intracelulares de AMP cíclico (cAMP). Essa ação desencadeia uma série de efeitos inibitórios nas células, incluindo a modulação da liberação de neurotransmissores e a regulação da excitabilidade neuronal (Basavarajappa, 2019). O CB1 é altamente expresso no SNC, predominantemente nos neurônios do SNC, especialmente nos terminais pré-sinápticos. Em contraste, o CB2, que anteriormente, foi considerado periférico e restrito a células imunes, atualmente sabe-se que também estão presentes em neurônios, células gliais e endoteliais (Joshi e Onaivi, 2019). O sistema endocanabinoide tem uma ampla expressão no sistema límbico, nas áreas corticais pré-frontais e nas estruturas cerebrais que regulam as respostas aos estímulos neuroendócrinos, o que explica o papel chave deste sistema no controle das emoções, como a ansiedade (Maldonado, Cabañero, Martín-García, 2020).

Estudos na literatura têm demonstrado a importância do receptor canabinoide CB1 na modulação dos efeitos recompensadores do álcool. Pesquisas realizadas no Brookhaven National Laboratory (EUA) utilizando modelos animais revelaram que camundongos com níveis normais de receptores CB1 apresentam maior preferência e consumo de álcool em comparação com animais geneticamente modificados com deficiência nesses receptores (knockout CB1). Além disso, quando tratados com um antagonista do receptor CB1 (SR141716A), os camundongos com receptores intactos reduziram significativamente o consumo de álcool, indicando que o sistema endocanabinoide, por meio da ativação do CB1, desempenha um papel crucial na mediação dos efeitos recompensadores do álcool, influenciando tanto a busca pela substância quanto o desenvolvimento da dependência (Thanos *et al.*, 2005).

Além disso, outros trabalhos mostraram que a exposição aguda ou crônica ao álcool podem levar a um aumento na produção de anandamida e 2-AG, além de alterar a expressão de receptores CB1 em diversas áreas cerebrais, podendo aumentar ou reduzir a depender das condições (Basavarajappa e Hungund, 1999; Ceccarini *et al.*, 2013). Adicionalmente, há evidências que apontam que o consumo crônico de álcool altera a

sinalização endocanabinoide, favorecendo o desenvolvimento da dependência, uma vez que ao influenciar várias funções cerebrais, incluindo a regulação do prazer e recompensa, humor e memória, esse sistema estaria diretamente ligado ao comportamento aditivo (Pava e Woodward, 2012; Colombo *et al.*, 2005).

Desse modo, este trabalho objetiva avaliar a relação da intoxicação ao etanol na adolescência no desenvolvimento de comportamentos ansiosos, bem como a participação do sistema endocanabinoide em áreas do sistema nervoso central, como a amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo, envolvidas na dependência do uso de drogas de abuso.

2. JUSTIFICATIVA

A investigação dos efeitos da intoxicação alcoólica nas respostas neurocomportamentais em camundongos adolescentes é importante para a compreensão das consequências do uso precoce de etanol, especialmente em um período tão crítico do desenvolvimento. A adolescência é marcada por um aumento da vulnerabilidade a substâncias psicoativas, e o álcool, sendo a substância de abuso mais consumida nessa faixa etária, pode levar a alterações significativas no desenvolvimento neurocomportamental, afetando não apenas o indivíduo, mas também a sociedade como um todo.

A escolha de modelos animais, como os modelos que utilizam camundongos, permite a realização de experimentos controlados, possibilitando a análise de variáveis neurobiológicas e comportamentais de forma mais detalhada. A neurociência contemporânea reconhece que as alterações na estrutura e função cerebral provocadas pelo consumo de álcool durante a adolescência podem resultar em déficits cognitivos e emocionais persistentes. Esses déficits não só impactam o aprendizado e a memória, mas também afetam a regulação emocional e a capacidade de tomar decisões.

Ademais, os mecanismos que medeiam a interação entre a intoxicação de etanol e alterações comportamentais e neurobiológicas não estão completamente esclarecidos. Além disso, existe um interesse crescente em verificar onde as plasticidades relacionadas a comportamentos ansiosos estariam armazenadas e evidências sugerem o envolvimento da amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal. E ainda, a relação entre o sistema endocanabinoide e o consumo de álcool, bem como a modulação da ansiedade, é um campo emergente que demanda mais atenção. A literatura indica que a ativação desse sistema durante a exposição ao álcool pode ter um papel modulador nas respostas emocionais e comportamentais. Nesse sentido, este trabalho ajudará a responder questões ainda em aberto sobre uso, abuso e dependência de drogas e a influência da idade, além de avaliar o envolvimento do sistema endocanabinóide na atividade da amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo sobre esses diferentes comportamentos.

Por fim, a pesquisa proposta é relevante para a saúde pública, uma vez que a identificação dos efeitos adversos do uso de álcool na adolescência pode fornecer subsídios para políticas públicas educativas e preventivas eficazes no enfrentamento do consumo de álcool na adolescência, além de investigações sobre intervenções terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais:

Analisar a associação do sistema endocanabinoide presente em diferentes regiões do sistema nervoso central (amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo) na interação entre a exposição à intoxicação alcoólica na adolescência em camundongos.

3.2. Objetivos específicos:

- Investigar o efeito da intoxicação alcoólica nas manifestações comportamentais de ansiedade em camundongos adolescentes;
- Analisar se a exposição aos ciclos de intoxicação alcoólica altera a expressão gênica dos receptores CB1 no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados 24 camundongos C57BL/6J, provenientes da Rede de Biotérios de Roedores (REBIR/UFU). Para assegurar a homogeneidade dos resultados, metade dos animais foi composta por machos (12 animais) e a outra metade por fêmeas (12 animais). Os animais foram recebidos no dia pós natal 21 (DPN 21) e alocados em grupos de 4 animais por gaiola (machos separados de fêmeas), permanecendo em um período de adaptação de uma semana sem perturbações para aclimação ao biotério. Todos os experimentos tiveram início no DPN 28, dia do início da adolescência dos animais (Spear, 2000). Os animais foram alojados em biotério com ciclo de 12h claro-escuro e temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$). Água e comida foram fornecidos *ad libitum* durante todo o procedimento experimental. Os animais foram separados em dois grupos experimentais, contendo 12 animais cada: grupo controle e grupo intoxicado, sendo metade composta por fêmeas e a outra por machos. Durante o protocolo experimental, quatro animais do grupo intoxicado foram a óbito, totalizando, ao final dos procedimentos, oito animais nesse grupo. Os procedimentos experimentais foram conduzidos em estrita conformidade com os princípios de cuidados com animais de laboratório, segundo o CONCEA, Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, sob protocolo aprovado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) nº 23117.080005/2023-09.

4.2. Substâncias

Etanol (Sigma-Aldrich, 95% v/v, St. Louis, MO, EUA).

Isoflurano 4% por via inalatória.

4.3. Protocolo de Intoxicação Alcoólica

O protocolo de intoxicação alcoólica foi adaptado de Vore *et al.* (2017). No protocolo de intoxicação alcoólica, os animais receberam, ou injeção intraperitoneal de salina 0,9% (grupo controle) ou etanol (3,0 g/kg; i.p.) (grupo intoxicado). O protocolo consistiu em 4 ciclos de intoxicação/abstinência, a duração de cada ciclo foi de 6 dias. Dessa forma, os animais receberam injeção de etanol ou salina nos três primeiros dias, seguido de três dias de abstinência, onde os animais não receberam administração de nenhuma substância. A figura 1 representa o protocolo de intoxicação alcoólica. Após a finalização dos 4 ciclos, foram realizados os testes das respostas do tipo-ansioso, e,

posteriormente, foi realizada a coleta dos encéfalos para análises bioquímicas, que serão descritos nos próximos itens.

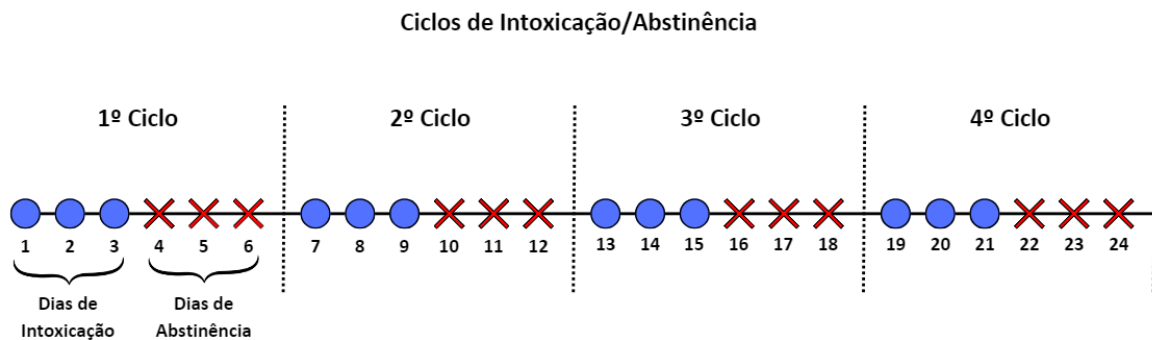


Figura 1- Esquema representativo do protocolo de intoxicação alcoólica. Fonte: Autoria própria

4.4. Avaliação das respostas comportamentais do tipo-ansiedade após a intoxicação alcoólica

Após os quatro ciclos de intoxicação, iniciaram-se os testes para avaliar os comportamentos do tipo-ansiosos. Assim, no dia 25 (vinte e quatro horas após o último dia de abstinência do 4º ciclo), foi realizada mais uma intoxicação seguindo os mesmos parâmetros anteriores. No dia subsequente, foi aplicado o primeiro teste, o Labirinto em Cruz Elevado. Em seguida, no 27º dia, ocorreu outra sessão de intoxicação. E por fim, ocorreu o segundo teste, a Caixa Claro-Escuro.

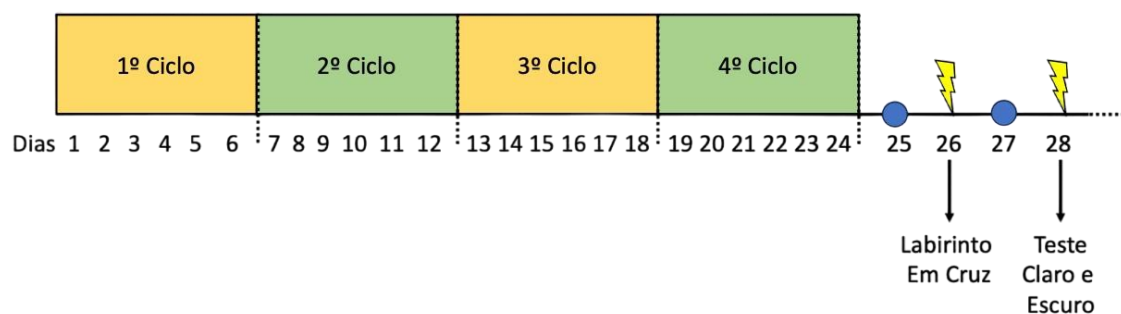


Figura 2- Esquema representativo do protocolo para avaliação de comportamentos ansiosos. Fonte: Autoria própria

4.4.1. Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) constitui um dos principais métodos para investigar comportamentos relacionados a ansiedade em camundongos (Lister, 1987). O teste consiste em um aparato de madeira com dois braços fechados, ou seja, com paredes laterais dispostos ortogonalmente a dois braços abertos, elevados do chão. Cada

camundongo foi colocado no quadrante central do aparato, com o focinho voltado para o braço aberto por padronização. Durante o teste, foram avaliados, por um período de cinco minutos, os comportamentos de natureza espaço-temporal. Esses comportamentos consistiram no número de Entradas nos Braços Abertos (EBA) e no Tempo de permanência nos Braços abertos (TBA), e como parâmetro para analisar a locomoção do animal no aparato, foi analisado o número de Entradas nos Braços Fechados (EBF). Para representar mais claramente os resultados referentes às entradas e ao tempo nos braços abertos, os dados brutos foram transformados em porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA). Esses valores percentuais foram calculados dividindo o EBA pelo número total de entradas em todos os braços do labirinto e o TBA pela duração total do teste (300 segundos), respectivamente. A tendência dos camundongos de evitar os braços abertos, em favor dos braços fechados, é interpretada como um comportamento ansioso, visto que, roedores tem por aversiva a exposição a locais abertos. Após cada teste, o equipamento foi higienizado com solução de etanol a 30% para remover odores residuais, sem deixar odor do etanol no local, o que poderia se tornar aversivo ao animal.

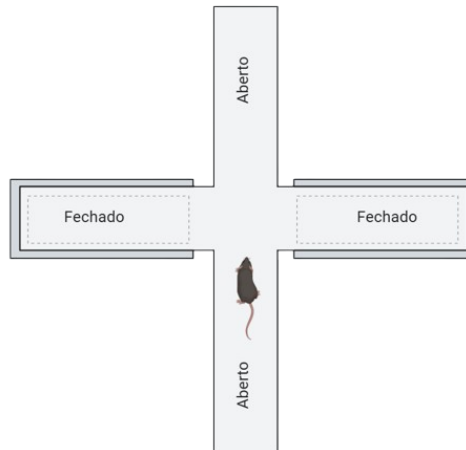


Figura 3- Aparato do Labirinto em Cruz Elevado. Fonte: Ilustração da autora com a utilização do software Biorender®

4.4.2. Caixa Claro-Escuro

O teste claro-escuro também foi utilizado para verificar os comportamentos do relacionados a ansiedade nos animais. Desenvolvido com base no conflito inerente entre a motivação exploratória dos animais e sua aversão natural a ambientes iluminados, esse modelo apresenta sensibilidade para detectar possíveis efeitos ansiolíticos e ansiogênicos (Bourin e Hascoët, 2003). A estrutura do aparelho consiste em uma caixa dividida em

duas áreas: uma de cor branca e iluminada e outra de cor preta e sem presença de luz, conectadas por uma abertura. Esse arranjo permite observar a preferência dos camundongos por ambientes que induzem diferentes níveis de ansiedade. Durante o experimento, os camundongos foram colocados no compartimento escuro da caixa e o comportamento é monitorado ao longo de 5 minutos. Os principais parâmetros avaliados incluem a latência, ou seja, o tempo em que o camundongo levou para adentrar no compartimento claro, além do número de cruzamentos e o tempo em segundos gastos no compartimento claro da caixa. O tempo despendido no compartimento claro é considerado o principal indicador de ansiedade, com valores mais baixos sendo interpretados como maior nível de ansiedade, enquanto o número de transições entre os compartimentos é utilizado para avaliar a atividade locomotora geral do animal.

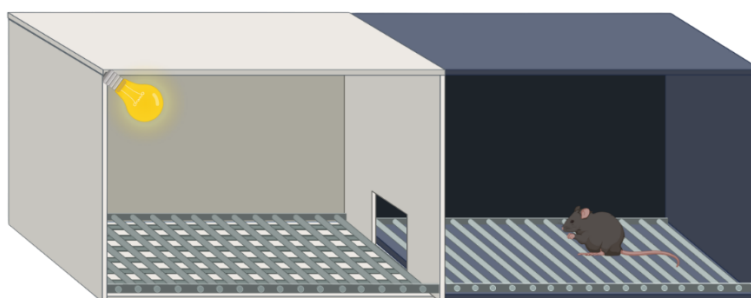


Figura 4- Aparato do Teste da Caixa Claro-Escuro. Fonte: Ilustração da autora com a utilização do software Biorender®

4.5. Coleta dos encéfalos

Após a realização do teste da caixa claro-escuro, todos os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, precedida de anestesia com isoflurano a 4% por via inalatória. Em seguida, os encéfalos foram retirados após a decapitação, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em um freezer a -80°C . Os encéfalos foram seccionados em criostato mantido a -20°C , utilizando como referência as coordenadas estereotáxicas descritas no atlas de Paxinos e Franklin (2008) para camundongos. Após o corte, procedeu-se à microdissecção das regiões de interesse do sistema nervoso central - incluindo a amígdala (AMG), hipocampo e córtex pré-frontal (CPF) - empregando agulhas de ponta chata calibre 14-16 gauge. Os fragmentos teciduais foram imediatamente acondicionados em tubos criogênicos previamente resfriados em gelo seco. Para a etapa de extração de RNA total, considerando o pequeno volume de material obtido individualmente, optou-se pela estratégia de pool, que consiste na combinação de

amostras de dois animais do mesmo grupo experimental. Esta abordagem visa atingir a concentração mínima necessária de RNA total para as análises subsequentes, mantendo a representatividade biológica de cada grupo. Os tubos contendo as amostras agrupadas foram então encaminhados para o processo de extração.

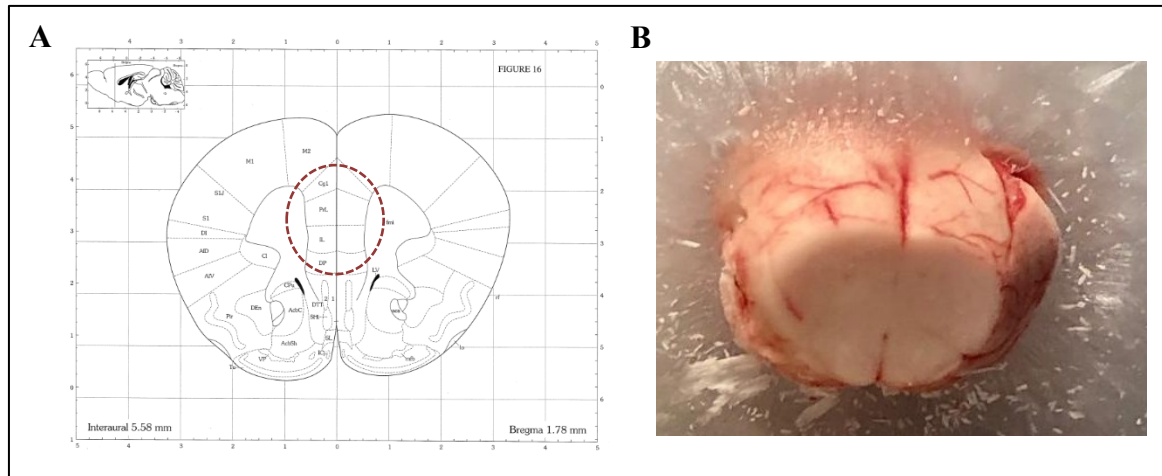


Figura 5- Sítios de coleta da área do córtex pré-frontal **A.** Representação esquemática. Fonte: adaptada (Paxinos e Franklin, 2008). **B.** A imagem mostra a secção na qual foi coletada a área de interesse córtex pré-frontal. Fonte: Autoria própria.

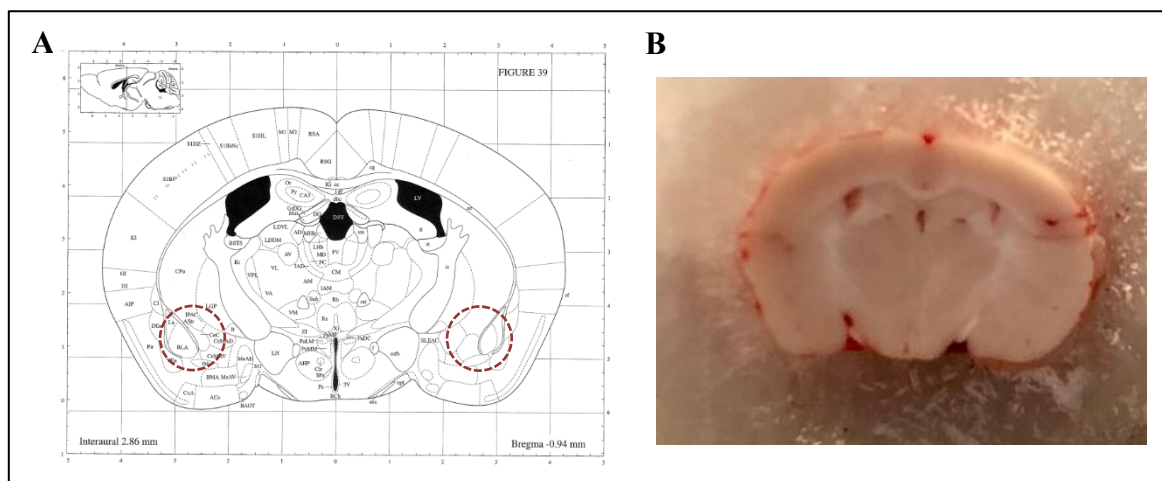


Figura 6- Sítios de coleta da área da amígdala. **A.** Representação esquemática. Fonte: adaptada (Paxinos e Franklin, 2008). **B.** A imagem mostra a secção na qual foi coletada a área de interesse amígdala. Fonte: Autoria própria.

4.6. Extração de RNA, síntese do c-DNA e RT-qPCR

4.7. Análise Estatística

As análises foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.1. Para a análise das respostas comportamentais, foi aplicado o teste T de Student para

amostras independentes (grupo intoxicado *vs* grupo controle). Para a análise dos valores de expressão gênica nas regiões córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo também foi utilizado o teste T de Student, com a comparação entre os grupos intoxicado e controle.

5. RESULTADOS

A Figura 8 ilustra as medidas espaço-temporais de porcentagem de entradas (%EBA) e tempo de permanência (%TBA) nos braços abertos (áreas desprotegidas) do labirinto e o índice de locomoção (frequência de entradas em braços fechados - EBF, protegidos), avaliados em animais submetidos ao LCE de acordo com o teste *t* de *Student* ($p < 0.05$). Em relação a % TBA, foi observado que os camundongos do grupo controle passaram em média $19,97 \pm 1,68\%$ do tempo total no braço aberto, enquanto o grupo intoxicado com etanol apresentou uma redução significativa ($p = 0.039$) com uma média de $14,37 \pm 1,86\%$, sugerindo um aumento do comportamento tipo-ansioso. Com relação a %EBA do LCE, o grupo controle apresentou $51,96 \pm 4,57\%$, enquanto o grupo intoxicado apresentou $45,88 \pm 5,25\%$. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os dois grupos para esse parâmetro comportamental ($p = 0.395$). Da mesma forma, o número de entradas nos braços fechados foi semelhante entre os grupos (Controle: $13,33 \pm 0,86$; Intoxicado: $11,5 \pm 1,12$), sem significância estatística ($p = 0.213$).

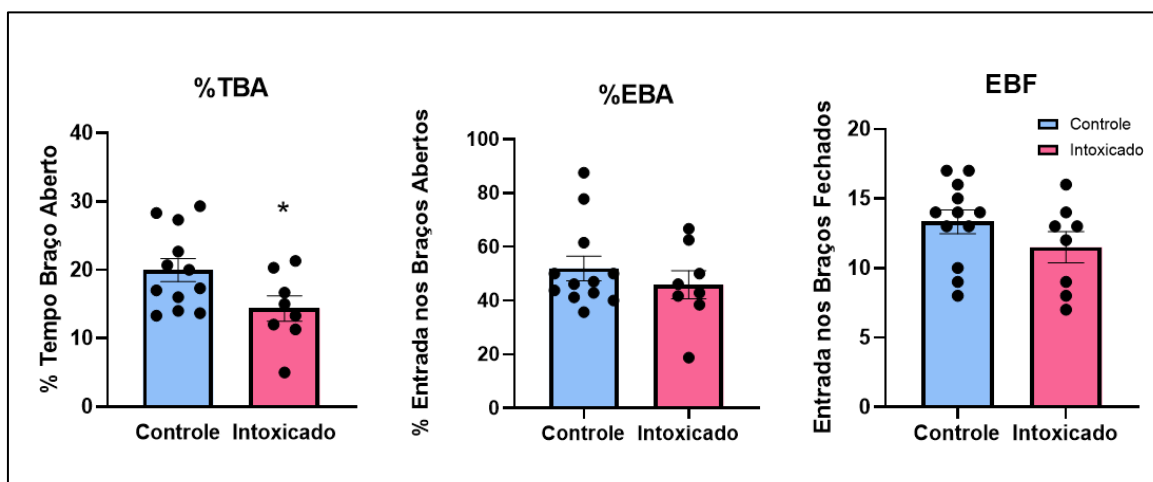


Figura 8- Comportamentos Espaço-Temporais dos camundongos no LCE. % Tempo nos Braços abertos, % Entrada nos Braços Abertos e Número de Entrada nos Braços Fechados. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. N= 8-12 animais por grupo. Teste *t* de *Student*.

A Figura 9 mostra os dados obtidos no teste da caixa claro-escuro também pelo teste *t* de *Student* para comparar o grupo controle e o grupo intoxicado com etanol. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros avaliados, incluindo o tempo para entrada no compartimento claro, denominada latência ($p = 0.722$), com média de $13 \pm 4,53$ para o grupo controle e $15,43 \pm 4,76$ para o grupo intoxicado. Com relação ao tempo total gasto no compartimento claro, observou-se que os animais do grupo

controle apresentaram uma média de $95,67 \pm 6,47$ e os animais do grupo intoxicado $85,13 \pm 4,83$, não demonstrando diferenças significativas ($p = 0.208$). Por fim, o número de cruzamentos foi semelhante entre os grupos (Controle: $19,42 \pm 1,80$; Intoxicado: $16,13 \pm 2,14$), sem significância estatística ($p = 0.257$). Esses resultados sugerem que, sob as condições experimentais adotadas, a intoxicação alcoólica não alterou significativamente o comportamento ansioso dos camundongos nesse modelo de teste.

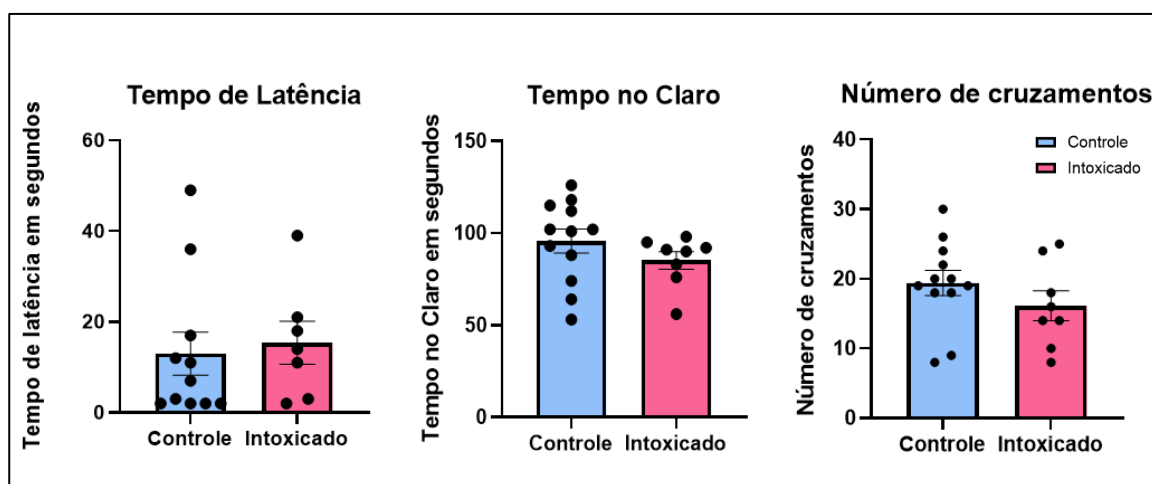


Figura 9- Comparação dos parâmetros comportamentais avaliados no teste da caixa claro-escuro entre camundongos controle e intoxicados com etanol. Os gráficos apresentam a latência para entrada no compartimento claro, o número de cruzamentos entre os compartimentos e o tempo total gasto no compartimento claro. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N= 8-12 animais por grupo. Os dados foram analisados pelo teste *t* de *Student* e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

A Figura 10 traz os resultados em relação a análise da expressão gênica do receptor CB1 nas áreas do córtex pré-frontal (CPF), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP). Considerando a expressão do receptor CB1 no córtex pré-frontal, o teste *t* de *Student* não revelou uma diferença significativa entre os grupos com $p = 0.1044$ (Controle: $1 \pm 0,034$; Intoxicado: $0,87 \pm 0,084$). Assim como, não foi observada uma alteração significativa de tal receptor no hipocampo com valor de $p = 0.7994$ (Controle: $1 \pm 0,071$; Intoxicado: $0,96 \pm 0,11$). No entanto, avaliando a expressão do receptor CB1 na amígdala, o teste *t* de *Student* identificou uma diferença significativa entre os grupos, com o grupo intoxicado apresentando níveis significativamente menores de expressão de CB1 em comparação ao controle sendo $p = 0.0403$ (Controle: $1,029 \pm 0,106$; Intoxicado: $0,720 \pm 0,057$).

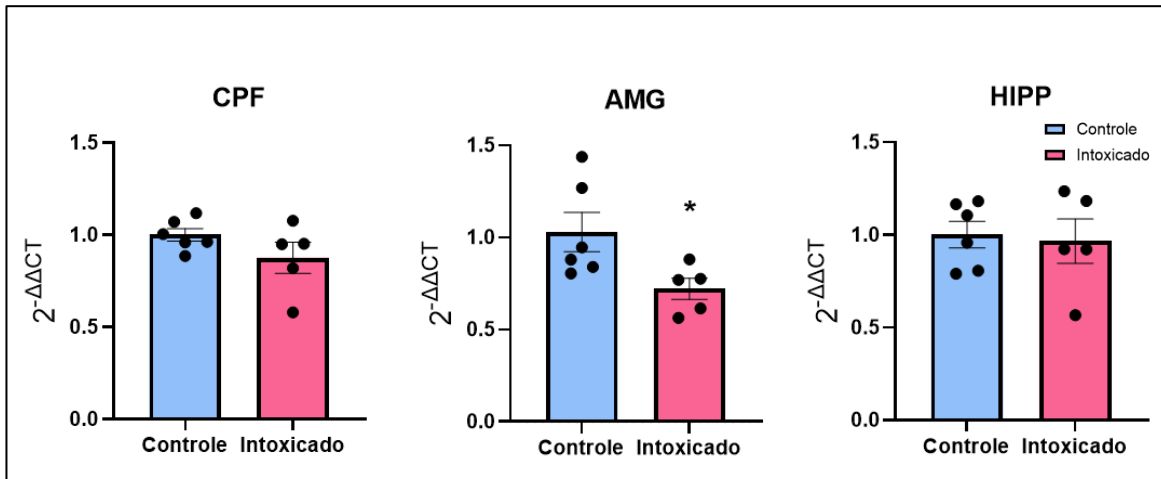


Figura 10- Análise relativa da expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) do gene CNR1 no córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. N= 8-12 animais por grupo. Teste *t* de Student.

6. DISCUSSÃO

Para investigar os comportamentos do tipo-ansioso, foram utilizados dois testes: Labirinto em Cruz Elevada e a Caixa Claro-Escuro. O LCE é um dos testes mais utilizados experimentalmente para a avaliação de comportamentos defensivos e relacionados à ansiedade em roedores. Tal teste baseia-se na tendência natural dos roedores de explorarem ambientes novos e em sua evitação inata de locais desprotegidos e elevados (Pellow e File, 1986). A aversão inata a esses locais se dá dentre outros motivos, pela vulnerabilidade que a exposição provoca, ou seja, em ambientes abertos o roedor fica mais vulnerável ao predador. Por outro lado, tanto os braços abertos quanto os fechados do LCE ativam o comportamento exploratório dos roedores devido à novidade do ambiente e levam os roedores a responderem defensivamente quando expostos a lugares abertos e altos. Entretanto, a esquia dos braços abertos deve-se ao fato de que eles provocam níveis mais elevados de medo (Rodgers e Dalvi, 1997).

Os resultados obtidos no labirinto em cruz elevado (LCE) indicam que a exposição ao etanol na adolescência promoveu alterações comportamentais compatíveis com um aumento da ansiedade em camundongos. O dado mais expressivo foi a redução significativa no tempo de permanência nos braços abertos entre os animais do grupo intoxicado em comparação ao grupo controle. Considerando que os braços abertos representam ambientes aversivos por serem elevados e desprotegidos, o menor tempo de exploração dessas áreas sugere um comportamento tipo-ansioso mais acentuado nos animais expostos ao etanol. Por outro lado, o percentual de entradas nos braços abertos não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, embora tenha sido numericamente inferior no grupo intoxicado. Essa divergência pode refletir uma resposta seletiva ao componente emocional da tarefa, em que os animais intoxicados iniciam a exploração, mas evitam permanecer em ambientes desprotegidos. Do mesmo modo, o número de entradas nos braços fechados, frequentemente utilizado como indicador de atividade locomotora geral, não apresentou diferença significativa entre os grupos. Esse achado sugere que o etanol, na dose e protocolo utilizados, não comprometeu a capacidade locomotora dos animais, o que reforça que a redução do tempo nos braços abertos decorre de um aumento do comportamento do tipo-ansioso, e não de uma possível sedação ou déficit motor induzido pelo etanol.

Esses resultados corroboram o estudo realizado por Zhang *et al.* (2007), no qual doses intraperitoneais de etanol em protocolos de exposição aguda (uma única dose) ou

repetida (três doses diárias consecutivas) resultaram em um aumento significativo do comportamento tipo-ansioso, evidenciado pela redução na exploração dos braços abertos do LCE. Da mesma forma, Wang *et al.* (2020) avaliaram que a exposição crônica ao etanol reduziu significativamente o tempo de permanência nos braços abertos do LCE em comparação aos animais do grupo controle. Em contraste, o trabalho de Criswell *et al.* (1994) sobre os efeitos do etanol e o clordiazepóxido (um benzodiazepínico), mostrou que ambos aumentaram o tempo que ratos Sprague-Dawley passaram nos braços abertos do LCE e a proporção de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas, sugerindo que os efeitos ansiolíticos do etanol podem ser mediados por mecanismos semelhantes aos dos benzodiazepínicos, possivelmente através da modulação dos receptores GABAA.

Por outro lado, enquanto no presente trabalho apenas o tempo de permanência foi afetado significativamente, no estudo de Varlinskaya *et al.* (2019), ratos Sprague Dawley expostos à administração intermitente de etanol na adolescência (tanto precoce quanto tardia) demonstraram também uma redução significativa no número de entradas nos braços abertos, indicando que o etanol prejudicou não só a permanência, mas também a iniciativa exploratória dos animais em relação às áreas aversivas do labirinto, sugerindo um efeito mais robusto sobre o comportamento de esquiva. Isso pode estar relacionado a variáveis experimentais distintas, como a espécie animal, o protocolo de administração do etanol (dose, duração e via), ou o período específico da adolescência em que os animais foram expostos.

Por sua vez, Kameda *et al.* (2007) investigou os efeitos do etanol na memória, ansiedade e comportamento motor de camundongos, observando um efeito ansiolítico do etanol com aumento do tempo gasto nos braços abertos do labirinto. Da mesma forma, Correia *et al.* (2009) investigou a relação entre níveis basais de ansiedade, efeito ansiolítico do etanol e consumo de etanol em camundongos. Os camundongos com altos níveis de ansiedade tratados com etanol apresentaram um efeito ansiolítico significativo, evidenciado pelo aumento do tempo nos braços abertos do LCE. Quando comparado com o presente trabalho, essas diferenças ressaltam a complexidade dos efeitos do etanol sobre o comportamento ansioso e a importância de considerar fatores como idade, predisposição à ansiedade e protocolos de administração ao interpretar os resultados. Além disso, o desenvolvimento cerebral durante a adolescência pode tornar os camundongos mais suscetíveis aos efeitos negativos do etanol, resultando em aumento da ansiedade na idade adulta. Também é importante considerar que, embora a exposição aguda ao etanol possa

apresentar efeitos ansiolíticos, a administração crônica e repetitiva, como a utilizada no presente protocolo de intoxicação, está associada ao aumento de comportamentos do tipo ansioso, conforme demonstrado também em outros estudos da literatura.

O cérebro adolescente encontra-se em um período crítico de desenvolvimento, caracterizado por intensas modificações estruturais e funcionais, como a remodelação sináptica, a maturação dos sistemas dopaminérgico e GABAérgico, e o desenvolvimento do córtex pré-frontal, responsável pelo controle emocional e tomada de decisões (Spear, 2000). A exposição ao etanol durante essa fase pode interferir nesses processos, resultando em prejuízos cognitivos e comportamentais persistentes. Guerri e Pascual (2010) afirmam que o álcool atua como um agente neurotóxico durante a adolescência, afetando a neurogênese, a plasticidade sináptica e promovendo neuroinflamação, o que pode aumentar a vulnerabilidade ao desenvolvimento de transtornos emocionais, como a ansiedade, na vida adulta.

Já o teste da Caixa Claro-Escuro, desenvolvido inicialmente por Crawley e Goodwin (1980), também é amplamente utilizado para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade em roedores. Em suas versões modificadas, a maioria dos pesquisadores observa que agentes ansiogênicos tendem a reduzir, enquanto drogas ansiolíticas aumentam o tempo que os animais permanecem no compartimento claro. Entretanto, os mecanismos exatos subjacentes às respostas comportamentais ainda não são totalmente compreendidos, podendo estar relacionados à intensidade da iluminação, à linhagem genética dos camundongos ou ao histórico prévio de testes dos animais (Kliethermes, 2005).

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e intoxicado nos parâmetros avaliados no teste da caixa claro-escuro, incluindo a latência para entrada no compartimento claro, o tempo total gasto nesse compartimento e o número de cruzamentos entre os compartimentos. Esses achados indicam que, sob as condições experimentais adotadas, a exposição ao etanol não foi suficiente para induzir alterações comportamentais compatíveis com um quadro de ansiedade aumentada nesse modelo.

Em contraste, no estudo conduzido por Costall, Kelly e Naylor (1988), observou-se que a administração de etanol em camundongos provocou uma redução no tempo gasto no compartimento claro da caixa claro-escuro, sugerindo um efeito ansiogênico da substância. Além disso, o trabalho de Kliethermes, Cronise e Crabbe (2004) demonstrou um aumento significativo nos comportamentos ansiosos nos animais durante a abstinência

de etanol, utilizando a inalação de vapor de etanol para induzir dependência. Entretanto, os efeitos observados na caixa claro-escuro foram fortemente influenciados pelo sexo dos animais, indicando uma variabilidade nas respostas comportamentais.

Adicionalmente, Varlinskaya *et al.* (2019), ao avaliarem comportamentos do tipo ansioso por meio da caixa claro-escuro em ratos expostos ao etanol durante diferentes fases da adolescência, observaram que a maioria dos animais (86,3%) permaneceu no compartimento escuro durante toda a sessão de teste. Esse resultado gerou um limite mínimo - do inglês “floor effect” -, impossibilitando a análise estatística, uma vez que não houve variação suficiente entre os animais.

Com base nos dados do estudo de Acevedo *et al.* (2014), é possível observar que os efeitos do etanol no comportamento ansioso de ratos adolescentes no teste da caixa claro-escuro foram dose-dependentes. Os autores relataram que, em relação à locomoção, doses mais baixas de etanol (1,25 g/kg) aumentaram significativamente a atividade locomotora em comparação com os animais não tratados, enquanto doses mais elevadas (3,25 g/kg) reduziram a locomoção. Quanto ao tempo gasto no compartimento claro apenas a dose mais alta (3,25 g/kg) resultou em uma redução significativa nesse tempo, sugerindo um efeito ansiogênico em alta dosagem. Já as doses mais baixas (0,5; 1,25 e 2,5 g/kg) não alteraram significativamente o tempo no compartimento claro em comparação aos grupos controle e não tratados.

Outro ponto importante observado por Kuleshkaya e Voikar (2014) é como variações no aparato e procedimentos influenciam o comportamento semelhante à ansiedade em camundongos, utilizando os testes da caixa claro-escuro. No teste da caixa claro-escuro, a posição inicial dos camundongos (compartimento claro ou escuro) afetou significativamente os resultados. Observou-se que iniciar pelo compartimento claro reduziu significativamente a latência para a primeira transição. Por outro lado, o tempo gasto no compartimento claro aumentou, sugerindo que iniciar o experimento pela parte iluminada pode promover comportamento de aproximação e uma resposta semelhante à ansiolítica.

Na revisão feita por Bourin e Hascoët (2003), a maioria dos protocolos experimentais inicia com os animais posicionados no compartimento claro. Contudo, diversos pesquisadores optaram por iniciar o teste a partir do compartimento escuro, como foi com o presente trabalho. Essas duas abordagens geram contextos iniciais distintos: ao iniciar no compartimento claro, os animais são imediatamente colocados em um ambiente potencialmente aversivo, o que pode induzir uma resposta de fuga; já começar no

compartimento escuro oferece uma situação de maior segurança inicial, permitindo que o animal explore espontaneamente o ambiente claro, o que se aproxima de um modelo de exploração voluntária.

Além disso, a latência para a primeira transição pode não ser o melhor parâmetro para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade, pois pode ser confundida com a tentativa de fuga da mão do experimentador (Kuleshkaya e Voikar, 2014). E ainda, já foi demonstrado que camundongos testados durante o período claro do seu ciclo claro/escuro não apresentam aversão à área intensamente iluminada (Costall *et al.*, 1989), entretanto, a realização de testes comportamentais durante a fase escura ainda não é uma abordagem padrão e não é suficientemente justificada.

Sendo assim, as divergências entre os achados na literatura e este estudo podem ser atribuídas às diferenças nos protocolos de administração de etanol, como a via utilizada, a dose empregada e o tempo decorrido entre a administração e a realização do teste comportamental. Também vale ressaltar que, embora o teste da caixa claro-escuro seja amplamente validado para avaliação de comportamentos ansiosos, sua sensibilidade em detectar alterações comportamentais em camundongos adolescentes pode ser menor quando comparada a outras faixas etárias, dada a maior impulsividade e curiosidade natural nessa fase do desenvolvimento.

Em relação os níveis de expressão dos gene do sistema endocanabinoide CB1 em resposta ao consumo de etanol, foram analisadas três regiões cerebrais associadas ao processamento emocional e à regulação da ansiedade: córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HIPP) e amígdala (AMG). Os resultados revelaram uma redução significativa na expressão do receptor CB1 na amígdala dos camundongos expostos ao etanol ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. No entanto, não observou-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e intoxicado nas regiões do CPF e do HIPP. Assim, observou-se que a neurocircuitaria que envolve a neurotransmissão canabinoide, especialmente no que se refere à expressão do receptor CB1 na amígdala, foi reduzida nos animais expostos ao protocolo de intoxicação por etanol, já que esses apresentaram menor densidade de receptores expressos. Esses achados sugerem um envolvimento específico da amígdala na mediação das respostas comportamentais do tipo-ansiosas induzidas pela intoxicação alcoólica.

A amígdala desempenha um papel central na regulação emocional e nas respostas ao estresse, sendo amplamente envolvida nos circuitos neurais associados ao comportamento ansioso. Essa região cerebral é composta por diferentes núcleos com

funções específicas - como os núcleos lateral, basal e central - que, de maneira integrada, processam estímulos ameaçadores e desencadeiam respostas comportamentais e fisiológicas associadas ao medo e à ansiedade, como a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e comportamentos de esquiva. Sua atuação também se estende à modulação de reações imediatas de medo e de estados de ansiedade sustentada, por meio de conexões funcionais com outras regiões cerebrais, como o hipocampo e o córtex pré-frontal (Tovote; Fadok; Lüthi, 2015).

A exposição ao etanol, especialmente quando crônica, provoca alterações significativas nos circuitos neurais relacionados à regulação emocional, afetando distintas regiões da amígdala. Na amígdala central (CeA), o etanol desestabiliza a homeostase emocional ao modular sistemas neurotransmissores como o GABA (inibitório) e o o CRH (hormônio liberador de corticotropina, com função moduladora), o que aumenta a sensibilidade ao estresse e favorece comportamentos ansiosos, particularmente durante a abstinência, reforçando a compulsividade pela busca e consumo de etano (Gilpin; Herman; Roberto, 2015). Complementarmente, McCool (2021) destaca os efeitos do etanol sobre os circuitos entre o córtex pré-frontal (CPF) e a amígdala basolateral (BLA). Essas conexões córtico-amigdalares são altamente sensíveis à modulação por experiências ambientais estressantes e, sobretudo, pela exposição a substâncias psicoativas como o etanol. A exposição ao álcool modifica a plasticidade sináptica dessas conexões, modulando tanto a excitabilidade quanto o equilíbrio entre neurotransmissores excitatórios (como o glutamato) e inibitórios (como o GABA) na BLA. Tais alterações impactam diretamente o comportamento, podendo favorecer tanto respostas de busca por recompensa quanto respostas de evitação e ansiedade.

Além disso, estudos prévios destacam o papel modulador do sistema endocanabinoide na regulação emocional, especialmente na amígdala. Zarrindast *et al.* (2008) investigaram o papel dos receptores CB1 na amígdala central (CeA) na modulação da ansiedade em ratos Wistar. A administração intra-amigdalóide de agonistas CB1 (como WIN55,212-2) apresentou um efeito ansiolítico, ao passo que a administração de antagonistas CB1 (como AM251) apresentou um efeito ansiogênico. Semelhantemente, Haller *et al.* (2004) investigaram os efeitos do receptor canabinoide CB1 ao utilizar camundongos selvagens e camundongos knockout para o gene CB1 para avaliar os efeitos do antagonista CB1 AM-251 e do agonista WIN-55,212-2. Os resultados mostraram que camundongos com deficiência de CB1 apresentaram maior comportamento semelhante à ansiedade, enquanto o bloqueio seletivo dos receptores CB1 com AM-251 aumentou a

ansiedade de forma dose-dependente nos camundongos selvagens, mas não teve efeito nos camundongos knockout. Por outro lado, o agonista WIN-55,212-2 reduziu o comportamento ansioso em camundongos selvagens, e este efeito foi bloqueado pelo AM-251.

Por sua vez, Basavarajappa, Cooper e Hungbund (1998) investigou os efeitos da administração crônica a vapor de etanol sobre os receptores canabinoides no cérebro de camundongos, particularmente nas membranas plasmáticas sinápticas. Os resultados mostraram que a exposição crônica ao etanol resultou em uma diminuição significativa na densidade de receptores CB1 no cérebro dos camundongos. Posteriormente, Basavarajappa e Hungund (1999), demonstrou também que a exposição crônica ao etanol resultou em uma redução significativa na ativação do receptor CB1, medida por meio da ligação do [³⁵S]GTPγS nas membranas plasmáticas sinápticas de camundongos expostos ao etanol. Essa diminuição indicou que o acoplamento funcional entre o receptor CB1 e a proteína G estava prejudicado, sugerindo uma dessensibilização dos receptores após a exposição crônica ao etanol.

Adicionalmente, Ceccarini *et al.* (2013) demonstraram que, embora a administração aguda de etanol aumente a sinalização endocanabinoide no núcleo accumbens (NAcc), o consumo crônico de etanol promove uma diminuição da ligação relativa de receptores CB1 em regiões como o hipocampo e o córtex orbitofrontal — áreas relacionadas ao processamento de emoções e comportamentos executivos. Essa disfunção regional pode ser reflexo de uma adaptação do sistema endocanabinoide frente à exposição prolongada ao etanol. Considerando que a amígdala também é uma estrutura envolvida no processamento emocional e na modulação do comportamento de medo e ansiedade, a diminuição da expressão de CB1 nessa região pode estar relacionada a mecanismos similares de regulação negativa.

Em síntese, os resultados deste trabalho corroboram os achados da literatura, ao demonstrar que a redução da expressão do receptor CB1 na amígdala está associada ao aumento do comportamento ansioso. Estudos prévios mostraram que a dessensibilização ou bloqueio de CB1 nessa região desencadeia respostas ambivalentes ao medo e eleva a reatividade ao estresse (Zarrindast et al., 2008; Haller et al., 2004), enquanto agonistas de CB1 produzem efeitos ansiolíticos. De modo semelhante, Ceccarini et al. (2013) e Basavarajappa et al. (1998, 1999) relataram que a administração crônica de etanol induz adaptações regionais no sistema endocanabinoide — incluindo diminuição da ligação de CB1. Assim, o padrão observado no presente modelo de intoxicação adolescente, com

redução significativa de CB1 na amígdala e aumento de respostas ansiosas no LCE, reforça o importante papel desse receptor na modulação emocional e sugere que o déficit de sinalização endocanabinoide nessa estrutura é um dos mecanismos subjacentes ao efeito comportamental ansiogênico do etanol.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a exposição ao etanol durante a adolescência induz comportamentos compatíveis com aumento da ansiedade em camundongos, especialmente evidenciados no Labirinto em Cruz Elevado. Além disso, foi observada uma redução na expressão do receptor CB1 na amígdala, sugerindo uma possível via neurobiológica associada ao efeito ansiogênico do etanol. Esses achados reforçam a adolescência como um período de alta vulnerabilidade aos impactos do álcool sobre o sistema emocional. Investigações futuras devem explorar outras doses, períodos de exposição e componentes do sistema endocanabinoide para ampliar o entendimento dos mecanismos envolvidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, B. et al. Relationship between ethanol-induced activity and anxiolysis in the open field, elevated plus maze, light-dark box, and ethanol intake in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**, v. 265, p. 203–215, 2014. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.02.032.

ALVAREZ, R. P. et al. Contextual fear conditioning in humans: cortical-hippocampal and amygdala contributions. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28 (24), p. 6211–6219, 2008. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1246-08.2008.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5^a ed.). Arlington, VA: **American Psychiatric Publishing**.

ARAÚJO, M.; ALMEIDA, M.; ARAÚJO, L. Mecanismo de ação dos canabinoides: visão geral. **Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor, BrJP**, v. 6, p. 109-113, 2023. DOI 10.5935/2595-0118.20230028-PT.

BASAVARAJAPPA, B. S.; COOPER, T. B.; HUNGBUND B. L. Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane. **Brain research** v. 793, p. 212-8, 1-2, 1998. DOI:10.1016/s0006-8993(98)00175-9.

BASAVARAJAPPA, B. S.; HUNGBUND B. L. Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor N-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells. **Journal of neurochemistry**, v. 72 (2), p. 522–528, 1999. DOI: 10.1046/J.1471-4159.1999.0720522.X.

BASAVARAJAPPA, B. S.; HUNGUND B. L. Down-regulation of cannabinoid receptor agonist-stimulated [35S]GTP gamma S binding in synaptic plasma membrane from chronic ethanol exposed mouse. **Brain research** v. 815, n. 1 p. 89-97, 1999. DOI:10.1016/s0006-8993(98)01072-5.

BASAVARAJAPPA, B. S. Endocannabinoid System and Alcohol Abuse Disorders. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1162, p. 89–127, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-21737-2_6.

BEZERRA, L. et al. O papel da sinaptogênese na modulação do sistema nervoso.

RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar, v. 4, n. 8, 2023. DOI: 10.47820/recima21.v4i8.3748.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 55-65, 28 fev. 2003. DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01274-3.

CASEY, B. J.; GLATT, C. E.; LEE, F. S. CAS The adolescent brain. **Developmental Review**, v. 28, p. 62-77, 2008. DOI: 10.1016/j.dr.2007.07.002.

CECCARINI, J. et al. Transient changes in the endocannabinoid system after acute and chronic ethanol exposure and abstinence in the rat: a combined PET and microdialysis study. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 40 (10), p. 1582–1594. DOI: 10.1007/S00259-013-2456-1.

CHWEDOROWICZ, R. et al. Neurophysiological maturation in adolescence - vulnerability and counteracting addiction to alcohol. **Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM**, v. 24 (1), p. 19–25, 2017. DOI: 10.5604/12321966.1234002.

COLOMBO, G. et al. Endocannabinoid system and alcohol addiction: pharmacological studies. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 2, p. 369-380, jun. 2005. DOI: 10.1016/J.PBB.2005.01.022.

CORREIA, D. et al. Trait anxiety and ethanol: anxiolysis in high-anxiety mice and no relation to intake behavior in an addiction model. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 880–888, 1 ago. 2009. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2009.04.015.

COSTALL, B.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J. The anxiolytic and anxiogenic actions of ethanol in a mouse model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, n. 5, p. 287–291, 1988. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1988.tb05218.x.

COSTALL, B. et al. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 32, p. 777–785, 1989. DOI: 10.1016/0091-3057(89)90033-6.

COSTARDI, J. V. et al. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 61, n. 4, p. 381-387, jul./ago. 2015. DOI: 10.1590/1806-9282.61.04.38

CRAWLEY J.; GOODWIN, F. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167–170, ago. 1980. DOI: 10.1016/0091-3057(80)90067-2.

CREWS, F.; HE, J.; HODGE, C. Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 2, p. 189–199, 2007. DOI: 10.1016/j.pbb.2006.12.001.

CRISWELL H. et al.. Effects of ethanol, chlordiazepoxide, and MK-801 on performance in the elevated-plus maze and on locomotor activity. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 18, n. 3, p. 596–601, 1994. DOI: 10.1111/j.1530-0277.1994.tb00916.x.

DUVAL, E. R.; DU, I. Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 11, p. 115–126, 2015. DOI: 10.2147/TCRM.S48528.

GIEDD, J. N. The teen brain: insights from neuroimaging. **The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine**, v. 42 (4), p. 335–343, 2008. DOI: 10.1016/J.JADOHEALTH.2008.01.007.

GILPIN, N.; HERMAN M. A.; ROBERTO M. The central amygdala as an integrative hub for anxiety and alcohol use disorders. **Biological psychiatry**, vol. 77,10, p. 859-869, 2015. DOI:10.1016/j.biopsych.2014.09.008.

GROBIN, A. et al. The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol. **Psychopharmacology** 139, 2–19 (1998). DOI: 10.1007/s002130050685

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

HALLER, J. et al. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. **Behavioural pharmacology** vol. 15, 4. p. 299-304, 2004. DOI:10.1097/01.fbp.0000135704.56422.40

HANSON, K. L. et al. Impact of Adolescent Alcohol and Drug Use on Neuropsychological Functioning in Young Adulthood: 10-Year Outcomes. **Journal of child & adolescent substance abuse**, v. 20 (2), p. 135–154, 2011. DOI: 10.1080/1067828X.2011.555272.

JOSHI, N.; ONAIVI, E. S. Endocannabinoid System Components: Overview and Tissue Distribution. **Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology**, 1–12 2019. DOI:10.1007/978-3-030-21737-2_1.

KAMEDA, S. R. et al. Dissociation of the effects of ethanol on memory, anxiety, and motor behavior in mice tested in the plus-maze discriminative avoidance task. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 192, n. 1, p. 39–48, 2007. DOI: 10.1007/s00213-006-0684-9.

KLIETHERMES, C. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 8, p. 837–850, 2005. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2004.11.001.

KLIETHERMES, C.; CRONISE, K.; CRABBE, J. C. Anxiety-like behavior in mice in two apparatuses during withdrawal from chronic ethanol vapor inhalation. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 28, n. 7, p. 1012–1019, 2004. DOI: 10.1097/01.alc.0000131976.40428.8f.

KNIGHT, D. C. et al. Amygdala and hippocampal activity during acquisition and extinction of human fear conditioning. **Cognitive, affective & behavioral neuroscience**, v. 4 (3), p. 317–325, 2004. DOI: 10.3758/CABN.4.3.317.

KULESSKAYA, N.; VOIKAR, V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light–dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. **Physiology & Behavior**, v. 133, p. 30–38, 2014. DOI: 10.1016/j.physbeh.2014.05.006.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology** (Berl), v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LAU, J. Y.; WATERS, A. M. Annual Research Review: An expanded account of information-processing mechanisms in risk for child and adolescent anxiety and depression. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 58 (4), p. 387–407, 2017. DOI: 10.1111/JCPP.12653.

LEES, B. et al. Effect of alcohol use on the adolescent brain and behavior. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 192, 172906, 2020. DOI: 10.1016/J.PBB.2020.172906.

LU, H. C.; MACKIE, K. Review of the Endocannabinoid System. **Biological psychiatry. Cognitive neuroscience and neuroimaging**, v. 6 (6), p. 607–615, 2021. DOI:

10.1016/J.BPSC.2020.07.016.

MALDONADO, R.; CABAÑERO, D.; MARTÍN-GARCÍA, E. The endocannabinoid system in modulating fear, anxiety, and stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, 22(3), 229–239, 2020. DOI: 10.31887/DCNS.2020.22.3/rmaldonado.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 897–931, 2001. DOI: 10.1146/ANNUREV.NEURO.24.1.897.

MCCOOL, B. Ethanol modulation of cortico-basolateral amygdala circuits: Neurophysiology and behavior. **Neuropharmacology** v. 197, 108750, 2021. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108750.

MILLER, L. P. et al. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain-I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. **Neuroscience**, v. 35, p. 31-43, 1990. DOI: 10.1016/0306-4522(90)90118-n.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Problemas de la salud de la adolescencia: informe de un comité de expertos de la O.M.S. Informe técnico n. 308. Ginebra: Organización Mundial da Saúde, 1965.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global status report on alcohol and health and treatment of substance use disorders. Geneva: World Health Organization, 25 jun. 2024.

PAVA, M. J.; WOODWARD J. A review of the interactions between alcohol and the endocannabinoid system: Implications for alcohol dependence and future directions for research. **Alcohol**, v. 46 (3), p. 185–204, 2012. DOI: 10.1016/J.ALCOHOL.2012.01.002.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, 3rd edition, California, USA, 2008.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, New York, v. 24, n. 3, p. 525–529, mar. 1986. DOI: 10.1016/0091-3057(86)90552-6.

ROBERTO, M. et al. Acute and Chronic Ethanol Alter Glutamatergic Transmission in Rat Central Amygdala: an In Vitro and In Vivo Analysis. **Journal of Neuroscience**, 24(7), 1594–1603, 2004. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5077-03.2004

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801–810, 1997. DOI: 10.1016/S0149-7634(96)00058-9.

ROMER, D.; REYNA, V. F.; SATTERTHWAITE, T. D. Beyond stereotypes of adolescent risk taking: Placing the adolescent brain in developmental context. **Developmental cognitive neuroscience**, v. 27, p. 19–34, 2017. DOI: 10.1016/J.DCN.2017.07.007.

RUBIO, FJ. Et al. Context-induced reinstatement of methamphetamine seeking is associated with unique molecular alterations in Fos-expressing dorsolateral striatum neurons. **Journal of Neuroscience**, 2015. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4997-14.2015.

SPEAR, L. Modeling Adolescent Development and Alcohol Use in Animals. **Alcohol Research & Health**, v. 24, n. 2, p. 115–123, 2000. DOI: 10.1155/2000/6713014.

SPEAR, L. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 4, p. 417–463, 2000. DOI: 10.1016/s0149-7634(00)00014-2.

SPEAR L. Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behavior. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19 (4), p. 197–214, 2018. DOI:10.1038/NRN.2018.10.

THANOS, Panayotis K. et al. Ethanol self-administration and ethanol conditioned place preference are reduced in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 164, n. 2, p. 206–213, 2005. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.06.021.

TOTTENHAM, N.; GALVÁN, A. Stress and the adolescent brain: Amygdala-prefrontal cortex circuitry and ventral striatum as developmental targets. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 70, p. 217–227, 2016. DOI: 10.1016/J.NEUBIOREV.2016.07.030.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, p. 317–331, 2015. DOI:10.1038/nrn3945.

VARLINSKAYA, E. et al. Effects of chronic intermittent ethanol exposure during early and late adolescence on anxiety-like behaviors and behavioral flexibility in adulthood. **Behavioural Brain Research**, v. 372, p. 112292, 2019. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112292.

VAN HEES, L. Voluntary alcohol binge-drinking in adolescent C57Bl6 mice induces delayed appearance of behavioral defects in both males and females. **Addiction biology**, v. 27 (1), e13102, 2022. DOI: 10.1111/ADB.13102.

VORE, AS. et al. Adolescent Ethanol Exposure Leads to Stimulus-Specific Changes in Cytokine Reactivity and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Sensitivity in Adulthood. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 78, 3 maio 2017. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00078.

WANG, X. et al. Chronic ethanol exposure induces neuroinflammation in H4 cells through TLR3 / NF- κ B pathway and anxiety-like behavior in male C57BL/6 mice. **Toxicology**, v. 440, p. 152625, 2020. DOI: 10.1016/j.tox.2020.152625.

XIE, S. et al. Adolescent anxiety disorders and the developing brain: comparing neuroimaging findings in adolescents and adults. **General psychiatry**, v. 34 (4), e100411, 2021. DOI: 10.1136/GPSYCH-2020-100411.

ZARRINDAST, M. et al. Cannabinoid CB1 receptors of the rat central amygdala mediate anxiety-like behavior: interaction with the opioid system. **Behavioural pharmacology**, v. 19, n. 7, p. 716-23, 2008. DOI:10.1097/FBP.0b013e3283123c83.

ZHANG, Z. et al. Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Hoboken, v. 31, n. 11, p. 1811–1819, nov. 2007. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2007.00483.

ANEXO A – Certificado de Comissão de Ética na Utilização de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Reitoria
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Comissão de Ética na Utilização de Animais
 Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 02 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8658 - www.comissoes.propp.ufu.br/ceua - ceua@propp.ufu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Avaliação dos Efeitos da Intoxicação Alcoólica nas respostas Neurocomportamentais em Camundongos Adolescentes”**, protocolo nº **23117.080005/2023-09**, sob a responsabilidade de **Rodrigo Molini Leão** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **01 de dezembro de 2023**.

(We certify that the project entitled **“Avaliação dos Efeitos da Intoxicação Alcoólica nas respostas Neurocomportamentais em Camundongos Adolescentes”** protocol **23117.080005/2023-09**, under the responsibility of **Rodrigo Molini Leão** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of **December 01th, 2023**).

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Início: 01/02/2024 Término: 31/01/2026
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo Isogênico/ C57BL/6J - 96 animais Rato Heterogênico/ Long-Evans - 4 animais
Número de animais	100 animais
Peso / Idade	3 semanas (21 dias)/ 10 - 12 gramas 3 - 6 meses/ 300 - 500 gramas
Sexo	Fêmea (48) e Macho (48) Macho (4)
Origem / Local	REBIR/UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR/UFU



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Fernando Moreira Izidoro, Coordenador(a)**, em 08/12/2023, às 14:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do **Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015**.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5031447** e o código CRC **7C77B9BD**.