

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (PIPGCF)**



ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP Araraquara



**“Etanol e suas associações: efeitos
comportamentais e cardiovasculares”**

Sheila Antonagi Engi

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (PIPGCF)**



ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP Araraquara



**“Etanol e suas associações: efeitos
comportamentais e cardiovasculares”**

Sheila Antonagi Engi

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Associação Ampla UFSCar/UNESP Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Fisiológicas.

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

E57e Engi, Sheila Antonagi
Etanol e suas associações: efeitos comportamentais e cardiovasculares / Sheila Antonagi Engi. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
94 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Dependência. 2. Etanol. 3. Toxicidade cardiovascular. 4. mTORC1. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Sheila Antonagi Engi, realizada em 26/09/2016:

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta
UNESP

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel
UFU

Profa. Dra. Isabel Marian Hartmann de Quadros
Unifesp

Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari
UNESP

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza
UFSCar

DEDICATÓRIA

“Dedico esta tese à minha família e em especial à minha mãe **Suely Braz Antonagi**, que sempre esteve ao meu lado nessa jornada acadêmica.”



AGRADECIMENTOS

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia, e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

(Fernando Teixeira de Andrade)

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha mãe por ter estado ao meu lado nessa jornada acadêmica e ter me apoiado, desde sempre. Agradeço também à minha família que, depois de tanto tempo, tive a oportunidade de reencontrar. Mesmo longe, estão sempre comigo!

Gostaria de agradecer enormemente à Prof^a Dr^a Cleopatra, mais conhecida como Cleo, pelos anos de orientação e ensinamentos. Com certeza, a profissional que sou hoje é reflexo dos anos que passei no laboratório sob sua orientação. Hoje consigo olhar para tras e ver a bagagem de conhecimento que adquiri com você e que, com certeza, levarei comigo.

Obrigada ao Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani, que sempre me ajudou em momentos críticos e sempre se mostrou disposto a me ajudar com minhas dúvidas. Também agradeço pelo incentivo acadêmico, sempre me incentivando nas publicações que temos parceria. Meus ganhos acadêmicos também são seus.

Ao Prof. Dr. Ricardo Nunes de Souza agradeço pelas risadas e piadas que sempre são acompanhadas de algum conhecimento científico, vou sentir saudades dos cafés divertidos na copinha.

Ao agora Professor Dr. Fabio Cardoso Cruz pela amizade e por sempre estar disposto a ajudar nos experimentos. Agradeço também pela colaboração e aprendizado ao longo do meu projeto.

Ao Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli pelo fornecimento dos micro chips utilizados para a dosagem de integridade de mRNA. E à assistente de suporte acadêmico Mariana pelo desenvolvimento da técnica.

Agradeço à Bete e Rô por sempre estarem dispostas a me ajudar, sempre que eu precisava. Além de excelentes profissionais sempre me senti acolhida por vocês. Para você Rô, deixo um agradecimento especial com cheirinho de maezona - porque sempre foi essa imagem que tive de você. Entre risadas e experimentos aprendia a ser um ser humano melhor com você. Acho que as palavras bondade, doação e alegria te definem!



À nossa secretária de departamento Tirene (Ti) agradeço não somente o excelente trabalho (burocrático) desenvolvido mas agradeço enormemente pela amizade e pelo “teto” nos momentos em que mais precisei. Obrigada pelos pensamentos e conselhos “tortos”, risadas e choros.

Agradeço à minha irmã e amiga de todas as horas Natália, não importa onde estamos sempre carregamos quem amamos no coração!

Agradeço meus amigos de laboratório pela convivência diária, dentro e fora do laboratório: **Diego, Johnny, Jonas, Josi, Lucas, Lucas Barreto, Marion, Matheus (Capiau), Nathália, Paola (Pink), Paula (Cérebro), Ricardo, Willian**. Em especial agradeço a **Tati** pela grande amizade desde que nos conhecemos. E ao meu irmãozinho **Gessy**: aprendi que amizade não é sempre concordar com o que a pessoa *quer ouvir*, mas sim falar o que a pessoa *precisa escutar*! Obrigada por sempre tentar abrir meus olhos independente de qualquer coisa – “A gente não faz amigos, reconhece-os” (Garth Henrichs).

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) pela oportunidade de desenvolver meu projeto de pesquisa. E à Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela espaço cedido ao desenvolvimento de meu projeto.

À University of California – San Francisco, ao Departamento de Neurologia da School of Medicine e Dr^a Dorit Ron pelo espaço cedido para desenvolvimento da BEPE.

À FAPESP pelo auxílio financeiro para desenvolvimento dos projetos no Brasil (Processo Fapesp 2012/14723-1) e no exterior (Processo Fapesp 2014/23231-0).

Aos sujeitos utilizados em todos os meus experimentos, meu respeito.



RESUMO

O abuso de drogas é considerado um problema de saúde pública mundial. No Brasil, dados epidemiológicos têm mostrado um crescimento no consumo de drogas ilícitas e lícitas, dentre elas destacam-se o etanol e os esteroides anabólicos. Vários estudos demonstram que exercício físico pode influenciar o consumo e a preferência por etanol, além disso, a prática de exercício físico é positivamente relacionada ao uso abusivo de esteroides anabolizantes. Contudo nenhum estudo investigou as consequências da associação desses três fatores. No presente estudo investigamos: 1) os efeitos da prática diária de exercício físico associada ao tratamento com testosterona no consumo intermitente livre de etanol; 2) as consequências da associação entre prática de exercício físico moderado de esteira, consumo crônico intermitente livre de etanol e tratamento crônico de testosterona sobre o sistema cardiovascular de ratos. Vários estudos sugerem que o complexo 1 da proteína alvo da rapamicina de mamíferos (mTORC1- “mammalian target of rapamycin complex”) participa dos mecanismos associados ao uso de etanol. Assim, adicionalmente, investigamos o papel da mTORC1 na manutenção do consumo de etanol de livre escolha. Nossos resultados demonstraram que a) o exercício físico melhorou a performance de corrida em esteira e não modificou o consumo de etanol; b) o consumo voluntário de etanol não foi afetado nem pelo treinamento físico e nem pelo tratamento com testosterona; c) consumo voluntário intermitente de etanol não afetou os parâmetros basais de pressão arterial média e frequência cardíaca; d) o tratamento com testosterona causou bradicardia de repouso; e) consumo de etanol e tratamento com testosterona alteraram a reatividade vascular a agentes vasoativos, que também foi

influenciada pelo treinamento físico. Esses resultados mostram a primeira evidência do efeito do consumo voluntário de etanol combinado com o tratamento de testosterona nas funções cardiovasculares de ratos treinados. Para finalizar, nossos resultados sugerem que a cascata “*downstream*” da mTORC1 parece estar relacionada com o consumo excessivo e abusivo de etanol.

Palavras-chave: dependência, etanol, toxicidade cardiovascular, mTORC1.

ABSTRACT

Alcohol abuse is a worldwide problem with concomitant medical, social and economic costs. In Brazil, epidemiological data show an increase in the abuse of illicit and licit drugs, such as ethanol and steroids. Studies indicate that physical exercise influences ethanol consumption and preference and is positively correlated with steroids abuse. Despite many evidences, there is no study about the association between ethanol consumption, physical exercise and steroids abuse. In the present study, we investigated 1) the effects of physical exercise associated to testosterone treatment in ethanol intermittent access drinking; 2) consequences of the association between physical exercise, ethanol intermittent access and chronic testosterone treatment upon the cardiovascular system of rats. Many studies suggest that the mTORC1-mammalian target of rapamycin complex participates in the mechanisms related to ethanol abuse. In this way, we investigated the mTORC1 role in the ethanol intermittent access consumption maintenance. Our results showed that a) physical exercise improved treadmill performance in rats and did not change ethanol consumption; b) ethanol voluntary consumption was not affected either by physical exercise or by testosterone treatment; c) ethanol voluntary intermittent access did not change basal arterial pressure and heart rate; d) testosterone treatment caused rest bradycardia; e) ethanol consumption and testosterone treatment altered vascular reactivity to vasoactive agents, that was also altered by physical exercise. These results show the first evidence of ethanol intermittent access and testosterone treatment on cardiovascular functions in trained rats. Our results also suggest that the downstream mTORC1 pathway is related to excessive and abusive ethanol consumption.

LISTA DE ABREVIATURAS

4EBP – fator de iniciação eucariótico 4E

BNST – núcleo intersticial da estria terminal

CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas

DAG – diacilglicerol

DMSO – dimetilsulfóxido

DPN – dia pós natal

EAAs – esteróides androgênicos anabólicos

eIF4E – fator de iniciação eucariótico 4E

eIF4F – fator de iniciação eucariótico 4F

eIF4G – fator de iniciação eucariótico 4G

EPM – erro padrão da média

ERK – proteína quinase de regulação de sinalização extracelular

ETOH – etanol

FC – frequência cardíaca

I.C.V. – intra cérebro ventricular

I.M. – intramuscular

I.P. – intraperitoneal

IP3 – trifosfato de inositol

mTORC 1 – mammalian target of rapamycin complex

NAc – núcleo accumbens

NaCl – cloreto de sódio

NMDA – N-metil D-aspartato

NPS – nitroprussiato de sódio

PAD – pressão arterial diastólica

PAM – pressão arterial média

PAP – pressão arterial pulsátil

PAS – pressão arterial sistólica

PEG 300 - polietilenoglicol 300

PI3K – 3-fosfatidilinositol quinase

PKC – proteína quinase C

PLC – isoforma da fosfolipase C

S6K – proteína ribossomal S6 cinase

SNC – sistema nervoso central

T – testosterona

TEF – teste de esforço físico

Veic – veículo

VTA – área tegmental ventral

SUMÁRIO

ASPECTOS GERAIS	16
<u>CAPÍTULO 1</u>	
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. ANIMAIS	30
3.2. DROGAS	31
3.3. ACESSO INTERMITENTE A DUAS GARRAFAS	32
3.4. EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO DE ESTEIRA	33
3.5. TRATAMENTO COM TESTOSTERONA	34
3.6. CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS	34
3.7. REGISTRO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES ..	35
3.8. INFUSÃO DE AGENTES VASOATIVOS	35
3.9. CURVAS DOSES-RESPOSTA DA PAM	36
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1. TREINAMENTO MODERADO DE CORRIDA EM ESTEIRA MELHORA DESEMPENHO FÍSICO NO TEM INDEPENDENTE DO CONSUMO DE ETANOL E TRATAMENTO COM TESTOSTERONA	42
6.2. EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO DE ESTEIRA E/OU TRATAMENTO COM TESTOSTERONA NO CONSUMO DE ETANOL	44
6.3. EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA PRÁTICA DE TREINAMENTO MODERADO DE ESTEIRA, DO CONSUMO DE ETANOL E DO TRATAMENTO CRÔNICO DE TESTOSTERONA NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS), PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (PAD) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC).....	46
6.4. EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO DE ESTEIRA E/OU TRATAMENTO COM TESTOSTERONA NAS ALTERAÇÕES DE PAM CAUSADAS POR AGENTES VASOATIVOS	48

7. DISCUSSÃO.....	53
8. CONCLUSÃO	59
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	60

CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO.....	68
2. OBJETIVOS.....	72
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
3.1. ANIMAIS	73
3.2. DROGAS	73
3.3. ACESSO INTERMITENTE A DUAS GARRAFAS	73
3.4. ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE 4EGI-1 E PF-4708671 E MENSURAÇÃO DO CONSUMO DE ETANOL	74
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76
5. RESULTADOS.....	76
5.1. ADMINISTRAÇÃO DE RAPAMICINA DIMINUI O CONSUMO EM “BINGE” DE CAMUNDONGOS	76
5.2. ADMINISTRAÇÃO DE PF-4708671 NÃO ALTEROU O CONSUMO EM “BINGE” DE CAMUNDONGOS	79
5.3. ADMINISTRAÇÃO DE 4EGI-1 NÃO ALTEROU O CONSUMO EM “BINGE” DE CAMUNDONGOS	82
5.4. ADMINISTRAÇÃO COMBINADA DE PF-4708671 E 4EGI-1 DIMINUIU O CONSUMO EM “BINGE” DE CAMUNDONGOS.....	85
6. DISCUSSÃO.....	88
7. CONCLUSÃO	91
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	92

ASPECTOS GERAIS

No Brasil, o início do consumo de bebidas alcoólicas ocorre precocemente. Galduroz et al. (2004) relatam que 31,2% dos estudantes da rede pública de ensino, com idade entre 10 e 12 anos, já haviam feito uso de etanol na vida. O uso freqüente entre os estudantes de ensino fundamental e médio foi de 8,4% e o uso pesado foi de 5,0%. Dados do CEBRID (2009) indicam uma prevalência de 12,3% de dependentes de etanol no Brasil, que corresponde a aproximadamente 6 milhões de pessoas com idade acima de 15 anos.

Os EAAs têm surgido como drogas de abuso nos últimos anos, entretanto, a literatura sobre esse assunto ainda é escassa. Levantamento realizado pelo CEBRID (2009) mostra prevalência de 0,9% de indivíduos que já fizeram uso, pelo menos uma vez na vida, de EAA. Vale ressaltar que esses dados não apareceram no levantamento realizado em 2001 e que foram incluídos no levantamento de 2009 em decorrência do crescente número de relatos de abuso dessas substâncias.

Ferreira et al. (2007) relataram o uso de EAA entre estudantes universitários, sendo que a prevalência é de 3% entre alunos de diversos cursos e cerca de 12% entre os alunos de Educação Física. Estes autores relatam ainda a prevalência de 5,46% em estudantes do ensino médio, sendo essa prevalência maior no sexo masculino (10,69%) quando comparado ao sexo feminino (1,10%), e consideravelmente maior em praticantes de esportes (10,77%) em relação aos não praticantes (1,05%). Dessa maneira, fica evidente a associação entre prática de exercícios físicos e abuso de EAAs (SMITH e LYNCH, 2012).

A utilização dos EAAs por praticantes de exercícios físicos decorre dos efeitos anabólicos destas substâncias e é normalmente motivada pela melhora no desempenho ou nos resultados estéticos do treinamento (BAHRKE e YESALIS, 2004). Além disso, o uso de EAAs ocorre em supradoses e juntamente com o uso abusivo ocorre o desenvolvimento de distúrbios hormonais com uma variedade de consequências em outros sistemas do organismo, tais como o sistema cardiovascular (FERRER et al., 1994; MATSUDA et al., 1994; BAGATELL e BREMNER, 1996; EBENBICHLER et al., 2001; BEUTEL et al., 2005; VAN AMSTERDAM et al., 2010; ENGI et al., 2012).

A importância da atividade física é bem documentada na literatura. Sabe-se que a atividade física regular pode reduzir vários problemas de saúde, tais como obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes (STEINBECK, 2001). Contudo, vários estudos têm demonstrado resultados conflitantes a respeito do provável efeito protetor dos exercícios físicos no uso de substâncias psicoativas. Enquanto alguns autores relatam diminuição do uso de substâncias psicoativas em praticantes de exercícios físicos (EHRINGEE, HOFT e ZUNHAMER, 2009; FONTES-RIBEIRO et al., 2011), outros relatam uma relação positiva entre atividade física e aumento do uso dessas substâncias (JOHANSSON et al., 2000; WERME et al., 2002, FRENCH et al., 2009).

Além da relação entre prática de atividade física e consumo de EAAs, dados da literatura também indicam a associação entre exercício físico e consumo de etanol (PATE et al., 1996; WESTERTERP et al., 2004; FRENCH et al., 2009; BARRY e PIAZZA-GARDNER, 2012). Por exemplo, os estudos de Barry e Piazza-Gardner (2012) sugerem que a atividade física está fortemente

relacionada com o consumo em “binge” (ingestão de grandes quantidades em pequeno período de tempo) de etanol em estudantes americanos de 18 a 24 anos. No mesmo sentido, French et al. (2009) demonstraram que, entre estudantes, exercício físico e consumo de etanol estão positivamente relacionados.

Dados da literatura indicam efeitos deletérios do etanol e EAAs em sistemas complexos de nosso organismo, tal como o cardiovascular (WALKER et al., 2013; CRESTANI et al., 2014; LAURENT e EDWARDS, 2014; SEKI et al., 2015). Dessa maneira, existe uma vasta literatura a respeito das consequências nocivas do etanol e EAAs no sistema cardiovascular, tais como aumento da pressão arterial e mudanças nas respostas de baroreflexo, hipertrofia cardiovascular, disfunção diastólica e perda de cardiomiócitos (BAGATEL e BREMNER, 1996; BEUTEL et al., 2005; VAN AMSTERDAN et al., 2010; ENGI et al., 2012; WALKER et al., 2013; CRESTANI et al., 2014; LAURENT e EDWARDS, 2014; SEKI et al., 2015).

No SNC, é bem relatado na literatura a presença de regiões de ação dos EAAs que modificam direta ou indiretamente os mecanismos de regiões como córtex frontal, locus coeruleus, hipocampo e substância negra – regiões que estão relacionadas com desenvolvimento da dependência (LYNCH et al., 2001). Os EAAs podem agir através de receptores nucleares, que são responsáveis por respostas genômicas lentas, e também através de receptores de membrana, que são responsáveis por respostas não genômicas rápidas (WATSON e GAMETCHU, 1999). Apesar dos relatos da literatura, ainda são escassos e controversos os dados quanto ao real mecanismo de ação dos EAAs no sistema nervoso central.

O etanol apresenta um mecanismo de ação amplo e complexo no sistema nervoso central, com a participação de vários substratos neurais e neurotransmissores. De maneira simplificada, o etanol promove alterações no balanço que existe entre os neurotransmissores excitatórios e inibitórios do SNC através de vários sítios de ação. O etanol possui ações em receptores GABA A (facilitando a neurotransmissão inibitória), receptores NMDA e cainato (em que promove a inibição da ação do glutamato, inibindo sua ação excitatória), receptores nicotínicos (ação estimulante direta na VTA), receptores serotoninérgicos (ação estimulante), canais de cálcio controlados por voltagem (ação estimulante) (RANG et al., 2012). O etanol também produz seus efeitos alterando o funcionamento de proteínas que afetam a excitabilidade neuronal, a função de enzimas ligadas às membranas, assim como, enzimas e proteínas envolvidas na transdução de sinal, canais iônicos e expressão gênica (VANGELIENE et al., 2008; NOORI, SPANAGEL e HANSSON, 2012).

Com o objetivo de contribuir para compreensão das consequências do uso do etanol sozinho e sua associação com exercício físico e EAAs investigamos: 1) os efeitos da prática de exercício físico de esteira combinado com o uso de EAA no consumo de etanol de ratos adultos utilizando o modelo de acesso intermitente a duas garrafas; 2) os efeitos tóxicos cardiovasculares decorrentes da prática de exercício físico de esteira, administração de EAA e consumo de etanol. O aprofundamento da fundamentação teórica e os resultados dessas investigações estão descritas no Capítulo I.

Outro aspecto fundamental para a compreensão dos problemas relacionados ao uso de etanol é a investigação dos mecanismos neurais subjacentes ao abuso e dependência dessa substância. Neste sentido,

diversos estudos demonstram que a exposição repetida ao etanol promove neuroplasticidades em regiões centrais do sistema límbico e que seu uso repetido e crônico pode levar ao desenvolvimento da dependência (KOOB, 2000; VANGELIENE et al., 2008).

O complexo proteico mTORC1 têm sido amplamente proposto como uma das cascatas que são ativadas pelo uso agudo e crônico de etanol (BUFFINGTON, HUANG e COSTA-MATTIOLI, 2014; NEASTA et al., 2014). Contudo, poucos estudos investigaram os componentes “*downstream*” da cascata da mTORC1 e sua relação com o consumo de etanol em modelos animais. No Capítulo II são apresentados os resultados da investigação do papel da cascata “*downstream*” da mTORC1 no uso abusivo de etanol através da utilização de inibidores, que atuam especificamente em proteínas abaixo da mTORC1, diminuindo o consumo de etanol. Essas atividades foram desenvolvidas no Departamento de Neurologia, da School of Medicine/University of California sob a orientação da Dr^a Dorit Ron, durante o desenvolvimento do estágio com Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE/FAPESP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGATELL, C.J.; BREMNER, W.J. Androgens in men: uses and abuses. *N Engl J Med.*, v. 334, p. 707-714, 1996.

BAHRKE, M. S.; YESALIS, C.E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 4, p. 614–620, 2004.

BARRY, A.E.; PIAZZA-GARDNER, A.K. Drunkorexia: understanding the co-occurrence of alcohol consumption and eating/exercise weight management behaviors. *American College Health*, v. 60, p. 236-243, 2012.

BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, v. 93, p. 43-48, 2005.

BUFFINGTON, S.A.; HUANG, W.; COSTA-MATTIOLI, M. Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 37, p. 17-38, 2014.

CEBRID (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS). Disponível em <http://200.144.91.102/cebridweb/default.aspx>. Acesso em 25 de março de 2012.

CRESTANI, C.C.; LOPES, D.A.; SILVA, A.; SCOPINHO, A.A.; RUGINSK, S.G.; UCHOA, E.T.; CORREA, F.M. Cardiovascular alterations at different stages of hypertension development during ethanol consumption: time- course of vascular and autonomic changes. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v. 280 (2), p. 245-255, 2014.

EBENBICHLER, C.F.; STURM, W.; GÄNZER, H.; BODNER, J.; MANGWETH, B.; RITSCH, A.; SANDHOFER, A.; LECHLEITNER, M.; FÖGER, B.; PATSCH, J.R. Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in male body builders taking anabolic-androgenic steroids. *Atherosclerosis*, v. 158, p. 483-490, 2001.

EHRINGER, M.A.; HOFT, N.R.; ZUNHAMMER, M. Reduced alcohol consumption in mice with access to a running wheel. *Alcohol.*, v. 43, p. 443–452, 2009.

ENGI, S.A.; CRUZ, F.C.; LEÃO, R.M.; CORRÊA, F.M.; PLANETA, C.S.; CRESTANI, C.C. Effect of the single or combined administration of cocaine and testosterone on cardiovascular function and baroreflex activity in unanesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol.*, v. 59, p. 231-240, 2012.

FERREIRA, U.M.G.; FERREIRA, A.C.D.; AZEVEDO, A.M.P.; MEDEIROS, R.L.; DA SILVA, C.A.B. Esteróides anabólicos androgênicos. *Rev Bras Promoção da Saude*, v. 20, p.267-275, 2007.

FERRER, M.; ENCABO, A.; MARÍN, J.; BALFAGÓN, G. Treatment with the anabolic steroid, nandrolone, reduces vasoconstrictor responses in rabbit arteries. *Eur J Pharmacol.*, v. 258, p. 103-110, 1994.

FONTES-RIBEIRO, C.A.; MARQUES, E.; PEREIRA, F.C.; SILVA, A.P.; MACEDO, T.R.A. May Exercise Prevent Addiction? *Current Neuropharmacology*, v. 9, p. 45-48, 2011.

FRENCH, M.T. Do alcohol consumers exercise more? Findings from a national survey. *American Journal of Health Promotion*, v. 24, p. 2-10, 2009.

GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; FONSECA, A.M.; CARLINI, E.A. V Levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas ensino nas 27 capitais brasileiras. São Paulo: Centro Brasileiro entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de Informações sobre Drogas Psicotrópicas - CEBRID, 399 p., 2004.

JOHANSSON, P.; LINDQVIST, A.; NYBERG, F.; FAHLKE, C. Anabolic androgenic steroids affects alcohol intake, defensive behaviors and brain opioid peptides in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 67, p. 271– 279, 2000.

KOOB, G. Animal models of craving for ethanol. *Addiction*, v. 2, p. 73-81, 2000.

LAURENT, D.; EDWARDS, J.G. Alcoholic Cardiomyopathy: Multigenic Changes Underlie Cardiovascular Dysfunction. *J Cardiol Clin Res.*, v. 2 (1), p. 1-14, 2014.

LYNCH, W.J.; ROTH, M.E.; MICKELBERG, J.L.; CARROLL, M.E. Role of estrogen in the acquisition of intravenously self-administered cocaine in female rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 68 (4), p. 641-6, 2001.

MATSUDA, K.; RUFF, A.; MORINELLI, T.A.; MATHUR, R.S.; HALUSHKA, P.V. Testosterone increases thromboxane A2 receptor density and responsiveness in rat aortas and platelets. *Am J Physiol.*, v. 267, p. 887-893, 1994.

NEASTA, J.; BARAK, S.; HAMIDA, S.B.; RON, D. mTOR complex 1: a key player in neuroadaptations induced by drugs of abuse. *J. Neurochem.*, v. 130 (2), p. 172-184, 2014.

NOORI, H.R.; SPANAGEL, R.; HANSSON, A.C. Neurocircuitry for modeling drug effects. *Addict Biol.*, v. 17 (5), p. 827-64, 2012.

PATE, R.R.; HEALTH, G.W.; DOWDA, M.; TROST, S.G. Associations between physical activity and other health behaviors in a representative sample of US adolescents. *American Journal of Public Health*, v. 86, p. 1577-1581, 1996.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. Farmacologia. Elsevier Ed.; Rio de Janeiro, 7º Ed., 2012.

SEKI, S.; YOSHITSUGU, O.; TSUMODA, S.; TAKEMOTO, T.; KOYAMA, T.; YOSHIMURA, M. Impact of alcohol intake on the relationships of uric acid with blood pressure and cardiac hypertrophy in essential hypertension. *J Cardiol.*, [Epub ahead of print], 2015.

SMITH, M.A.; LYNCH W.J. Exercise as a potential treatment for drug abuse: evidence from preclinical studies. *Frontiers in Psychiatry*, v. 2, p. 1-10, 2012.

STEINBECK, K.S. The importance of physical activity in the prevention of overweight and obesity in childhood: a review and an opinion. *Obes Rev.*, v. 2 (2), p. 117-30, 2001.

VAN AMSTERDAM, J.; OPPERHUIZEN, A.; HARTGENS, F. Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. *Regul Toxicol Pharmacol.*, v. 57, p. 117-123, 2010.

VANGELIENE, V.; BILBAO, A.; MOLANDER, A.; SPANAGEL, R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol.*, v. 154 (2), p. 299-315, 2008.

WALKER, R.K.; COUSINS, V.M.; UMOH, N.A.; JEFFRESS, M.A.; TAGHIPOUR, D.; AL-RUBAIEE, M.; HADDAD, G.E. The good, the bad and the ugly with alcohol use and abuse on the heart. *Alcohol Clin Exp Res.*, v. 37 (8), p. 1253–1260, 2013.

WATSON, C.S.; GAMETCHU, B. Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc Soc Exp Biol Med.*, v. 220, p. 9-19, 1999.

WERME, M.; LINDHOLM, S.; THORÉN, P.; FRANCK, J.; BRENÉ, S. Running increases ethanol preference. *Behav Brain Res.*, v. 18, p. 301-8, 2002.

WESTERTERP, K.R.; MEIJER, E.P.; GORIS, A.H.; KESTER, A.D. Alcohol energy intake and habitual physical activity in older adults. *British Journal of Nutrition*, v. 91, p.149-152, 2004.

Impacto do exercício físico, consumo de etanol e tratamento com testosterona no SNC e sistema cardiovascular

1. INTRODUÇÃO

Estudos em humanos demonstram haver uma relação positiva entre prática de exercícios físicos e consumo de etanol em diferentes idades (PIAZZA-GARDNER e BARRY, 2012). Estudos em animais demonstram que exercício físico pode influenciar o consumo e a preferência por etanol (MCMILLAM, MCCLURE, HARDWICK, 1995; EHRINGER, HOFT, ZUNHAMMER, 2009; HAMMER et al., 2010; BRAGER e HAMMER, 2012; DARLINGTON et al., 2014), muito possivelmente em decorrência das neuroplasticidades nos mecanismos neurofisiológicos do sistema de recompensa (DARLINGTON et al., 2014).

A associação entre exercício físico e etanol é particularmente relevante quando se trata de disfunções cardiovasculares. Dessa maneira, estudos pré-clínicos demonstraram que o treinamento físico atenua a hipertensão induzida pelo tratamento crônico com etanol (HUSAIN, MEJIA, LALLA, 2006; HUSAIN, VAZQUEZ ORTIZ, LALLA, 2006). Entretanto, os mecanismos envolvidos nos efeitos do exercício físico nas funções centrais e cardiovasculares em animais expostos ao etanol são pouco compreendidos.

Nas funções cardiovasculares, o exercício físico é um aliado na prevenção e tratamento de patologias. Dados epidemiológicos e estudos pré-clínicos têm demonstrado que a prática de exercícios físicos causa bradicardia de repouso (WALLACE, 2003), melhora das funções cardíacas (COSTA-PEREIRA et al.,

2016) e tem um papel importante no tratamento da hipertensão (VERAS-SILVA et al., 1997; CIOLAC, 2012).

O etanol é uma substância depressora do SNC que promove alterações no balanço de neurotransmissores inibitórios e excitatórios e produz seus efeitos alterando o funcionamento de proteínas que afetam a excitabilidade neuronal, a função de enzimas ligadas às membranas, enzimas e proteínas envolvidas na transdução de sinais, canais iônicos e expressão gênica (DeLUCIA et al., 2014). Além de seu mecanismo central, o etanol possui ações periféricas no sistema cardiovascular. A pressão arterial, o débito cardíaco e a força de contração do miocárdio não se alteram muito após ingestão moderada de etanol. Contudo, o uso crônico de álcool em doses excessivas (acima de 30 g/dia) pode acarretar aumento da incidência de distúrbios cardiovasculares não coronarianos, tais como cardiomiopatias, arritmias cardíacas e derrames hemorrágicos (DeLUCIA et al., 2014).

Dessa maneira, dados epidemiológicos e estudos pré-clínicos têm demonstrado que o consumo crônico de altas doses de etanol está associado ao desenvolvimento de hipertensão (KAPLAN, 1995; FATJÓ et al., 2005; RESSTEL et al., 2006; 2008). Entretanto, os mecanismos associados com a hipertensão induzida pelo consumo de etanol não estão totalmente elucidados. Alguns mecanismos têm sido propostos, como aumento na atividade do sistema nervoso autônomo simpático, alterações na atividade do barorreflexo, alterações na reatividade vascular a agentes vasodilatadores e vasoconstritores, além de modificações em mecanismos neuroquímicos no SNC (CHAN e SUTTER, 1982;

CHAN, WALL e SUTTER, 1985; STRICKLAND e WOOLLES, 1989; RESSTEL et al., 2006).

Como mencionado anteriormente, a prática de exercício físico é um fator associado com o consumo de etanol e, principalmente, com o uso abusivo de EAAs. Os relatos de que os usuários de EAAs e praticantes de exercício físicos fazem uso da substância pelos seus efeitos anabólicos e para sentir a sensação de bem-estar sugerem um efeito não somente nos tecidos periféricos mas também um efeito com ação central, o que explicaria o desenvolvimento da dependência aos EAAs (WOOD, 2002; 2004).

Dados da literatura indicam a presença de receptores nucleares de esteróides em regiões neurais do sistema mesocorticolímbico que estão relacionadas com o desenvolvimento da dependência, como a área tegmental ventral (VTA) e o núcleo accumbens (NAc) (WOOD e NEWMAN, 1995; LYNCH e STORY, 2000). Recentemente, evidenciou-se também a existência de receptores de membrana dos hormônios esteróides. Estes receptores permitem que esses hormônios iniciem respostas não genômicas rápidas, além de seus efeitos genômicos lentos (WATSON e GAMETCHU, 1999). As ações não genômicas dos hormônios esteróides resultam do recrutamento de vias de sinalização ligadas a receptores de membrana, tais como proteínas G e canais iônicos (WATSON e GAMETCHU, 1999). Dessa maneira, os EAAs podem modular receptores de membrana acoplados à proteína G através de uma variedade de ações celulares, tais como regulação da cascata PLC/DAG/IP3, mobilização de Ca²⁺ e ativação da proteína cinase C (PKC) (LE MELLAY, LASMOLES e LIEBERHERR, 1999;

ESTRADA et al., 2000; LE MELLAY, GROSSE, LIEBERHERR, 1997; KELLY et al., 1999). Apesar dos relatos da literatura, ainda são escassos e controversos os dados quanto ao real mecanismo de ação dos EAAs no SNC, sendo que alguns autores sugerem que os EAAs atuam no sistema dopaminérgico (KINDLUNDH, LINDBLOM e NYBERG, 2003; NGUYEN, YAO e PIKE, 2009) e outros que sua atuação ocorra no através do sistema opioidérgico (JOHANSON et al., 1997).

Apesar das evidências comportamentais e moleculares que os EAAs podem causar dependência e conseqüentemente alterar o consumo de outras drogas, o seu mecanismo de ação ainda é pouco definido e contraditório. Uma vez que seu uso ocorre concomitantemente com outros fatores e substâncias, tais como exercício físico, são necessários mais estudos que abrangem todos esses fatores na investigação dos efeitos do treinamento físico e administração de EAA.

Os efeitos da testosterona sobre o sistema cardiovascular ganharam atenção especial após a demonstração de que o músculo cardíaco, células endoteliais e a musculatura lisa em artérias expressam receptores androgênicos (McGILL et al., 1980; 1981). Um número crescente de estudos tem apontado que o uso crônico de altas doses de EAA está relacionado com diversas doenças cardiovasculares (BAGATELL e BREMNER, 1996; VAN AMSTERDAM et al., 2010). Grollman, Harrison e Williams (1940) foram os primeiros a relatar, em ratos, que o tratamento crônico com testosterona causa hipertensão. Outros estudos indicaram que os EAAs também desencadeiam toxicidade cardíaca, como remodelamento ventricular e isquemia do miocárdio (SULLIVAN et al., 1998; VAN AMSTERDAM et al., 2010). Apesar dos mecanismos relacionados com efeitos

tóxicos cardiovasculares induzidos pelo uso crônico de EAA ainda não estarem totalmente elucidados, Beutel et al. (2005) relataram que a administração crônica de estanozolol causou alterações na atividade do barorreflexo. No mesmo sentido, dados de nosso laboratório demonstraram que a administração repetida de testosterona causou alterações na atividade do barorreflexo de ratos adultos (ENGI et al., 2012).

Além disso, estudos realizados em animais e humanos têm apontado alterações na reatividade vascular a agentes vasoconstritores e vasodilatadores após exposição crônica aos EAAs. Dessa forma, foi relatado redução na resposta contrátil da noradrenalina, angiotensina II e serotonina em segmentos de aorta isoladas de coelhos tratados cronicamente com nandrolona (FERRER et al., 1994). Outro estudo demonstrou redução na resposta contrátil de um análogo do prostanoide tromboxano A₂ em segmentos de aorta de ratos tratados cronicamente com testosterona (MATSUDA et al., 1994). Um ensaio clínico não controlado mostrou redução na resposta vasodilatadora do trinitrato de glicerila, um doador de óxido nítrico, na artéria braquial de fisiculturistas com histórico de uso crônico de EAA (EBENBICHLER et al., 2001). Além disso, um estudo recente do nosso grupo realizado em ratos demonstrou que a administração repetida de testosterona aumentou a resposta de redução da pressão arterial decorrente da infusão endovenosa de um doador de óxido nítrico (ENGI et al., 2012). Deste modo, os dados apresentados acima sugerem que as patologias cardiovasculares associadas ao uso crônico de EAA podem decorrer de alterações na atividade do

barorreflexo e na reatividade vascular a agentes vasoconstritores e vasodilatadores.

Apesar de estudos clínicos indicarem maior incidência do uso de EAAs e consumo de etanol entre praticantes de atividade física, a revisão da literatura não resultou em artigos que investigassem uma possível interação entre exercício físico, consumo de etanol e EAA sobre a função cardiovascular. Em nossa busca na literatura também não foram encontradas informações acerca da influência do treinamento físico nas alterações cardiovasculares induzidas pelo uso combinado de EAA e etanol.

2. OBJETIVOS

Investigamos: 1) os efeitos da prática diária de exercício físico associada ao tratamento com testosterona no consumo intermitente livre de etanol; 2) as consequências da associação entre prática de exercício físico moderado de esteira, consumo crônico intermitente livre de etanol e tratamento crônico de testosterona sobre o sistema cardiovascular de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar que tinham 28 dias (DPN 28) no início dos experimentos. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP / Campus Botucatu (Botucatu-SP, Brasil) e foram mantidos em caixas-moradia plásticas com temperatura controlada

($24^{\circ} \pm 2^{\circ}$) no Biotério do Laboratório de Farmacologia - UNESP Araraquara. Os animais foram mantidos no regime de 12:12 horas no ciclo claro-escuro (luzes acessas entre 7h e 19h), com livre acesso a água e comida. As condições de manutenção e os procedimentos experimentais foram realizados conforme os protocolos aprovados pelo Comitê Ética em Uso Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP (CEUA/FCF/Car - 41/2012), que esta de acordo com as Normas Brasileiras e Internacionais para uso e bem estar animal.

3.2. Drogas

- Álcool etílico (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) - diluído em água conforme a concentração ideal para cada etapa do experimento.

- Propionato de testosterona (Portaria 344/98) (Pharma Nostra, Avik Pharmaceutical Limited, Índia) na dose de 10 mg/Kg, dissolvido em óleo de amêndoas bruto.

- Tribromoetanol (Sigma-Aldrich) dissolvido em salina (0.9% NaCl).

- Megluminato de flunixinina (Banamine®, Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil) usado conforme recomendações do fabricante.

- Preparação poli-antibiótico (Pentabiotico®, Fort-Dogde, Brasil) usado conforme recomendações do fabricante.

- Cloridrato de fenilefrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dissolvido em salina (0.9% NaCl).

- Nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich), dissolvido em salina (0.9% NaCl).

- Acetilcolina (Sigma-Aldrich), dissolvido em salina (0.9% NaCl).

3.3. Acesso Intermitente a Duas Garrafas

Para o consumo voluntário de etanol foi utilizado o protocolo de Acesso Intermitente a Duas Garrafas (SIMMS et al., 2008). Os ratos foram individualmente alocados em caixas plásticas e tiveram livre acesso a duas garrafas, com 150 mL em cada - uma contendo etanol e outra com água. Durante a primeira semana (período de adaptação), os animais tiveram acesso contínuo às duas garrafas e a concentração de etanol foi aumentada gradativamente a cada 24 horas (as concentrações usadas foram 2%, 4%, 8%, 12%, 16%, 20%). Após esse período de adaptação, duas garrafas (uma com água e outra com etanol 20%) foram oferecidas três vezes na semana (às segundas, quartas e sextas-feiras), durante 6 semanas.

A quantidade de etanol consumido foi calculada através da pesagem das garrafas antes e após serem oferecidas aos animais. Os valores foram normalizados pelo peso corporal de cada animal e são apresentados como g/Kg/24h. Foram realizadas medidas de controle de perdas com a utilização de duas garrafas (uma contendo água e outra etanol) em uma caixa vazia. As análises foram feitas a partir da estabilização do consumo de etanol, assim sendo, as três primeiras sessões (1ª semana) do acesso intermitente ao etanol foram descartadas das análises apresentadas nos resultados. Os animais tiveram livre acesso à água e comida durante todo o procedimento experimental.

3.4. Exercício Físico Moderado de Esteira

Todos os animais foram adaptados à esteira de corrida para ratos (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil) durante uma semana. Durante o período de adaptação, os animais correram diariamente na esteira com uma velocidade de 0.3 Km/h durante 10 minutos. Não foi utilizada estimulação elétrica para excitar os animais a correr.

Após o período de adaptação, os animais realizaram, individualmente, o teste de esforço físico (TEF) - que consiste em corrida na esteira com incremento de 0.3 Km/h a cada 3 minutos, até a exaustão (momento em que os animais pararam de correr). Após o TEF 1, os animais foram aleatoriamente alocados nos grupos sedentário ou treinado (garantindo que ambos os grupos de animais possuíam a mesma capacidade física antes do início do treinamento moderado de esteira). O grupo treinado foi submetido ao treinamento de exercício físico de esteira com capacidade moderada (que consiste na velocidade de 50-60% da capacidade física máxima de exercício, considerando a média de todo o grupo) - a velocidade e duração do treinamento foi aumentada gradativamente a partir da primeira semana de treino chegando à 1h/dia, 5 dias na semana. Todo o treinamento durou 6 semanas.

O grupo sedentário foi submetido uma vez na semana a um curto período de exercício na esteira de treinamento (0.5 Km/h por 10 minutos), para mantê-los familiarizados com a esteira e os procedimentos experimentais a fim de evitar possíveis alterações em experimentos futuros.

Foram repetidos outros dois TEF ao longo das 6 semanas de treinamento: TEF 2 após um mês (4 semanas) do TEF 1, e TEF 3 ao final do protocolo de treinamento (6 semanas) - esses testes têm como objetivo ajustar a intensidade de treinamento e avaliar a eficácia do protocolo de treinamento utilizado.

Nosso protocolo de treinamento aeróbico foi adaptado de Negrão et al. (1992) e Dufloth, Morris e Michelini (1997).

3.5. Tratamento com Testosterona

Após 72 horas da realização do TEF 2, foi iniciado o tratamento com testosterona, que consistiu em injeções subcutâneas diárias de testosterona (10 mg/Kg) durante 10 dias consecutivos. Logo após as injeções, os animais eram submetidos ao exercício de esteira.

O tratamento com testosterona (10 mg/Kg) foi realizado diariamente por 10 dias consecutivos. As doses utilizadas e o regime de tratamento foram baseados em estudos prévios de nosso laboratório (ENGI et al., 2012; CRUZ et al., 2013; ENGI et al., 2014).

3.6. Canulação da Artéria e Veia Femorais

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg, i.p.) e submetidos à cirurgia, que consistiu na inserção de um cateter na aorta abdominal através da artéria femoral - a fim de realizar registros cardiovasculares. Um segundo cateter foi implantado na veia femoral para a infusão de drogas. Ambos os cateteres foram implantados embaixo da pele dos animais e exteriorizados em

seus dorsos. Os cateteres foram preenchidos com uma solução de heparina (50 UI/ml, Hepamax-S®, Blasiegel, Cotia, SP, Brasil) diluída em salina (0.9% NaCl).

Após a cirurgia, os ratos receberam injeções de uma formulação poli-antibiótica com estreptomicina e penicilina (560 mg/ml/Kg, i.m.) para prevenir infecção. Também receberam o antiinflamatório não-esteroidal megluminato de flunixinina (0.5 mg/ml/Kg, s.c.) para analgesia pós-operatória.

3.7. Registro dos Parâmetros Cardiovasculares

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., Midvale, UT, USA). A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada usando um amplificador (Quad Bridge Amp., ML224, ADInstruments, NSW, Austrália) e conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML866/P, ADInstruments, NSW, Austrália). O programa utilizado foi Lab Chart PRO (ADInstruments).

Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD), bem como a frequência cardíaca (FC), foram obtidos a partir dos sinais da PAP.

3.8. Infusão de Agentes Vasoativos

A infusão intravenosa de fenilefrina (70 µg/ml, 0.4 ml/min/Kg), nitroprussiato de sódio (100 µg/ml, 0.8 ml/min/Kg) e acetilcolina (10 µg/ml, 1.2 ml/min/Kg) foi feita usando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, Holliston, MA, USA).

As alterações na PAM causadas pela infusão crescente das concentrações desses agentes vasoativos foram utilizadas para gerar curvas dose-resposta

(RESSTEL et al., 2006; CRESTANI et al., 2011; ENGI et al., 2012; CRESTANI et al., 2014). As curvas doses-resposta foram geradas para cada agente vasoativo usando valores de PAM correspondente ao tempo de registro cumulativo após o início da infusão. Curvas de regressão não lineares foram utilizadas para análise das variações da PAM. A avaliação das curvas foi realizada com base em dois parâmetros: 1- resposta máxima da PAM (E_{max}); 2- ED_{50} , dose que promove 50% da resposta máxima (RESSTEL et al., 2006; CRESTANI et al., 2011).

A infusão de fenilefrina causa efeitos crescentes na PAM enquanto nitroprussiato e acetilcolina causam efeitos depressores na PAM.

3.9. Curvas Doses-Resposta da PAM

As mudanças graduais na PAM causadas pela infusão intravenosa de fenilefrina, nitroprussiato de sódio e acetilcolina foram traçados de maneira a gerar curvas doses-resposta, conforme literatura (ENGI et al., 2012; CRESTANI et al., 2014).

As curvas doses-resposta foram geradas para cada agente vasoativo através do cálculo da quantidade de droga infundida e da mudança de PAM a cada 2 segundos após o começo da infusão. O efeito máximo (E_{max}) e a dose que promove 50% da resposta máxima (ED_{50}), de cada agente vasoativo, foram comparados em todos os grupos.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a análise dos efeitos tóxicos cardiovasculares causados pela interação entre exercício físico, consumo de etanol e EAAs, os animais foram aleatoriamente alocados em 4 grupos experimentais, após a realização do TEF 1:

GRUPO 1 - SEDENTÁRIO + ÁGUA (n=17)

GRUPO 2 - SEDENTÁRIO + ETOH 20% (n=18)

GRUPO 3 - TREINADO + ÁGUA (n=18)

GRUPO 4 - TREINADO + ETOH 20% (n=18)

O treinamento moderado de esteira e o acesso ao etanol começaram no mesmo dia e ambos foram realizados durante 6 semanas.

Durante a primeira semana, os animais tiveram acesso contínuo a duas garrafas, uma contendo água e outra contendo etanol - a concentração de etanol foi progressivamente aumentada a cada 24 horas (conforme item 3.3) até chegar na concentração de 20% (no 6º dia) e manteve-se constante até o último dia de experimento. Após a primeira semana, os animais tiveram acesso durante 24 horas às garrafas de etanol três vezes na semana (às segundas, quartas e sextas-feiras).

O padrão de grupos, como relatado acima, manteve-se durante 4 semanas, período em que os animais foram submetidos ao protocolo de acesso intermitente a duas garrafas e ao treinamento moderado de esteira (conforme itens 3.3 e 3.4, respectivamente).

Ao final da 4ª semana de experimento os animais realizaram TEF 2.

No começo da quinta semana, ou seja, começo do tratamento com testosterona, os animais foram subdivididos em outros 4 grupos:

GRUPO 1 - SEDENTÁRIO + ÁGUA + VEÍCULO (n=8)

GRUPO 2 - SEDENTARIO + ÁGUA + TESTOSTERONA (n=9)

GRUPO 3 - SEDENTÁRIO + ETOH 20% + VEÍCULO (n=10)

GRUPO 4 - SEDENTÁRIO + ETOH 20% + TESTOSTERONA (n=8)

GRUPO 5 - TREINADO + ÁGUA + VEÍCULO (n=9)

GRUPO 6 - TREINADO + ÁGUA + TESTOSTERONA (n=9)

GRUPO 7 - TREINADO + ETOH 20% + VEÍCULO (n=9)

GRUPO 8 - TREINADO + ETOH 20% + TESTOSTERONA (n=9)

Esse padrão de grupos manteve-se nas duas últimas semanas de experimento, em que os animais foram submetidos ao tratamento diário de testosterona durante 10 dias, concomitantemente ao acesso de etanol e treinamento físico.

Após 24 horas do último acesso ao etanol e treinamento físico de esteira, os animais realizaram o TEF 3 e imediatamente foram submetidos à cirurgia da artéria e veia femorais. Os experimentos dos parâmetros cardiovasculares foram realizados no dia seguinte à cirurgia.

No dia dos testes dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram transferidos, em suas respectivas caixas-moradia, para a sala de experimentos - onde permaneceram durante 60 minutos a fim de habituarem-se às condições da sala antes do começo dos experimentos. Na seqüência, os cateteres dos animais foram conectados aos aparelhos de registros cardiovasculares e permaneceram

durante 30 minutos para registro dos parâmetros cardiovasculares basais. Após esse período, os animais receberam infusões intravenosas aleatórias dos agentes vasoativos fenilefrina, nitroprussiato de sódio e acetilcolina.

Uma representação esquemática do protocolo completo desse experimento encontra-se abaixo (**Figura 1**).

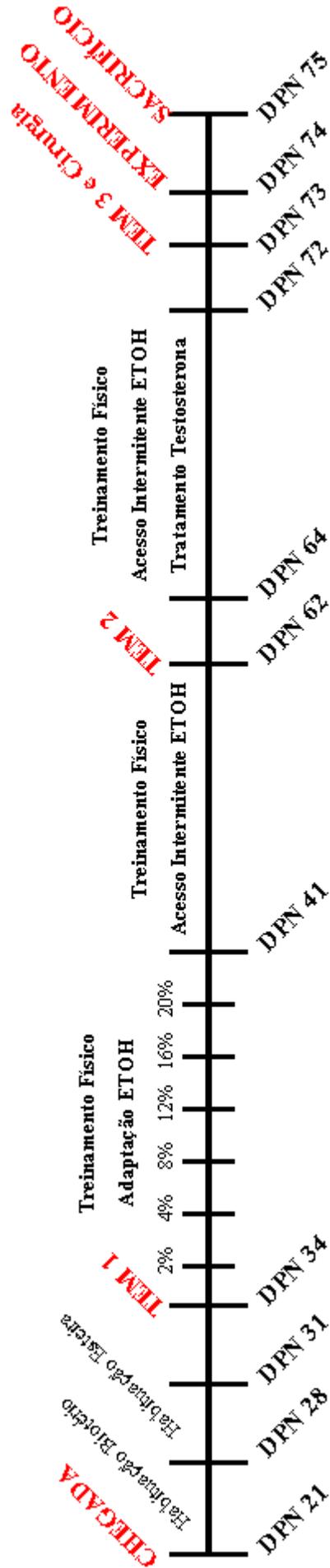


Figura 1 - Representação esquemática do protocolo completo de experimento. **DPN** = Dia Pós Natal. **TEM** = Teste de Esforço Máximo.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do TEM foram analisados por ANOVA três fatores com medidas repetidas, considerando os fatores: 1) **Treino**: sedentário X treinado; 2) **Consumo**: água X etanol; 3) **Tratamento**: veículo X testosterona e **Medida Repetida**: TEM. Nos casos em que ANOVA mostrou diferenças significativas ($p < 0.05$) os resultados foram analisados pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Para a análise do consumo intermitente de etanol antes do tratamento com testosterona, foi utilizada ANOVA dois fatores com medidas repetidas, considerando os fatores 1) **Treino**: sedentário X treinado; 2) **Consumo**: água X etanol e **Medida Repetida**: exposições. Para a análise do consumo intermitente de etanol durante o tratamento com testosterona, foi utilizada ANOVA três fatores com medidas repetidas, considerando os fatores 1) **Treino**: sedentário X treinado; 2) **Consumo**: água X etanol; 3) **Tratamento**: veículo X testosterona e **Medida Repetida**: exposições. Nos casos em que ANOVA mostrou diferenças significativas ($p < 0.05$) os resultados foram analisados pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Para todas as análises das funções cardiovasculares foi utilizada ANOVA dois fatores, considerando os fatores 1) **Treino**: sedentário X treinado; 2) **Tratamento**: água ou etanol X veículo ou testosterona. Nos casos em que ANOVA mostrou diferenças significativas ($p < 0.05$) os resultados foram analisados pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

6. RESULTADOS

6.1. Treinamento moderado de corrida em esteira melhora desempenho físico no TEF independente do consumo de etanol e tratamento com testosterona

A análise da performance no TEF indicou diferenças significativas para o fator treinamento ($F_{(1,63)}=34,71$, $p<0,05$), sem influência do consumo de etanol ($F_{(1,63)}=0,004$, $p>0,05$) e tratamento com testosterona ($F_{(1,63)}=0,53$, $p>0,05$) e TEF ($F_{(2,126)}=0,18$, $p>0,05$). A análise indicou interação entre os fatores treinamento e TEF ($F_{(2,126)}=8,02$, $p<0,05$), contudo não foi observada interação nem entre treinamento e consumo de etanol ($F_{(1,63)}=1,09$, $p>0,05$), nem entre treinamento e tratamento com testosterona ($F_{(1,63)}=0,14$, $p>0,05$). Também não foi observada interação entre tratamento com testosterona e consumo de etanol ($F_{(1,63)}=0,004$, $p>0,05$).

O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou diferenças significativas entre todos os TEF (TEF 1, TEF 2 e TEF 3) dos animais treinados quando comparados com seus respectivos grupos sedentários (**Figura 2**).

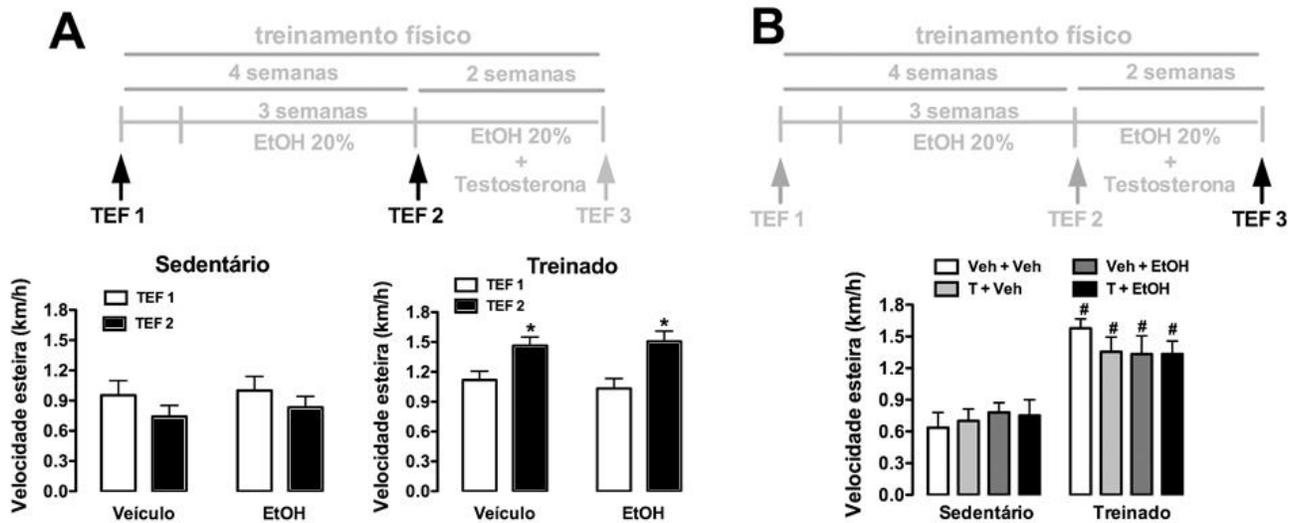


Figura 2. Treinamento moderado de corrida em esteira melhora desempenho físico no TEF independente do consumo de etanol e tratamento com testosterona. **(A)** Performance no TEF antes do começo do tratamento com testosterona. As barras representam a média \pm EPM. ANOVA três fatores acompanhada do teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou diferenças significativas para o fator treinamento. * $p < 0.05$: comparado com TEF 1. **(B)** Performance no TEF após o tratamento com testosterona. As barras representam a média \pm EPM. ANOVA três fatores acompanhada do teste *post-hoc* de Newman Keuls demonstrou haver interação entre treinamento e TEF. # $p < 0.05$: comparado com o respectivo grupo sedentário.

6.2. Efeito do exercício físico moderado de esteira e/ou tratamento com testosterona no consumo de etanol

A análise do consumo de etanol, antes do tratamento com testosterona, indicou não haver diferenças significativas para o fator treinamento ($F_{(1,33)}=0,01$, $p>0,05$), contudo foi observado efeito do tempo de exposições ($F_{(5,165)}=18,94$, $p<0,05$). Também não foi observada interação entre os fatores treinamento e exposições ($F_{(5,165)}=0,31$, $p>0,05$).

A análise do consumo de etanol durante o tratamento com testosterona indicou haver um efeito significativo para o fator exposições ($F_{(4,124)}=7,89$, $p<0,05$), sem no entanto indicar efeito para os fatores treinamento ($F_{(1,31)}=1,01$, $p>0,05$) e tratamento ($F_{(1,31)}=0,96$, $p>0,05$). Também não foram observadas interações entre nenhum dos fatores: treinamento X tratamento ($F_{(1,31)}=0,27$, $p>0,05$), treinamento X exposições ($F_{(4,124)}=0,60$, $p>0,05$), tratamento X exposições ($F_{(4,124)}=1,94$, $p>0,05$), treinamento X tratamento X exposições ($F_{(4,124)}=0,38$, $p>0,05$) (**Figura 3**).

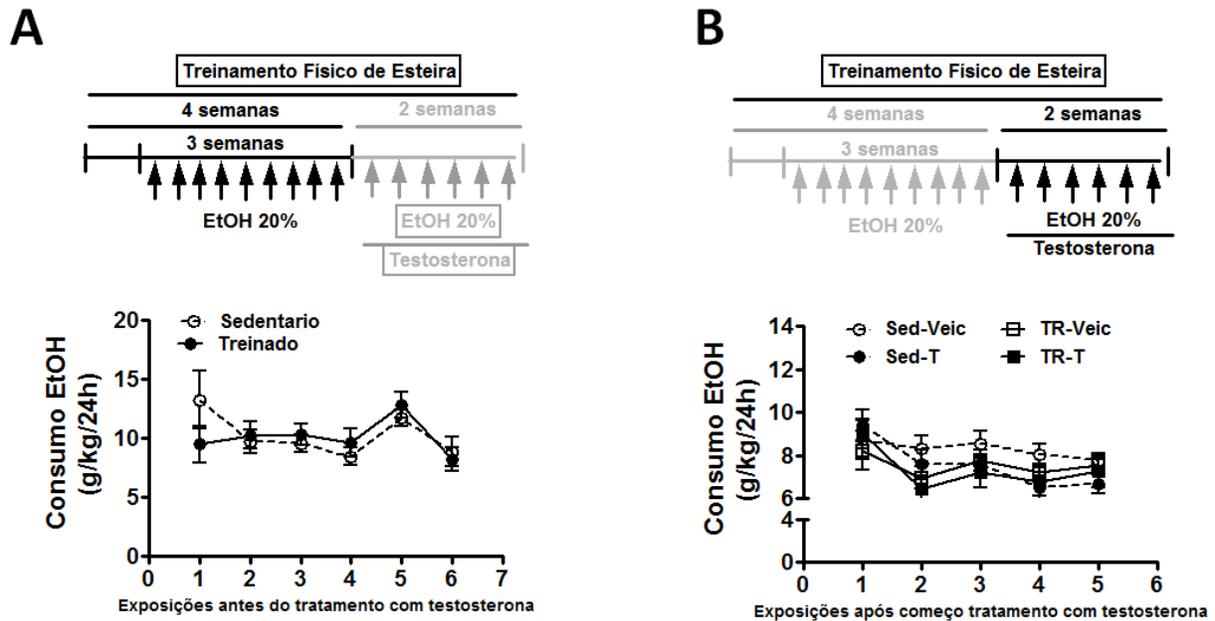


Figura 3. Efeito do exercício físico moderado de esteira e/ou tratamento com testosterona no consumo de etanol. **(A)** Consumo de etanol de animais sedentários e treinados antes do começo do tratamento com testosterona. Os círculos representam a média \pm EPM. ANOVA dois fatores acompanhada do teste *post-hoc* de Newman Keuls não indicou diferenças significativas no consumo de etanol de animais treinados ($n=18$ /grupo). **(B)** Consumo de etanol de animais sedentários e treinados durante o tratamento com testosterona. Os círculos representam a média \pm EPM. ANOVA três fatores acompanhada do teste *post-hoc* de Newman Keuls não indicou diferenças significativas no consumo de etanol de animais treinado tratados com testosterona ($n=8-10$ /grupo).

6.3. Efeito da associação da prática de treinamento moderado de esteira, do consumo de etanol e do tratamento crônico de testosterona na Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Frequência Cardíaca (FC)

As análises de PAM, PAS e PAD não demonstraram efeito nem do treinamento físico (**PAM**: $F_{(1,59)}=2$, $p>0,05$; **PAS**: $F_{(1,59)}=3$, $p>0,05$; **PAD**: $F_{(1,59)}=0,8$, $p>0,05$) e nem dos tratamentos (consumo de água ou etanol e veículo ou testosterona) (**PAM**: $F_{(3,59)}=1$, $p>0,05$; **PAS**: $F_{(3,59)}=2$, $p>0,05$; **PAD**: $F_{(3,59)}=1$, $p>0,05$). Contudo, a análise da FC indicou efeito do tratamento ($F_{(3,59)}=8$, $p<0,05$) sem nenhuma influência do treinamento físico ($F_{(1,59)}=0,01$, $p>0,05$). Também não foi observada interação entre treinamento físico e os tratamentos (consumo de água ou etanol e veículo ou testosterona) ($F_{(7,59)}=0,6$, $p>0,05$).

O teste *post-hoc* de Bonferroni revelou que o tratamento com testosterona causou redução da FC em animais sedentários quando comparado com o grupo controle (veículo + água) (**Figura 4**).

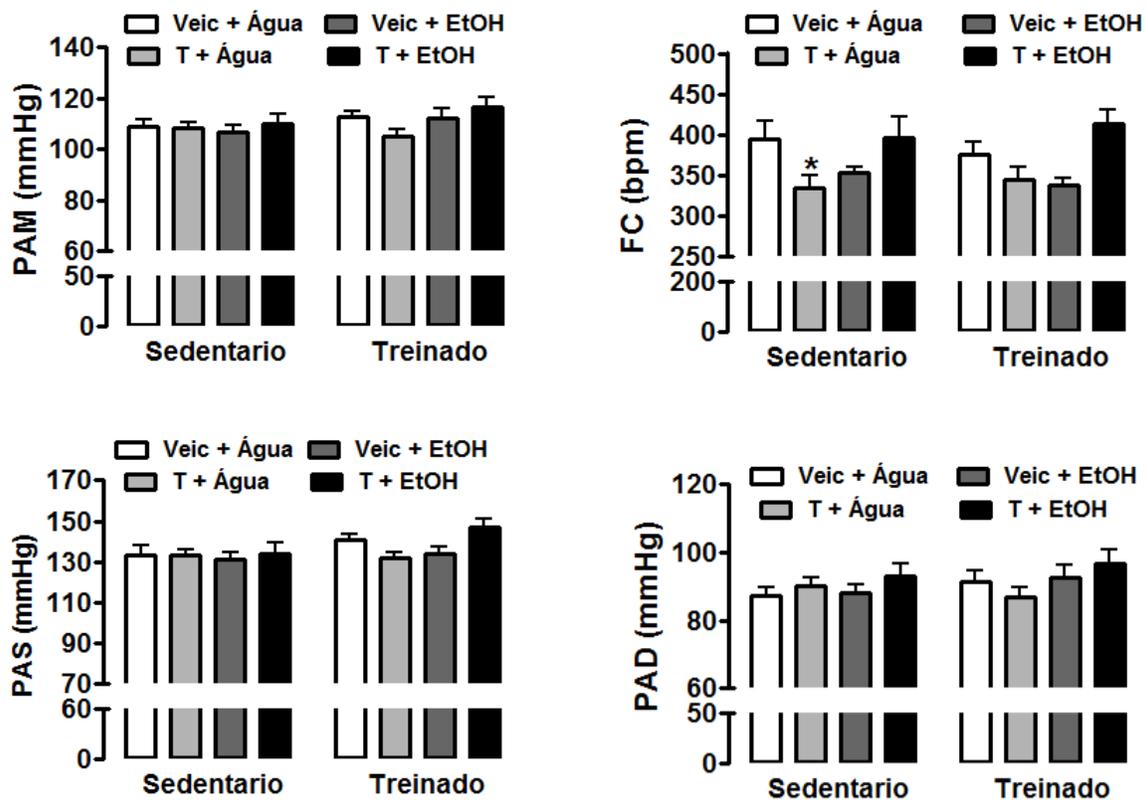


Figura 4. Efeito do exercício físico moderado de esteira e/ou tratamento com testosterona na **PAM e FC**. Pressão arterial média (PAM, esquerda acima), frequência arterial (FC, direita acima), pressão arterial sistólica (PAS, esquerda abaixo) e pressão arterial diástolica (PAD, direita abaixo) em animais sedentários e treinados tratados com veículo ou testosterona e que tiveram acesso livre intermitente a etanol (EtOH) 20%. As barras representam a média \pm EPM. ANOVA dois fatores acompanhada do teste *post-hoc* de Bonferroni demonstrou diferenças significativas para o tratamento crônico de testosterona na FC. * $p < 0.05$: comparado com o respectivo grupo controle (veículo + água).

6.4. Efeito do exercício físico moderado de esteira e/ou tratamento com testosterona nas alterações de PAM causadas por agentes vasoativos

Os resultados da reatividade vascular aos agentes vasoativos são apresentadas na **Figura 5** e na **Tabela 1**.

Fenilefrina

A infusão intravenosa do agonista α_1 -adrenoceptor fenilefrina aumentou a pressão arterial dose-dependentemente em todos os grupos experimentais. A análise da E_{max} das curvas de dose-resposta demonstrou diferenças significativas para o fator tratamento ($F_{(3,59)}=6$, $p<0,05$) mas não para o fator treinamento ($F_{(1,59)}=0,5$, $p>0,05$). Também não foi observada interação entre os fatores ($F_{(7,59)}=2$, $p>0,05$). A comparação dos valores da ED_{50} indicou diferenças significativas para para o fator tratamento ($F_{(3,59)}=45$, $p<0,05$) e interação entre os fatores treinamento físico e tratamento ($F_{(7,59)}=5$, $p<0,05$). Contudo ANOVA não demonstrou diferenças para o fator treinamento físico ($F_{(1,59)}=2$, $p>0,05$).

O teste *post-hoc* de Bonferroni revelou que o tratamento combinado de etanol com testosterona reduziu a E_{max} e aumentou a ED_{50} nos animais sedentários. O efeito na E_{max} mas não na ED_{50} foram revertidos pelo exercício físico. Além disso, o tratamento com testosterona ou etanol reduziu a ED_{50} nos animais treinados.

Acetilcolina

A infusão intravenosa de acetilcolina reduziu a pressão arterial dose-dependentemente em todos os grupos. A comparação da E_{max} indicou efeito do fator tratamento ($F_{(3,59)}=10$, $p<0,05$), sem influência do exercício físico ($F_{(1,59)}=0,01$,

$p > 0,05$). Também não foi observada interação entre os fatores ($F_{(7,59)}=1$, $p > 0,05$). A análise da ED_{50} demonstrou efeito significativo do fator treinamento físico ($F_{(1,59)}=6$, $p < 0,05$) e do fator tratamento ($F_{(3,59)}=5$, $p < 0,05$). Contudo, não foi observada interação entre os fatores ($F_{(7,59)}=0,2$, $p > 0,05$).

O teste post-hoc revelou que tanto o tratamento com testosterona quanto com etanol aumentou a E_{max} nos animais sedentários, enquanto nos animais treinados apenas o etanol aumentou esse parâmetro.

Nitroprussiato de Sódio

A infusão sistêmica do doador de óxido nítrico NPS reduziu a pressão arterial de maneira dose-dependente em todos os grupos. A análise da E_{max} das curvas dose-resposta indicaram haver interação entre treinamento físico e tratamento ($F_{(7,59)}=3$, $p < 0,05$), sem no entanto haver influência do treinamento físico ($F_{(1,59)}=0,8$, $p > 0,05$) e do tratamento com água X etanol e veículo X testosterona ($F_{(3,59)}=2$, $p > 0,05$). A comparação dos valores da ED_{50} não indicou efeito significativo nem para o fator treinamento físico ($F_{(1,59)}=0,01$, $p > 0,05$) e nem para o fator tratamento ($F_{(3,59)}=0,6$, $p > 0,05$).

A análise *post-hoc* de Bonferroni revelou que o consumo de etanol aumentou a E_{max} nos animais treinados.

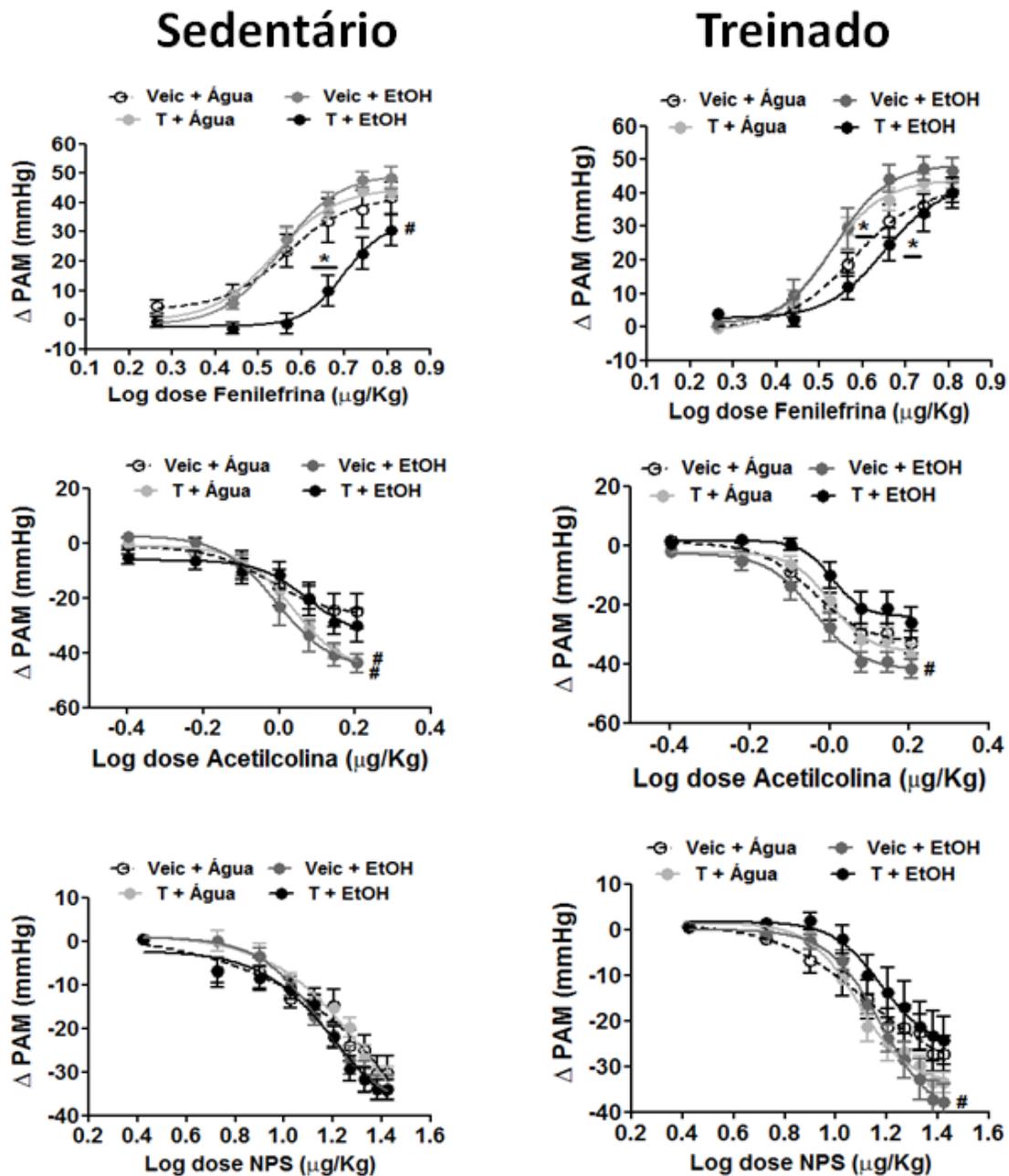


Figura 5. Efeito do exercício físico moderado de esteira e/ou tratamento com testosterona nas alterações de PAM causadas por agentes vasoativos. Variação da pressão arterial média (Δ PAM) causada pela infusão crescente de fenilefrina (acima), acetilcolina (ao meio) e nitroprussiato (NPS, abaixo) em animais sedentários e treinados tratados com veículo ou testosterona e que tiveram acesso livre intermitente a etanol (EtOH) 20%. Os círculos representam

a média \pm EPM. A análise de regressão não linear demonstrou haver diferenças significativas da infusão de fenilefrina na E_{max} e ED₅₀, considerando o fator tratamento. A análise de regressão não linear demonstrou haver diferenças significativas da infusão de acetilcolina na E_{max} considerando o fator tratamento e ED₅₀ considerando os fatores treinamento e tratamento (n=8-10/gupo). Já a análise de regressão não linear demonstrou haver interação significativa da infusão de NPS na E_{max}. ***p<0.05**: comparado com o respectivo grupo controle (veículo + água) para ED₅₀. #**p<0.05**: comparado com o respectivo grupo controle (veículo + água) para E_{max}.

Tabela 1. Efeito máximo (E_{max}) e dose que promove 50% da resposta máxima da PAM (ED_{50}) nas curvas dose-resposta para fenilefrina (fenil), acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS) em animais sedentários e treinados tratados com veículo ou testosterona e que tiveram acesso livre intermitente a etanol (EtOH) 20%.

Grupo	Fenil		Ach		NPS	
	ED_{50}	E_{max}	ED_{50}	E_{max}	ED_{50}	E_{max}
Sedentário						
Veic + Água	0.54±0.02	42±5	-0.03±0.04	-24±5	1.10±0.05	-31±4
T + Água	0.53±0.007	43±2	0.02±0.005	-42±2*	1.17±0.02	-31±2
Veic + EtOH	0.54±0.008	49±3	-0.01±0.01	-43±3*	1.12±0.02	-33±2
T + EtOH	0.70±0.01*	29±4*	0.03±0.02	-30±5	1.11±0.01	-35±2
Treinado						
Veic + Água	0.57±0.01	40±3	-0.04±0.01	-32±3	1.10±0.04	-28±3
T + Água	0.52±0.007*	44±2	-0.01±0.01	-38±3	1.09±0.01	-33±2
Veic + EtOH	0.53±0.01*	46±3	-0.05±0.01	-43±3*	1.15±0.02	-38±3*
T + EtOH	0.62±0.01*#	40±4	0.005±0.01	-27±3	1.15±0.02	-24±4

Valores expressos em média ± EPM. * $p < 0.05$: comparado com o respectivo grupo controle (veículo + água). # $p < 0.05$: comparado com o respectivo grupo sedentário. ANOVA dois fatores acompanhada do teste *post-hoc* de Bonferroni.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo investigamos a associação entre exercício físico, consumo de etanol e tratamento com testosterona sobre a função cardiovascular de ratos adultos. Nossos principais resultados foram: 1) exercício físico melhora a performance de corrida em esteira, independente do consumo de etanol e tratamento com testosterona; 2) o consumo voluntário de etanol não foi afetado nem pelo treinamento físico e nem pelo tratamento com testosterona; 3) consumo voluntário intermitente de etanol e prática de corrida em esteira não afetaram os parâmetros basais de PAM e FC, enquanto o tratamento com testosterona causou bradicardia de repouso; 4) consumo de etanol e tratamento com testosterona alteraram a reatividade vascular a agentes vasoativos, que também foi influenciada pelo treinamento físico. Esses resultados mostram a primeira evidência do efeito do consumo voluntário de etanol combinado com o tratamento de testosterona nas funções cardiovasculares de ratos treinados.

Os resultados do presente estudo confirmam observações anteriores, inclusive de nosso laboratório, demonstrando melhora na capacidade física devido ao treinamento moderado de esteira (MASSON et al., 2014; SANCHES et al., 2015). Esses resultados podem ser confirmados através do aumento do desempenho nos testes de esforço físico realizados ao longo do protocolo experimental, demonstrando que o protocolo de treinamento aeróbico moderado utilizado foi eficaz. Também foi observado que o consumo de etanol não afetou a atividade de corrida nos nossos animais, corroborando resultados obtidos anteriormente em roedores (EHRINGER, HOFT, ZUNHAMMER, 2009;

DARLINGTON et al., 2014) e em humanos (HARTUNG et al., 1990). E ao contrário do esperado, o tratamento crônico com testosterona também não afetou a atividade de corrida de esteira em nossos experimentos, contradizendo outros estudos que demonstraram que o tratamento com testosterona aumentou a corrida em roda de atividade de hamsters e ratos (WOOD, 2002; MCGINNIS et al., 2007).

Diferente do esperado, nossos resultados demonstraram que o consumo voluntário de etanol não foi modificado pelo treinamento físico. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios da literatura que indicam que a prática de exercícios não altera o consumo de etanol (GARY e GUTHRIE, 1972; OZBURN, HARRIS e BLEDOV, 2008; EHRINGER, HOFT e ZUNHAMMER, 2009). Contudo, os estudos a respeito dos efeitos protetores do exercício no consumo de etanol ainda são controversos - enquanto alguns autores relatam diminuição do uso e consumo de etanol em animais treinados em modelos de corrida (MCMILLAN, MCCLURE e HARDWICK, 1995; EHRINGER et al., 2009; LEASURE e NIXON, 2010; FONTES-RIBEIRO et al., 2011; BRAGER e HAMMER, 2012), outros relatam uma relação positiva entre atividade física e aumento do uso e consumo de etanol (JOHANSSON et al., 2000; WERME et al., 2002, FRENCH et al., 2009).

O consumo de etanol também não foi modificado pelo tratamento isolado com testosterona ou pela administração de testosterona associada à prática do exercício físico, o que contradiz estudos prévios que demonstraram que o tratamento com outros tipos de anabolizantes pode aumentar (JOHANSSON et al.,

2000) ou diminuir (GURKOVSKAYA et al., 2009) o consumo de etanol. Estes autores investigaram o consumo de etanol após uma injeção aguda de dehidroepiandrosterona (GURKOVSKAYA et al., 2009) ou algumas semanas após o término do tratamento crônico com decanoato de nandrolona (JOHANSSON et al., 2000). Demonstrando que ainda são necessários mais estudos para o completo entendimento da relação entre prática de exercício físico e tratamento com testosterona no consumo de etanol de livre escolha.

Nossos resultados a respeito dos efeitos cardiovasculares demonstraram que o tratamento crônico com testosterona causou bradicardia de repouso nos animais sedentários. Esses resultados corroboram outros estudos, inclusive de nosso laboratório (CRUZ et al., 2012; ENGI et al., 2012). Contudo, os mecanismos para tal efeito ainda não estão bem esclarecidos. O que sabemos até o momento é que os esteróides podem atravessar a barreira hematoencefálica e atuar em receptores andrógenos em regiões centrais, tais como VTA, NAc e BNST (WOOD e NEWMAN, 1995; SATO et al., 2008), o que poderia explicar possíveis neuroplasticidades em regiões importantes de modulação cardiovascular. Esse resultado também poderia ser explicado através da diminuição da função cardíaca pela perda de células cardíacas e formação de fibrose, como observado em um estudo anterior de nosso laboratório (ENGI et al., 2014).

O tratamento com EAA tem sido relacionado com aumento na atividade simpática (KUMAI et al., 1994). Contudo, a bradicardia de repouso causada pelo tratamento com EAA pode provavelmente ser mediada por um aumento do tônus parassimpático cardíaco, em vez de uma redução na atividade simpática. É

interessante notar que o consumo de etanol inibiu a bradicardia de repouso causada pela testosterona, o que pode ser relacionado à excitação simpática cardíaca causada pelo consumo de etanol (SPARROW, ROGGENDORF, VOGEL, 1987; ZHANG, ABDEL-RAHMAN, WOOLLES, 1988). Da mesma maneira, o treinamento físico de esteira aboliu a bradicardia de repouso causada pelo tratamento com testosterona, o que está de acordo com um relato recente da literatura demonstrando que os prejuízos nas funções cardíacas causadas pelo tratamento com EAA, foram completamente revertidos pelo treinamento de esteira (BOCALINI et al., 2014).

A combinação do tratamento com testosterona e o consumo de etanol reduziu a resposta pressora à fenilefrina nos animais sedentários. A hiperreatividade vascular a agentes vasoconstritores tem sido associada ao desenvolvimento de hipertensão (CHANG et al., 2002). Dessa maneira, a redução na resposta aos agentes vasoconstritores pode ser um mecanismo importante para amenizar aumentos na pressão arterial.

Nossos resultados da facilitação à resposta depressora aos agentes vasodilatadores, após o tratamento com testosterona ou etanol, são similares aos observados em outros estudos (RESSTEL et al., 2006; ENGI et al., 2012; CRESTANI et al., 2014). Evidências de que a testosterona age diretamente na musculatura vascular, causando relaxamento da musculatura lisa podem explicar nossos resultados (PERUSQUIA e STALLONE, 2010). O consumo prolongado de etanol é relacionado com a inibição da atividade da acetilcolinesterase, o que aumenta a concentração de acetilcolina e conseqüentemente poderia aumentar a

resposta depressora à acetilcolina nos animais que consumiram etanol (HABOUBI e THURNHAM, 1986; HUSAIN e SOMANI, 1998).

O treinamento físico inibiu a redução da resposta pressora à fenilefrina após o tratamento combinado com testosterona e etanol, assim como facilitou a resposta depressora à acetilcolina nos animais tratados com etanol. Esses resultados contradizem os efeitos bem documentados do exercício físico no aumento da disponibilidade vascular do óxido nítrico e a redução da reatividade vascular aos agonistas dos receptores α -adrenérgicos (MCALLISTER, JASPERSE, LAUGHLIN, 2005).

Um possível mecanismo envolvido no efeito protetor do exercício físico na reatividade das alterações vasculares pode ser a influência do exercício na farmacocinética da testosterona e do etanol, o que pode afetar as concentrações circulantes dessas substâncias. Dessa maneira, o treinamento físico de corrida em esteira pode aumentar a eliminação do etanol (ARDIES et al., 1989) e causar diminuição nos níveis de testosterona após uma sessão aguda de exercício (CADOUX-HUDSON, FEW, IMMS, 1985). O impacto do exercício físico nos níveis de testosterona é ainda pouco entendido, mas McAllister et al. (2005) observou baixas concentrações de testosterona em indivíduos corredores quando comparados com sedentários.

A resposta vasoconstritora à fenilefrina é contrabalanceada pelos receptores β_2 -adrenérgicos (DAVEL et al., 2012). Assim, a redução na resposta vasodilatadora dos receptores β -adrenérgicos pode também ser a causa do efeito do exercício físico em inibir a influência do tratamento combinado com

testosterona e etanol nas respostas à fenilefrina. Esse mecanismo pode também ser responsável pela facilitação da capacidade de resposta vascular à fenilefrina observada nos animais treinados e tratados com testosterona ou etanol.

A facilitação da resposta depressora ao NPS em ratos treinados e tratados com etanol está de acordo com evidências da literatura que relatam que o treinamento físico aumenta a sensibilidade vascular da musculatura lisa ao óxido nítrico (MCALLISTER, JASPERSE, LAUGHLIN, 2005).

Resumidamente, apesar do tratamento combinado com testosterona e etanol não ter afetado a PAM e FC basais, mudanças importantes nas funções cardiovasculares foram observadas, tal como redução nas respostas pressoras à fenilefrina. A redução na reatividade vascular aos agentes vasoconstritores poderia amenizar outros efeitos nas funções cardiovasculares, inibindo a necessidade de mudanças na pressão arterial. Os efeitos separados do tratamento com testosterona e etanol na resposta depressora à acetilcolina foram inibidos quando essas substâncias foram coadministradas. Esses resultados evidenciam que essas substâncias são capazes de mutuamente inibir os efeitos cardiovasculares de cada uma, havendo assim uma interação entre seus efeitos tóxicos nas funções cardiovasculares. Quanto à influência do exercício físico, observamos que o treinamento físico de corrida em esteira inibiu os efeitos cardiovasculares ocasionados pelos tratamentos utilizados, mas alguns efeitos foram identificados apenas nos animais treinados.

Conjuntamente, nossos resultados indicam que o exercício físico é um fator importante para os efeitos causados pela exposição a testosterona e etanol nas

funções cardiovasculares – revertendo respostas à agentes vasoativos em comparação com animais sedentários, sem no entanto apresentar um efeito no consumo de etanol. Dessa maneira, nossos resultados sugerem que os efeitos cardiovasculares causados, tanto pela testosterona quanto pelo etanol, podem estar relacionados, em parte, à inibição dos efeitos protetores do exercício físico nas funções cardiovasculares.

8. CONCLUSÃO

No presente estudo investigamos a associação entre exercício físico, consumo de etanol e tratamento com EAA sobre a função cardiovascular de ratos adultos. Nossos resultados indicam que o exercício físico é um fator importante para os efeitos causados pela exposição a testosterona e etanol nas funções cardiovasculares – revertendo respostas à agentes vasoativos em comparação com animais sedentários, sem no entanto apresentar um efeito no consumo de etanol. Dessa maneira, nossos resultados sugerem que os efeitos cardiovasculares causados, tanto pela testosterona quanto pelo etanol, podem estar relacionados, em parte, à inibição dos efeitos protetores do exercício físico nas funções cardiovasculares.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDIES, C.M.; MORRIS, G.S.; ERICKSON, C.K.; FARRAR, R.P. Both acute and chronic exercise enhance in vivo ethanol clearance in rats. *J Appl Physiol.*, v. 66, p. 555–560, 1989.

BAGATELL, C.J.; BREMNER, W.J. Androgens in men: uses and abuses. *N Engl J Med.*, v. 334, p. 707-714, 1996.

BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, v. 93, p. 43-48, 2005.

BOCALINI, D.S.; BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C.T.; TUCCI, P.J.; CAMPOS, R.R. Treadmill exercise training prevents myocardial mechanical dysfunction induced by androgenic-anabolic steroid treatment in rats. *PLoS One*, v. 9, 2014.

BRAGER, A.J.; HAMMER, S.B. Impact of wheel running on chronic ethanol intake in aged Syrian hamsters. *Physiol Behav.*, v. 107, p. 418–423, 2012.

CADOUX-HUDSON, T.A.; FEW, J.D.; IMMS, F.J. The effect of exercise on the production and clearance of testosterone in well trained young men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.*, v. 54, p. 321–325, 1985.

CHAN, T.C.; SUTTER, M.C. The effects of chronic ethanol consumption on cardiac function in rats. *Can J Physiol Pharmacol.*, v. 60, p. 777-782, 1982.

CHAN, T.C.; WALL, R.A.; SUTTER, M.C. Chronic ethanol consumption, stress, and hypertension. *Hypertension.*, v. 7, p. 519-524, 1985.

CHANG, H.R.; LEE, R.P.; WU, C.Y.; CHEN, H.I. Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: a comparison between rats with normotension and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, v. 29, p. 275–280, 2002.

CIOLAC, E.G. High-intensity interval training and hypertension: maximizing the benefits of exercise?. *Am J Cardiovasc Dis.*, v. 2 (2), p. 102-110, 2012.

COSTA-PEREIRA, L.V.; MELO, D.S.; SANTOS, C.S.; MENDES, B.F.; ESTEVES, E.A.; LACERDA, A.C.R.; MIRANDA, J.L.; ROCHA-VIEIRA, E.; GRIPP, F.; AMORIM, F.T.; MAGALHÃES, F.C.; DIAS-PEIXOTO, M.F. Distinct beneficial effects of continuous vs accumulated exercise training on cardiovascular risk factors in Wistar rats. *Scand J Med Sci Sports.*, [Epub ahead of print], 2016.

CRESTANI, C.C.; LOPES DA SILVA, A.; SCOPINHO, A.A.; RUGINSK, S.G.; UCHOA, E.T.; CORREA, F.M. Cardiovascular alterations at different stages of

hypertension development during ethanol consumption: time- course of vascular and autonomic changes. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v. 208 (2), p. 245-55, 2014.

CRESTANI, C.C.; TAVARES, R.F.; GUIMARÃES, F.S.; CORREA, F.M.; JOCA, S.R.; RESSTEL, L.B. Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. *Eur J Pharmacol.* v. 670, p. 527-533, 2011.

CRUZ, F.C.; ALVES, F.H.; LEAO, R.M.; PLANETA, C.S.; CRESTANI, C.C. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in cardiovascular changes following chronic treatment with cocaine and testosterone: a role beyond drug seeking in addiction? *Neuroscience*, v. 253, p. 29–39, 2013.

DARLINGTON, T.M.; MCCARTHY, R.D.; COX, R.J.; EHRINGER, M.A. Mesolimbic transcriptional response to hedonic substitution of voluntary exercise and voluntary ethanol consumption. *Behav Brain Res.*, v. 259, p. 313–320, 2014.

DAVEL, A.P.; CERAVOLO, G.S.; WENCESLAU, C.F.; CARVALHO, M.H.; BRUM, P.C.; ROSSONI, L.V. Increased vascular contractility and oxidative stress in beta (2)-adrenoceptor knockout mice: the role of NADPH oxidase. *J Vasc Res.*, v. 49, p. 342–352, 2012.

DELUCIA, R. Farmacologia Integrada: uso racional de medicamentos. *São Paulo: clube de autores.* 2^o Vol., 2014.

DUFLOTH, D.L.; MORRIS, M.; MICHELINI, L.C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. *Am J Physiol.*, v. 273, p. 1271-1282, 1997.

EBENBICHLER, C.F.; STURM, W.; GÄNZER, H.; BODNER, J.; MANGWETH, B.; RITSCH, A.; SANDHOFER, A.; LECHLEITNER, M.; FÖGER, B.; PATSCH, J.R. Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in male body builders taking anabolic-androgenic steroids. *Atherosclerosis*, v. 158, p. 483-490, 2001.

EHRINGER, M.A.; HOFT, N.R.; ZUNHAMMER, M. Reduced alcohol consumption in mice with access to a running wheel. *Alcohol*, v. 43, p. 443–452, 2009.

ENGI, S.A.; CRUZ, F.C.; LEÃO, R.M.; CORRÊA, F.M.; PLANETA, C.S.; CRESTANI, C.C. Effect of the single or combined administration of cocaine and testosterone on cardiovascular function and baroreflex activity in unanesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol.*, v. 59, p. 231-240, 2012.

ENGI, S.A.; CRUZ, F.C.; LEAO, R.M.; SPOLIDORIO, L.C.; PLANETA, C.S.; CRESTANI, C.C. Cardiovascular complications following chronic treatment with cocaine and testosterone in adolescent rats. *PLoS One*, v. 9, 2014.

ESTRADA, M.; LIBERONA, J.L.; MIRANDA, M.; JAIMOVICH, E. Aldosterone and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v. 279, p. 132-139, 2000.

FATJÓ, F.; FERNÁNDEZ-SOLÀ, J.; LUÍS, M.; ELENA, M.; BADÍA, E.; SACANELLA, E.; ESTRUCH, R.; NICOLÁS, J.M. Myocardial antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res.*, v. 29, p. 864-870, 2005.

FERRER, M.; ENCABO, A.; MARÍN, J.; BALFAGÓN, G. Treatment with the anabolic steroid, nandrolone, reduces vasoconstrictor responses in rabbit arteries. *Eur J Pharmacol.* v. 258, p. 103-110, 1994.

FONTES-RIBEIRO, C. A.; MARQUES, E.; PEREIRA, F. C.; SILVA A. P.; MACEDO, T. R. A. May Exercise Prevent Addiction? *Current Neuropharmacology*, v. 9, p. 45-48, 2011.

FRENCH, M.T. Do alcohol consumers exercise more? Findings from a national survey. *American Journal of Health Promotion*, v. 24, p. 2-10, 2009.

GARY, V.; GUTHRIE, D. The effect of jogging on physical fitness and self-concept in hospitalized alcoholics. *Q J Stud Alcohol.*, v. 33 (4), p. 1073-1078, 1972.

GROLLMAN, A.; HARRISON, T.R.; WILLIAMS, J.R. The effect of various sterol derivatives on the blood pressure of the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 69 (2), p. 149-155, 1940.

GURKOVSKAYA, O.V.; LEONARD, S.T.; LEWIS, P.B.; WINSAUER, P.J. Effects of pregnanolone and dehydro- epiandrosterone on ethanol intake in rats administered ethanol or saline during adolescence. *Alcohol Clin Exp Res.*, v. 33, p. 1252–1264, 2009.

HABOUBI, N.A.; THURNHAM, D.I. Effect of ethanol on erythrocyte acetylcholinesterase activity. *Ann Clin Biochem.*, v. 23 (4), p. 458–462, 1986.

HAMMER, S.B.; RUBY, C.L.; BRAGER, A.J.; PROSSER, R.A.; GLASS, J.D. Environmental modulation of alcohol intake in hamsters: effects of wheel running and constant light exposure. *Alcohol Clin Exp Res.*, v. 34, p. 1651–1658, 2010.

HARTUNG, G.H.; KOHL, H.W.; BLAIR, S.N.; LAWRENCE, S.J.; HARRIST, R.B. Exercise tolerance and alcohol intake: blood pressure relation. *Hypertension*, v. 16, p. 501–507, 1990.

HUSAIN, K.; ANSARI, R.A.; FERDER, L. Alcohol-induced hypertension: Mechanism and prevention. *World J Cardiol.*, v. 6, p. 245–252, 2014.

HUSAIN, K.; MEJIA, J.; LALLA, J. Physiological basis for effect of physical conditioning on chronic ethanol-induced hypertension in a rat model. *Mol Cell Biochem.*, v. 289, p. 175-183, 2006.

HUSAIN, K.; SOMANI, S.M. Effect of exercise training and chronic ethanol ingestion on cholinesterase activity and lipid peroxidation in blood and brain regions of rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, v. 22, p. 411–423, 1998.

HUSAIN, K.; VAZQUEZ ORTIZ, M.; LALLA, J. Physical training ameliorates chronic alcohol-induced hypertension and aortic reactivity in rats. *Alcohol Alcohol*, v. 41, p. 247–253, 2006.

JOHANSSON, P.; LINDQVIST, A.; NYBERG, F.; FAHLKE, C. Anabolic androgenic steroids affects alcohol intake, defensive behaviors and brain opioid peptides in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 67, p. 271– 279, 2000.

JOHANSSON, P.; RAY, A.; ZHOU, Q.; HUANG, W.; KARLSSON, K.; NYBERG, F. Anabolic androgenic steroids increase b-endorphin levels in the ventral tegmental area in the male rat brain. *Neuroscience Research*, v. 27, p. 185–189, 1997.

KAPLAN, N.M. Alcohol and hypertension. *Lancet.*, v. 345, p. 1588-1589, 1995.

KELLY, M.J.; LAGRANGE, A.H.; WAGNER, E.J.; RØNNEKLEIV, O.K. Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. *Steroids.*, v. 64, p. 64-75, 1999.

KINDLUNDH, A.M.; LINDBLUM, J.; NYBERG, F. Chronic administration with nandrolone decanoate induces alterations in the gene-transcript content of dopamine D(1)- and D(2)-receptors in the rat brain. *Brain Res.*, v. 979 (1-2), p. 37-42, 2003.

KUMAI, T.; TANAKA, M.; WATANABE, M.; MATSUMOTO, C.; KOBAYASHI, S. Possible involvement of androgen in increased norepinephrine synthesis in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol.*, v. 66, p. 439–444, 1994.

LEASURE, J.L.; NIXON, K. Exercise neuroprotection in a rat model of binge alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res.*, v. 34 (3), p. 404-414, 2010.

LE MELLAY, V.; GROSSE, B.; LIEBERHERR, M. Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J Biol Chem.*, v. 272, p. 11902-11907, 1997.

LE MELLAY, V.; LASMOLES, F.; LIEBERHERR, M. Galpha (q/11) and betagamma proteins and membrane signaling of calcitriol and estradiol. *J Cell Biochem.*, v. 75, p. 138-146, 1999.

LYNCH, C.S.; STORY, A.J. Dihydrotestosterone and estrogen regulation of rat brain androgen-receptor immunoreactivity. *Physiol Behav.*, v. 69 (4-5), p. 445-453, 2000.

MCALLISTER, R.M.; JASPERSE, J.L.; LAUGHLIN, M.H. Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.*, v. 98, p. 753–761, 2005.

MAGNUSSON, K.; BIRGNER, C.; BERGSTRÖM, L.; NYBERG, F.; HALLBERG, M. Nandrolone decanoate administration dose-dependently affects the density of kappa opioid peptide receptors in the rat brain determined by autoradiography. *Neuropeptides*, v. 43, p. 105-111, 2009.

MASSON, G.S.; COSTA, T.S.; YSHII, L.; FERNANDES, D.C.; SOARES, P.P.; LAURINDO, F.R. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. *PLoS One*, v. 9, 2014.

MATSUDA, K.; RUFF, A.; MORINELLI, T.A.; MATHUR, R.S.; HALUSHKA, P.V. Testosterone increases thromboxane A2 receptor density and responsiveness in rat aortas and platelets. *Am J Physiol.*, v. 267, p. 887-893, 1994.

MCGINNIS, M.Y.; LUMIA, A.R.; TETEL, M.J.; MOLENDIA-FIGUEIRA, H.A.; POSSIDENTE, B. Effects of anabolic androgenic steroids on the development and expression of running wheel activity and circadian rhythms in male rats. *Physiol Behav.*, v. 92, p. 1010–1018, 2007.

MCGILL, H.C. JR.; ANSELMO, V.C.; BUCHANAN, J.M.; SHERIDAN, P.J. The heart is a target organ for androgen. *Science.*, v. 207, p. 775-777, 1980.

MCGILL, H.C.JR.; SHERIDAN, P.J. Nuclear uptake of sex steroid hormones in the cardiovascular system of the baboon. *Circ Res.*, v. 48, p. 238-244, 1981.

MCMILLAN, D.E.; MCCLURE, G.Y.; HARDWICK, W.C. Effects of access to a running wheel on food, water and ethanol intake in rats bred to accept ethanol. *Drug Alcohol Depend.*, v. 40, p. 1–7, 1995.

NEGRAO, C.E.; MOREIRA, E.D.; SANTOS, M.C.; FARAH, V.M.; KRIEGER, E.M. Vagal function impairment after exercise training. *J Appl Physiol.*, v. 72, p.1749-1753, 1992.

NGUYEN, T.V.; YAO, M.; PIKE, C.J. Dihydrotestosterone activates CREB signaling in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.*, v. 1298, p. 1-12, 2009.

OZBURN, A.R.; HARRIS, R.A.; BLEDNOV, Y.A. Wheel running, voluntary ethanol consumption, and hedonic substitution. *Alcohol*, v. 42 (5), p. 417-424, 2008.

PERUSQUIA, M.; STALLONE, J.N. Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 298, p. 1301–1307, 2010.

PIAZZA-GARDNER, A.K.; BARRY, A.E. Examining physical activity levels and alcohol consumption: are people who drink more active? *Am J Health Promot.*, v. 26, p. 95–104, 2012.

RESSTEL, L.B.; SCOPINHO, A.A.; LOPES DA SILVA, A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CORREA, F.M. Increased circulating vasopressin may account for ethanol-induced hypertension in rats. *Am J Hypertens.*, v. 21, p. 930– 935, 2008.

RESSTEL, L.B.; TIRAPELLI, C.R.; LANCHOTE, V.L.; UYEMURA, S.A.; DE OLIVEIRA, A.M.; CORRÊA, F.M. Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. *Life Sci.*, v. 78, p. 2179-2187, 2006.

SANCHES, I.C.; CONTI, F.F.; BERNARDES, N.; BRITO, J.O.; CALDINI, E.G.; CAVAGLIERI, C.R. Impact of Combined Exercise Training on Cardiovascular Autonomic Control and Mortality in Diabetic Ovariectomized Rats. *J Appl Physiol.*, v. 119 (6), p. 656-62, 2015.

SATO, S.M.; SCHULZ, K.M.; SISK, C.L.; WOOD, R.I. Adolescents and androgens, receptors and rewards. *Hormones and Behavior*, v.53, p. 647-658, 2008.

SIMMS, J.A.; STEENSLAND, P.; MEDINA, B.; ABERNATHY, K.E.; CHANDLER, L.J.; WISE, R. Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res.*, v. 32, p. 1816–1823, 2008.

SPARROW, M.G.; ROGGENDORF, H.; VOGEL, W.H. Effect of ethanol on heart rate and blood pressure in nonstressed and stressed rats. *Life Sci.*, v. 40, p. 2551–2559, 1987.

STRICKLAND, J.A.; WOOLLES, W.R. Blood ethanol level and physiologic measurements during ethanol-induced hypertension. *Alcohol*, v. 6, p. 109-114, 1989.

SULLIVAN, M.L.; MARTINEZ, C.M.; GENNIS, P.; GALLAGHER, E.J. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis.*, v. 41 (1), p. 1-15, 1998.

VAN AMSTERDAM, J.; OPPERHUIZEN, A.; HARTGENS, F. Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. *Regul Toxicol Pharmacol.*, v. 57, p. 117-123, 2010.

VÉRAS-SILVA, A.C.; MATTOS, K.C.; GAVA, N.S.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, v. 273, p. 2627-2631, 1997.

WALLACE, J.P. Exercise in Hypertension: A Clinical Review. *Sports Med.*, v. 33 (8), p. 1-15, 2003.

WATSON, C.S.; GAMETCHU, B. Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc Soc Exp Biol Med.*, v. 220, p. 9-19, 1999.

WERME, M.; LINDHOLM, S.; THORÉN, P.; FRANCK, J.; BRENÉ, S. Running increases ethanol preference. *Behav Brain Res.*, v. 18, p. 301-8, 2002.

WOOD, R.I. Oral testosterone self-administration in male hamsters: dose-response, voluntary exercise, and individual differences. *Horm Behav.*, v. 41, p. 247-258, 2002.

WOOD, R.I. Reinforcing aspects of androgens. *Physiology & Behavior*, v. 83, p. 279-289, 2004.

WOOD, R.I.; NEWMAN, S.W. Androgen and estrogen receptors coexist within individual neurons in the brain of the Syrian hamster. *Neuroendocrinology*, v. 62 (5), p. 487-497, 1995.

ZHANG, X.; ABDEL-RAHMAN, A.R.; WOOLLES, W.R. A differential action for ethanol on baroreceptor reflex control of heart rate and sympathetic efferent discharge in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.*, v. 187, p. 14-21, 1988.

Estudo da cascata mTORC1 nos transtornos relacionados ao abuso de etanol

1. INTRODUÇÃO

O abuso de etanol é um problema de ordem mundial com custos médicos, sociais e econômicos elevados. Contudo, as intervenções farmacológicas ainda são limitadas (DSM V, 2013; HILLEMACHER, LEGGIO, HEBERLIN, 2014; KARASOV e OSTACHER, 2014). Como resultado da pouca eficácia dos tratamentos atuais disponíveis, muitos pacientes dependentes recaem nos primeiros anos de abstinência (SINHA, 2011).

Uma das causas da recaída é a fissura induzida por memórias relacionadas ao uso da droga, um processo no qual uma “dica” ambiental, anteriormente associada aos efeitos reforçadores positivos do uso da substância provoca fissura e aumenta a probabilidade de recaída (VON DER GOLTZ, 2009; MILTON e EVERITT, 2012). Dessa maneira, a anulação da memória associada às propriedades reforçadoras do etanol poderia reduzir e/ou prevenir a procura por esta substância (BARAK et al., 2013).

O complexo 1 da proteína alvo da rapamicina de mamíferos (mTORC1- “mammalian target of rapamycin complex 1”) é um complexo proteico evolutivamente conservado e pertencente à família cinase 3-fosfatidilinositol (PI3K) (NEASTA et al., 2014). A cascata intracelular da mTORC1 está relacionada com vários processos celulares, tais como regulação de síntese proteica, diferenciação celular, apoptose, entre outros (BUFFINGTON, HUANG, COSTA-MATTIOLI, 2014).

A ativação da mTORC1 resulta na fosforilação de outras proteínas: o fator de iniciação eucariótico 4E (4EBP, com papel na regulação da tradução

de proteínas) e a proteína ribossomal S6 cinase (S6K, responsável pela regulação da biogênese ribossomal) (HOLZ et al., 2005; WANG et al., 2008; RICHTER e KLANN, 2009) (**Figura 1**).

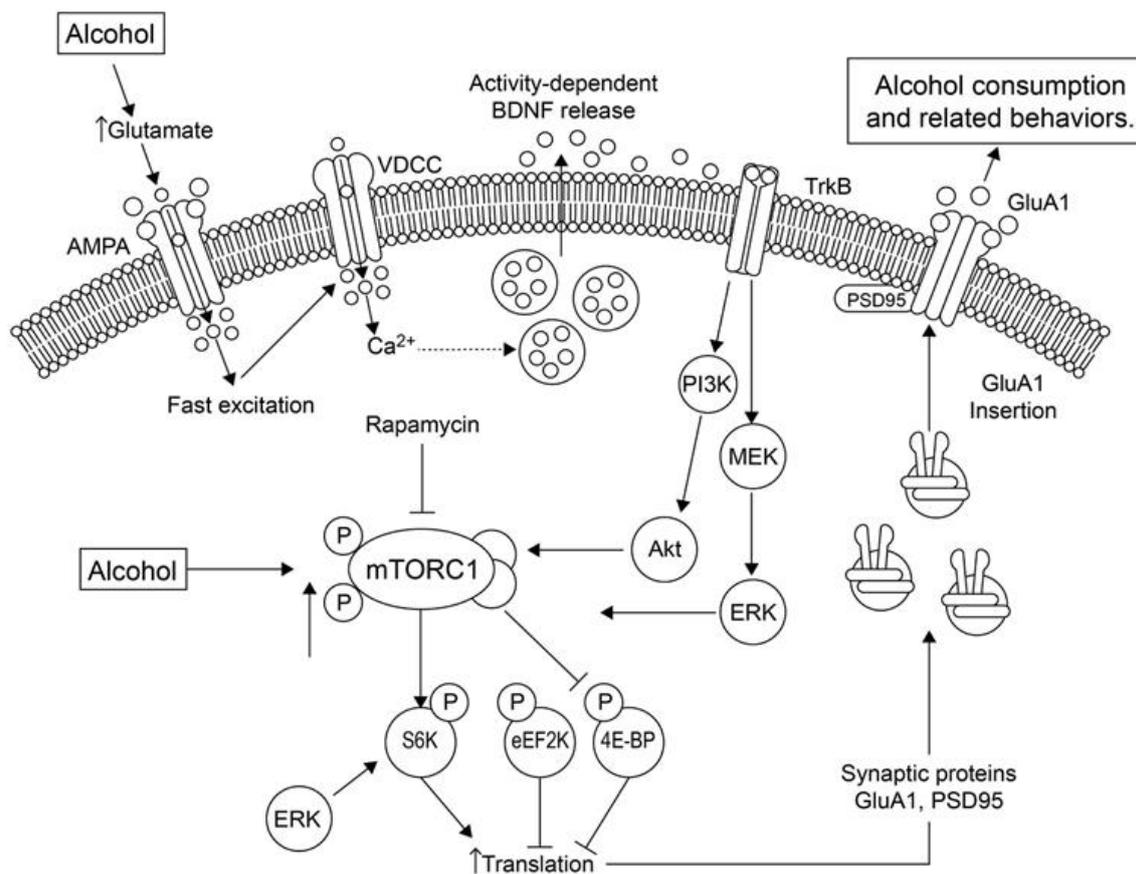


Figura 1. Cascata intracelular da mTORC1. A exposição prolongada ao etanol aumenta a ativação da mTORC1 e a fosforilação/ativação de seus substratos “downstream” tais como 4E-BP e S6K e conseqüentemente aumento da expressão dos receptores glutamatérgicos AMPA e GluA1. Uma segunda sinalização intracelular, também mediada por etanol, leva à ativação de canais voltagem dependentes de Ca²⁺ e a liberação dependente de BDNF, que se liga e estimula seu receptor (TrkB) a ativar cascatas intracelulares como a PI3K, AKT, Ras e conseqüentemente a mTORC1. Assim, a ativação da mTORC1 medeia a tradução de proteínas sinápticas específicas que são importantes para os processos de neuroplasticidades (Adaptado de Most et al., 2014).

A família das 4E-BPs é formada por moléculas repressoras da tradução e inclui a 4E-BP1, que suprime a tradução através da sua competição com o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) pelo fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), evitando assim a formação do complexo de iniciação eucariótico 4F (eIF4F) (WOO et al., 2007). Dessa maneira, a fosforilação da 4EBP resulta no complexo eIF4E/eIF4G, o que permite a formação do complexo eIF4F e conseqüentemente a síntese de proteínas (GINGRAS et al., 2001). A mTORC1 também ativa, através de fosforilação a proteína S6K1, que fosforila outras proteínas alvo como a proteína ribossomal S6 e eIF4B (RAUGHT et al., 2004).

No sistema nervoso central, a mTORC1 e suas proteínas “*downstream*” são cruciais para a plasticidade sináptica, aprendizado e formação de memórias, além disso, parecem ter um papel importante no processo de aprendizado e memória das desordens relacionadas ao consumo de etanol (BUFFINGTON, HUANG e COSTA-MATTIOLI, 2014; HUYNH, SANTINI e KLANN, 2014; NEASTA et al., 2014).

De fato, várias evidências têm relacionado a cascata de sinalização da mTORC1 como um mediador crucial do abuso e dependência do etanol. Especificamente, Neasta et al. (2010) demonstraram, em modelos animais, que o consumo excessivo de etanol ativou a cascata da mTORC1 no nucleus accumbens (NAc), uma região central que possui um papel fundamental na via de recompensa (ROBINSON e BERRIDGE, 1993; KOOB, 2013). Neasta et al. (2010) também relataram que o tratamento com rapamicina, um inibidor específico da mTORC1, diminuiu a expressão da sensibilização locomotora e a preferência condicionada por lugar induzidos pelo etanol. A rapamicina também reduziu o consumo voluntário excessivo de etanol e a procura pela droga em

modelos animais de consumo livre de etanol (NEASTA et al., 2010). Dessa maneira, a inibição da mTORC1 ou o bloqueio das cascatas diretamente relacionadas a mTORC1, parece ter um potencial terapêutico para as condições patológicas relacionadas à memória, como nas memórias relacionadas à dependência de drogas (BUFFINGTON, HUANG e COSTA-MATTIOLI, 2014). Assim, a rapamicina tem sido investigada como um possível tratamento farmacológico para o tratamento da dependência do etanol (COSTA-MATTIOLI e MONTEGGIA, 2013; BARAK et al., 2013; HUYNH, SANTINI e KLANN, 2014; NEASTA et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, a rapamicina atua como inibidora do complexo mTORC1 e tem sido amplamente utilizada como um bloqueador das memórias relacionadas ao uso de etanol (BARAK, 2013; NEASTA et al., 2014). Contudo, a rapamicina é um fármaco imunossupressor utilizado para prevenir a rejeição de órgãos transplantados (HARTFORD e RATAIN, 2007). Dessa maneira, suas propriedades imunossupressoras constituem uma limitação do seu uso no tratamento da dependência ao etanol (NEASTA et al., 2014).

Numa tentativa de contornar esse problema, novas substâncias têm sido propostas como possíveis tratamentos nas desordens relacionadas ao etanol, entre elas os compostos 4EGI-1 e PF-4708671 que se ligam à 4E-BP e S6K1, respectivamente. Conseqüentemente, ocorre o bloqueio de suas cascatas intracelulares e interrupção dos mecanismos de transcrição e tradução de proteínas (MOERKE et al., 2007; PEARCE et al., 2010).

Foi demonstrado que o 4EGI-1 interfere especificamente nos processos de memória (HOEFFER et al., 2011). Adicionalmente, 4EGI-1 liga-se à proteína eIF4E, interrompe o complexo eIF4E/eIF4G, inibindo a tradução dependente

desse complexo – mas não inibe o fator de iniciação independente para tradução *in vitro* (MOERKE et al., 2007) e *in vivo* (HOEFFER et al., 2011). Esses resultados sugerem que o 4EGI-1 é um inibidor específico da cascata 4E-BP/eIF4F, que parece desempenhar papel importante no aprendizado e memória.

Da mesma maneira, o PF-4708671 tem sido apontado como um inibidor específico da S6K1 e previne a fosforilação mediada pela ativação da proteína S6K1 (PEARCE et al., 2010). Os inibidores de ERK, que diminuem a ativação da S6K, são bem conhecidos por inibirem a expressão de memórias associadas ao medo e por inibirem a retenção de aprendizado espacial (COSTA-MATTIOLI et al., 2009). Assim, a inibição específica do S6K poderia desempenhar um papel importante no aprendizado e memórias relacionadas ao uso de etanol.

Apesar das evidências relatadas acima, pouco se sabe sobre os mecanismos do 4EGI-1 e PF-4708671 na cascata da mTORC1 e seus possíveis efeitos no consumo de etanol. Dessa maneira, 4EGI-1 e PF-4708671 podem ser possíveis candidatos farmacológicos no tratamento de neuroadaptações relacionadas ao abuso do etanol.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi investigar o papel das proteínas *downstream* da mTORC1, 4E-BP e S6K, no comportamento de busca e consumo excessivo de etanol. Para tanto, avaliamos se o tratamento sistêmico separado e/ou combinado com 4EGI-1 e PF-4708671 poderia reduzir e/ou abolir o consumo de etanol no modelo de acesso intermitente a duas garrafas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J (n=40) com 6-7 semanas. Os animais foram obtidos do Laboratório Jackson (Sacramento, Califórnia/EUA) e foram mantidos em caixas-moradia plásticas com temperatura controlada ($24^{\circ} \pm 2^{\circ}$), no Biotério Central da Universidade da Califórnia – São Francisco (Califórnia, EUA). Os animais foram mantidos no regime de 12:12 horas no ciclo claro-escuro (luzes apagadas às 10h), com livre acesso a água e comida.

As condições de manutenção e os procedimentos experimentais foram realizados conforme os protocolos aprovados pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996).

3.2. Drogas

- Álcool etílico absoluto - diluído em água na concentração de 20%.
- Rapamicina (Sigma) – dissolvida em DMSO 5%.
- PF-4708761 (Sigma) – dissolvida em DMSO 15%.
- 4EGI-1 (ToCris) – dissolvida em DMSO 15%.
- Veículo: DMSO 15%, PEG 300 5%, Tween 80% e salina.

3.3. Acesso Intermitente a Duas Garrafas

Para o consumo voluntário de etanol foi utilizado o protocolo de acesso intermitente a duas garrafas (WISE, 1973; STEENSLAND et al., 2007). Os camundongos foram individualmente alocados nas caixas-moradia e tiveram livre acesso a duas garrafas, com 50 mL em cada - uma contendo etanol 20%

e outra água, sem a utilização de aumentos crescentes na concentração de etanol ou uso de sacarina. As garrafas foram oferecidas três vezes na semana (às segundas, quartas e sextas-feiras), durante 8 semanas. A posição das garrafas era sempre trocada (entre direita e esquerda) para evitar a escolha de garrafas por posição.

A quantidade de etanol consumido foi calculada através da pesagem das garrafas antes e após elas serem oferecidas aos animais. Os valores foram normalizados pelo peso corporal de cada animal e são apresentados como gramas de etanol/Kg. As análises foram feitas a partir da estabilização do consumo de etanol (aproximadamente 6 semanas), quando foram separados entre “maus” e “bons” bebedores (que consistiu no consumo de etanol ideal acima de 8g/Kg/24h). Somente os animais alocados no grupo de “bons” bebedores continuaram até o final do procedimento experimental (n=20).

Os animais tiveram livre acesso à água e comida durante todo o procedimento experimental.

3.4. Administração Sistêmica de 4EGI-1 e PF-4708671 e Mensuração do Consumo de Etanol

Após 8 semanas de acesso intermitente a duas garrafas, os animais (n=20) receberam os seguintes tratamentos:

- 1) Veículo (5% polietileno glicol 300 + 5% Tween 80 + água destilada)
- 2) Rapamicina (20 mg/kg), dissolvida em 5% DMSO.
- 3) PF-4708671 (50 mg/kg), dissolvida em 15% DMSO.
- 4) 4EGI-1 (50 mg/kg), dissolvida em 5% DMSO.
- 5) PF-4708761 e 4EGI-1 (50 mg/kg).

Os animais foram habituados a injeções de salina ou DMSO 5% durante 5 dias antes do início dos tratamentos farmacológicos. As substâncias foram administradas em dose única aos camundongos por meio de injeção intraperitoneal (i.p.) sempre às segundas-feiras, de acordo com cada grupo (descrito acima), 3 horas antes da colocação das garrafas de etanol.

Para cada grupo foram feitas duas medidas de consumo de etanol: **“binge”** – 4 horas após o começo do acesso ao etanol e **consumo total** - 24 horas o começo do acesso ao etanol.

Foi utilizado o modelo de comparação intra-grupos para todos os tratamentos, ou seja, os animais foram controles deles mesmos para cada tratamento farmacológico. De tal forma que, o animal que recebeu substância (rapamicina, PF-4708671, 4EGI-1 ou PF-4708671 + 4EGI-1) numa semana, na semana seguinte recebeu veículo e vice-versa.

As substâncias foram administradas uma vez na semana, sempre às segundas-feiras.

A rapamicina foi utilizada como controle positivo antes do começo do tratamento farmacológico com os inibidores.

O procedimento experimental do tratamento farmacológico durou 8 semanas (além das 8 semanas de acesso intermitente ao etanol), e foi replicado uma vez.

O tratamento combinado de PF-4708671 e 4EGI-1 foi realizado utilizando a mesma injeção.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste t de Student, para dados dependentes, foi utilizado para todos os tratamentos.

5. RESULTADOS

5.1. Administração de rapamicina diminui o consumo em “Binge” de camundongos

Para verificar os efeitos da rapamicina na redução do consumo excessivo de etanol e para confirmar estudos prévios (NEASTA et al., 2010), a rapamicina foi administrada (i.p.) 3 horas antes do começo do acesso ao etanol.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com rapamicina (20 mg/kg) reduziu o consumo em “binge” ($t_{(9)}=3,27$, $p<0,05$), sem afetar a preferência pelo etanol ($t_{(9)}=1,82$, $p>0,05$) e o consumo de água ($t_{(9)}=0,75$, $p>0,05$) (**Figura 2**).

Essa diminuição no consumo em “binge” de etanol não foi observada no consumo total de etanol após 24 horas. Dessa maneira, não foram observadas diferenças significativas no consumo de etanol ($t_{(9)}=1,07$, $p>0,05$), na preferência pelo etanol ($t_{(9)}=0,37$, $p>0,05$) ou no consumo de água após 24 horas ($t_{(9)}=0,04$, $p>0,05$) (**Figura 3**).

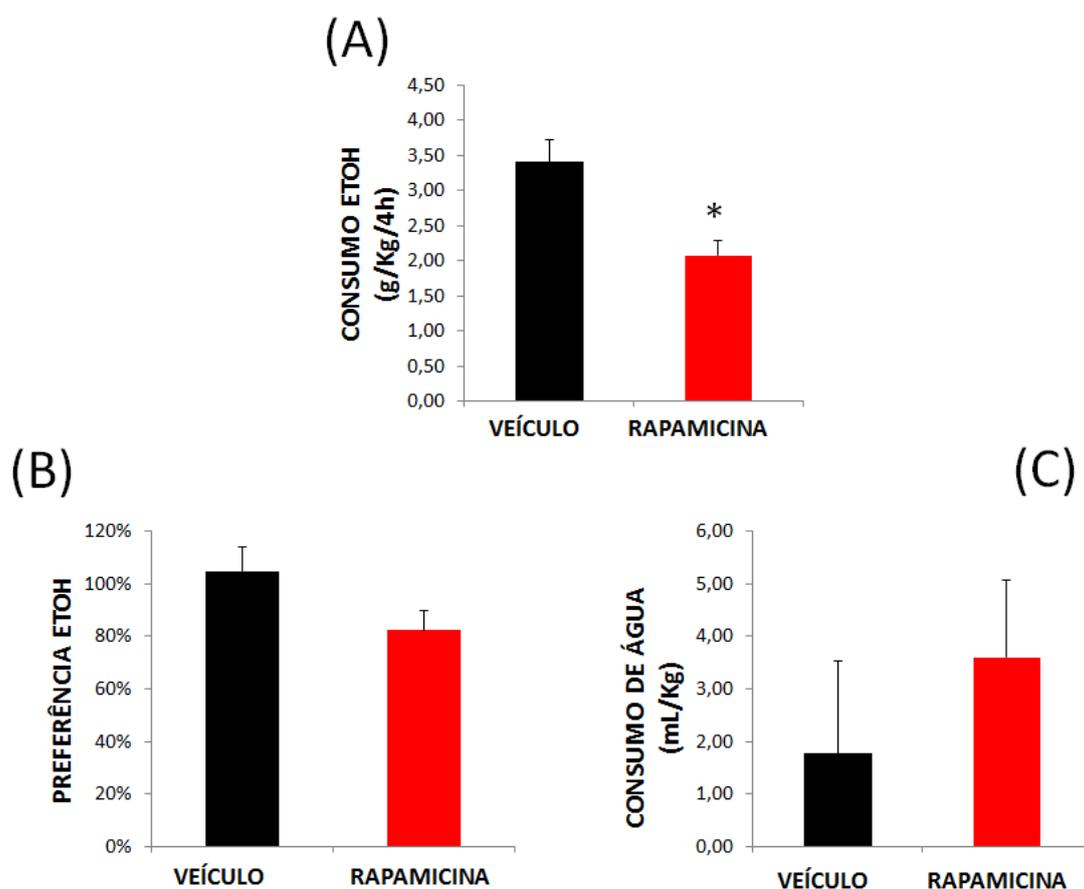


Figura 2. Consumo em “binge” de etanol após a administração de rapamicina (20 mg/kg, i.p.). Os animais tiveram acesso à EtOH 20% e água durante 4 horas. O consumo de etanol em “binge” foi registrado 4 horas após o início do acesso à EtOH 20%. Os animais receberam rapamicina ou veículo três horas antes da exposição ao EtOH 20%. As barras representam a média \pm EPM. **(A)** Consumo de EtOH em “binge” (n=5-6/grupo). * $p < 0.05$: comparado ao grupo veículo. **(B)** Preferência por etanol após 4 horas de acesso à EtOH 20% (n=5-6/grupo). **(C)** Consumo de água, após 4 horas de acesso (n=5-6/grupo).

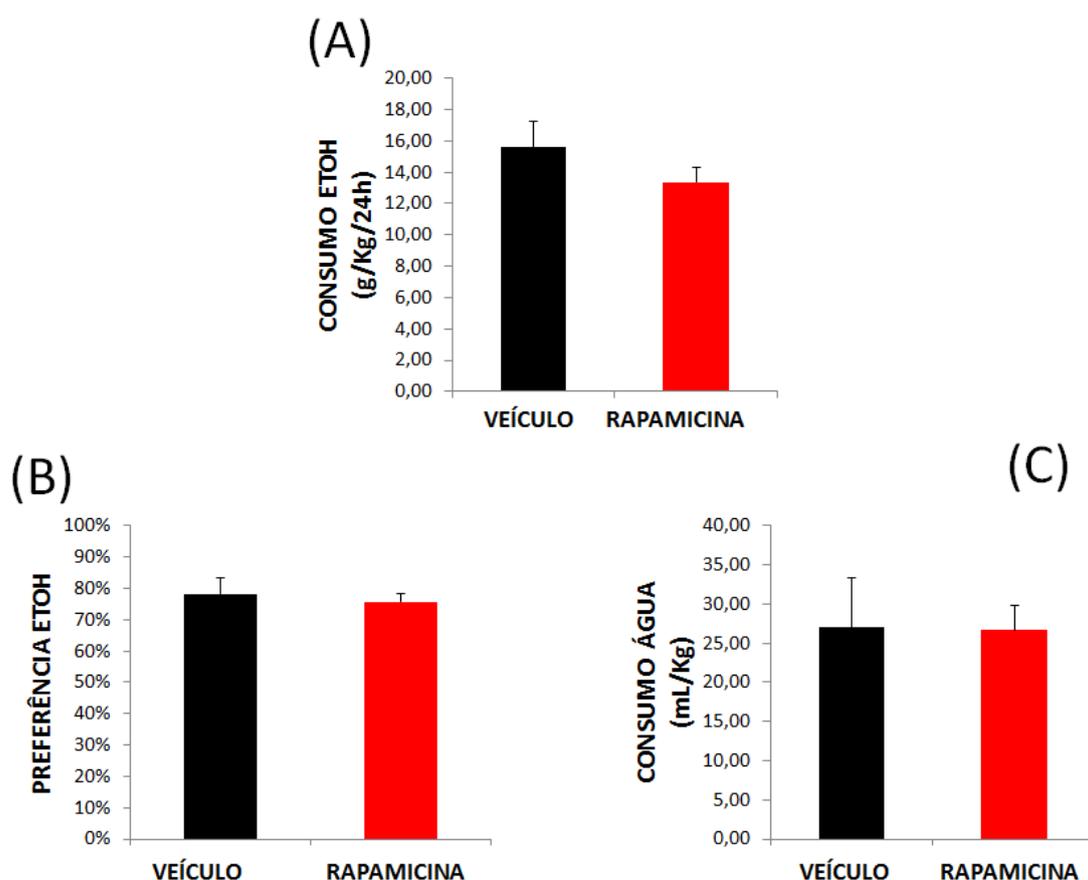


Figura 3. Consumo de etanol após 24 horas da administração de rapamicina (20 mg/kg, i.p.). Os animais tiveram acesso à EtOH 20% e água durante 24 horas. O tratamento com rapamicina foi realizado três horas antes do começo do acesso ao EtOH. As barras representam a média \pm EPM. **(A)** Consumo de EtOH, após 24 horas de acesso à EtOH 20% (n=5-6/grupo). **(B)** Preferência por etanol após 24 horas de acesso à EtOH 20% (n=5-6/grupo). **(C)** Consumo de água, após 24 horas de acesso (n=5-6/grupo).

5.2. Administração de PF-4708671 não alterou o consumo em “Binge” de camundongos

Nossos resultados demonstraram que o tratamento agudo com PF-4708671 (50 mg/kg, i.p.) não alterou o consumo em “binge” ($t_{(33)}=0,74$, $p>0,05$), a preferência pelo etanol ($t_{(33)}=1,29$, $p>0,05$) e o consumo de água ($t_{(33)}=-1,04$, $p>0,05$) (**Figura 4**).

Além disso, o tratamento com PF-4708671 (50 mg/kg) também não alterou o consumo ao término da sessão de 24 horas de acesso ao etanol. Dessa maneira, não foram observadas diferenças significativas nem no consumo de etanol ($t_{(33)}=0,05$, $p>0,05$), nem para a preferência pelo etanol ($t_{(33)}=1,64$, $p>0,05$) e nem no consumo de água ($t_{(27)}=-0,96$, $p>0,05$) (**Figura 5**).

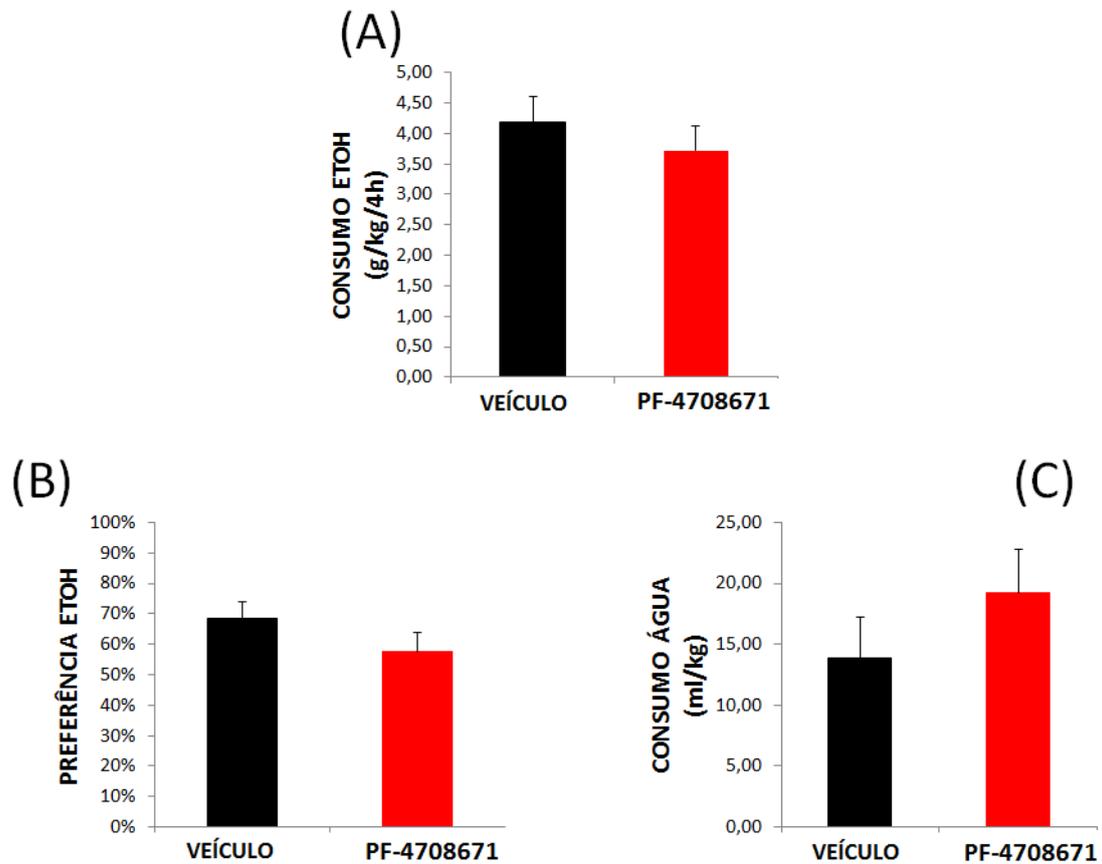


Figura 4. Consumo de etanol em "binge" após tratamento com PF-4708671 (50 mg/kg, i.p.). Os animais tiveram acesso à EtOH 20% e água durante 4 horas. O tratamento com PF-4708671 foi realizado três horas antes do começo do acesso ao EtOH. As barras representam a média \pm EPM. **(A)** Consumo de EtOH em "binge", após 4 horas de acesso à EtOH 20% (n=17-18/grupo). **(B)** Preferência por etanol após 4 horas de acesso à EtOH 20% ((n=17-18/grupo). **(C)** Consumo de água após 4 horas de acesso (n=17-18/grupo).

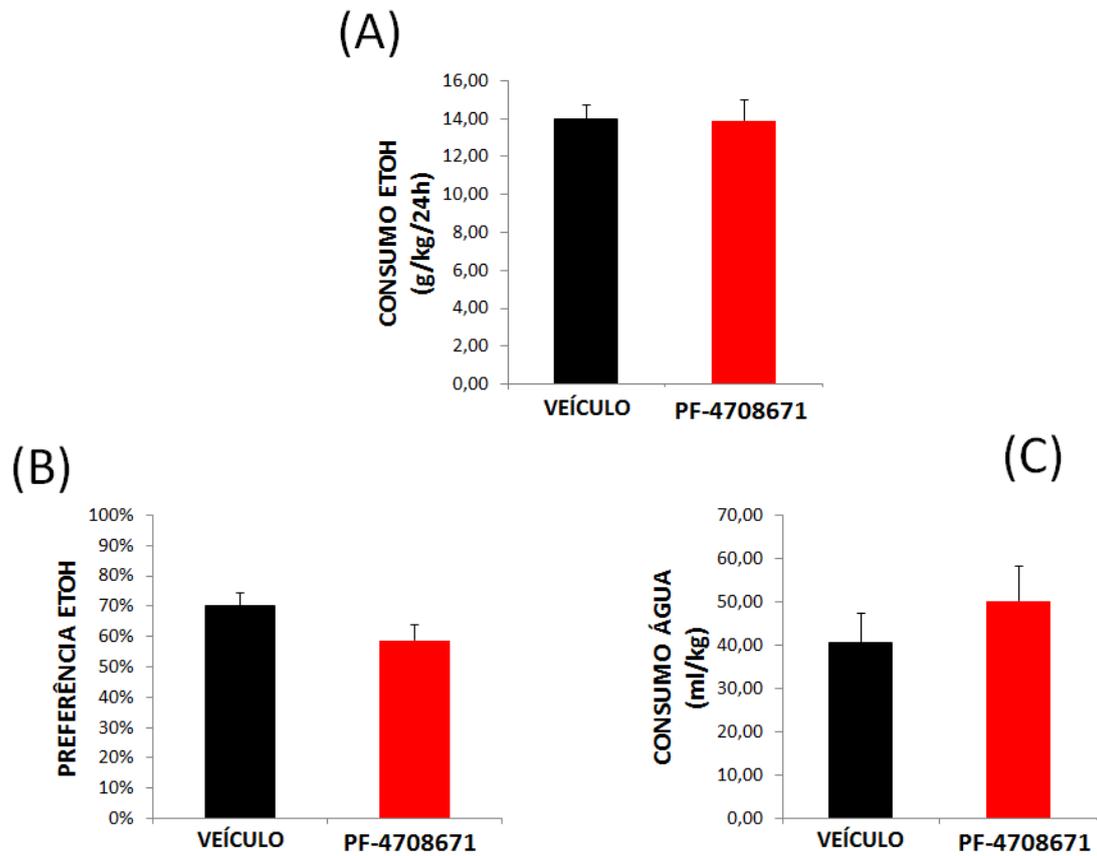


Figura 5. Consumo de etanol 24 horas após tratamento com PF-4708671 (50 mg/kg, i.p.).

Os animais tiveram acesso à EtOH 20% e água durante 24 horas. O tratamento com PF-4708671 foi realizado três horas antes do começo do acesso ao EtOH. As barras representam a média \pm EPM. **(A)** Consumo de EtOH após 24 horas de acesso à EtOH 20% (n=17-18/grupo). **(B)** Preferência por etanol após 24 horas de acesso à EtOH 20% (n=17-18/grupo). **(C)** Consumo de água, após 24 horas de acesso (n=13-16/grupo).

5.3. Administração de 4EGI-1 não alterou o consumo em “Binge” de camundongos

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com 4EGI-1 (50 mg/kg) não alterou o consumo em “binge” ($t_{(27)}=-0,59$, $p>0,05$), a preferência pelo etanol ($t_{(27)}=-0,01$, $p>0,05$) e o consumo de água ($t_{(27)}=-0,22$, $p>0,05$) (**Figura 6**).

Além disso, o tratamento com 4EGI-1 (50 mg/kg) também não alterou o consumo ao término da sessão de acesso ao etanol. Dessa maneira, não foram observadas diferenças significativas nem no consumo de etanol ($t_{(27)}=-0,18$, $p>0,05$), nem para a preferência pelo etanol ($t_{(27)}=-0,35$, $p>0,05$) e nem no consumo de água ($t_{(27)}=0,52$, $p>0,05$) (**Figura 7**).

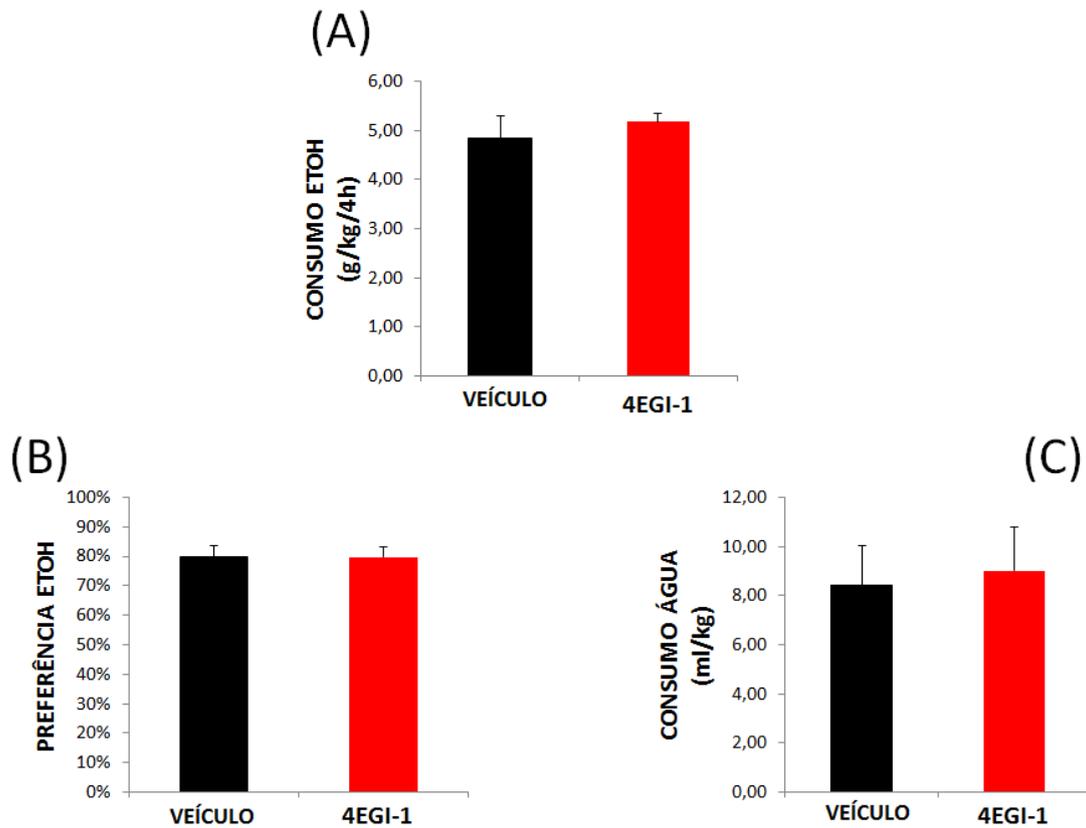


Figura 6. Consumo de etanol em "binge" após tratamento com 4EGI-1 (50 mg/kg, i.p.). Os animais tiveram acesso à EtOH 20% e água durante 4 horas. O tratamento com 4EGI-1 foi realizado três horas antes do começo do acesso ao EtOH. As barras representam a média \pm EPM. **(A)** Consumo de EtOH em "binge", após 4 horas de acesso à EtOH 20% (n=13-16/grupo). **(B)** Preferência por etanol após 4 horas de acesso à EtOH 20% (n=13-16/grupo). **(C)** Consumo de água, após 4 horas de acesso (n=13-16/grupo).

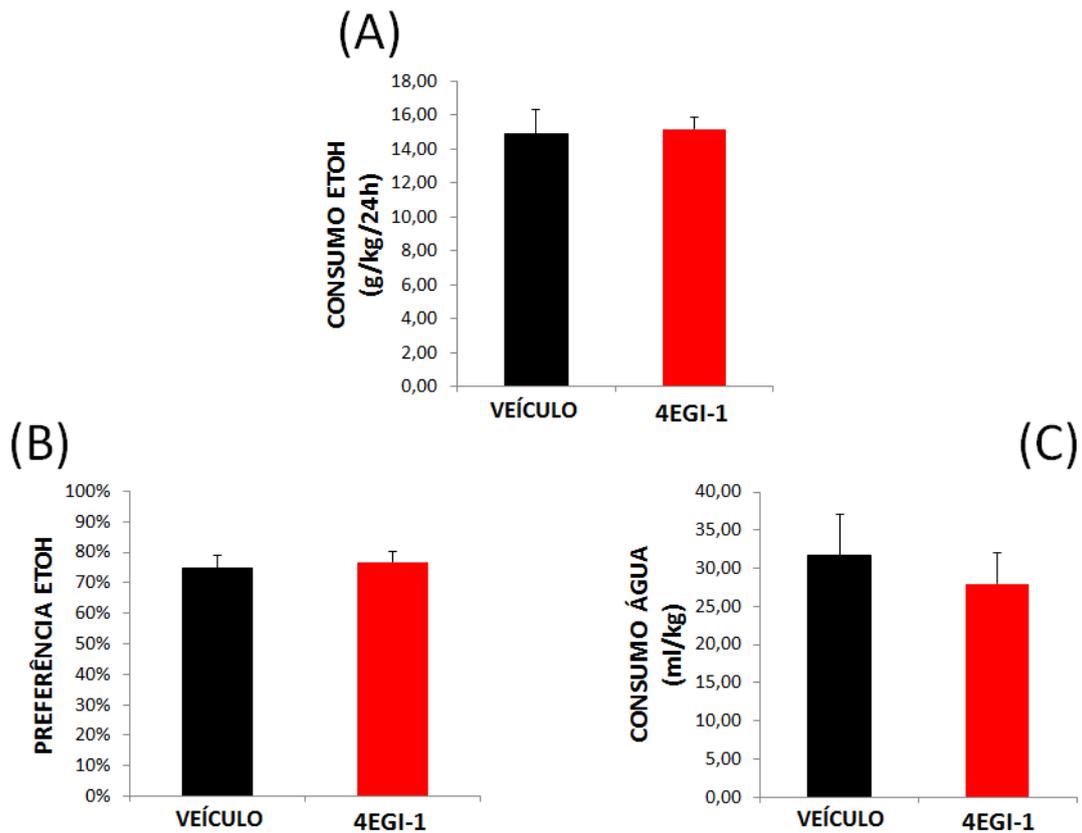


Figura 7. Consumo de etanol em 24 horas após tratamento com 4EGI-1 (50 mg/kg, i.p.).

Os animais tiveram acesso à EtOH 20% e água durante 24 horas. O tratamento com 4EGI-1 foi realizado três horas antes do começo do acesso ao EtOH. As barras representam a média \pm EPM. **(A)** Consumo de EtOH após 24 horas de acesso à EtOH 20% (n=13-16/grupo). **(B)** Preferência por etanol após 24 horas de acesso à EtOH 20% (n=13-16/grupo). **(C)** Consumo de água, após 24 horas de acesso (n=13-16/grupo).

5.4. Administração combinada de PF-4708671 e 4EGI-1 diminuiu o consumo em “Binge” de camundongos

Nossos resultados demonstraram que o tratamento combinado de PF-4708671 e 4EGI-1 (50 mg/kg) diminuiu significativamente o consumo em “binge” ($t_{(27)}=2,29$, $p<0,05$) e a preferência pelo etanol ($t_{(27)}=2,54$, $p<0,05$), e aumentou o consumo de água ($t_{(27)}=-1,98$, $p=0,05$) (**Figura 8**).

Essa diminuição no consumo de etanol desapareceu ao término da sessão de 24 horas de acesso ao etanol. Dessa maneira, não foram observadas diferenças significativas nem no consumo de etanol ($t_{(27)}=0,73$, $p>0,05$), nem para a preferência pelo etanol ($t_{(27)}=1,61$, $p>0,05$) e nem no consumo de água ($t_{(24)}=-1,05$, $p>0,05$) (**Figura 9**).

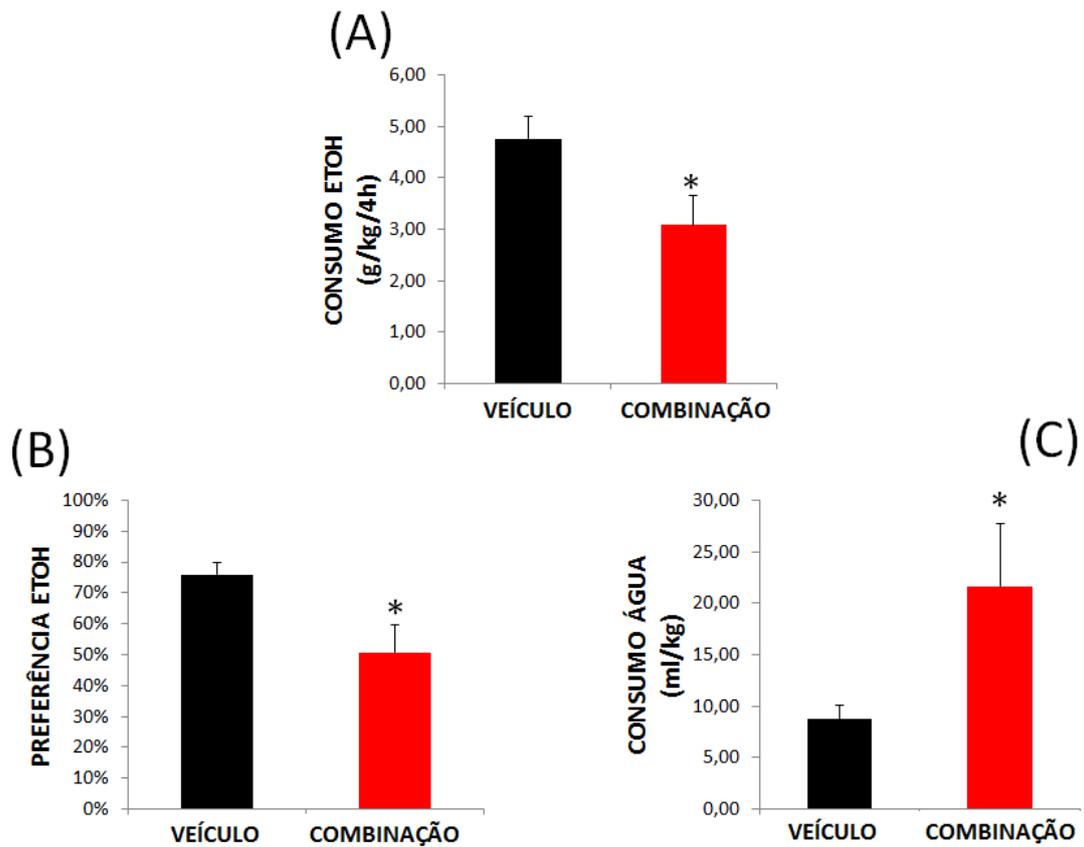


Figura 8. Consumo de etanol em "binge" após tratamento com a combinação de PF-4708671 e 4EGI-1 (50 mg/kg, i.p.). Os animais tiveram acesso à EtOH 20% e água durante 4 horas. O tratamento combinado de PF-4708671 e 4EGI-1 foi realizado três horas antes do começo do acesso ao EtOH. As barras representam a média \pm EPM. **(A)** Consumo de EtOH em "binge", após 4 horas de acesso à EtOH 20% (n=14-15/grupo). **(B)** Preferência por etanol após 4 horas de acesso à EtOH 20% (n=14-15/grupo). **(C)** Consumo de água, após 4 horas de acesso (n=14-15/grupo). * $p < 0.05$: comparado ao grupo veículo.

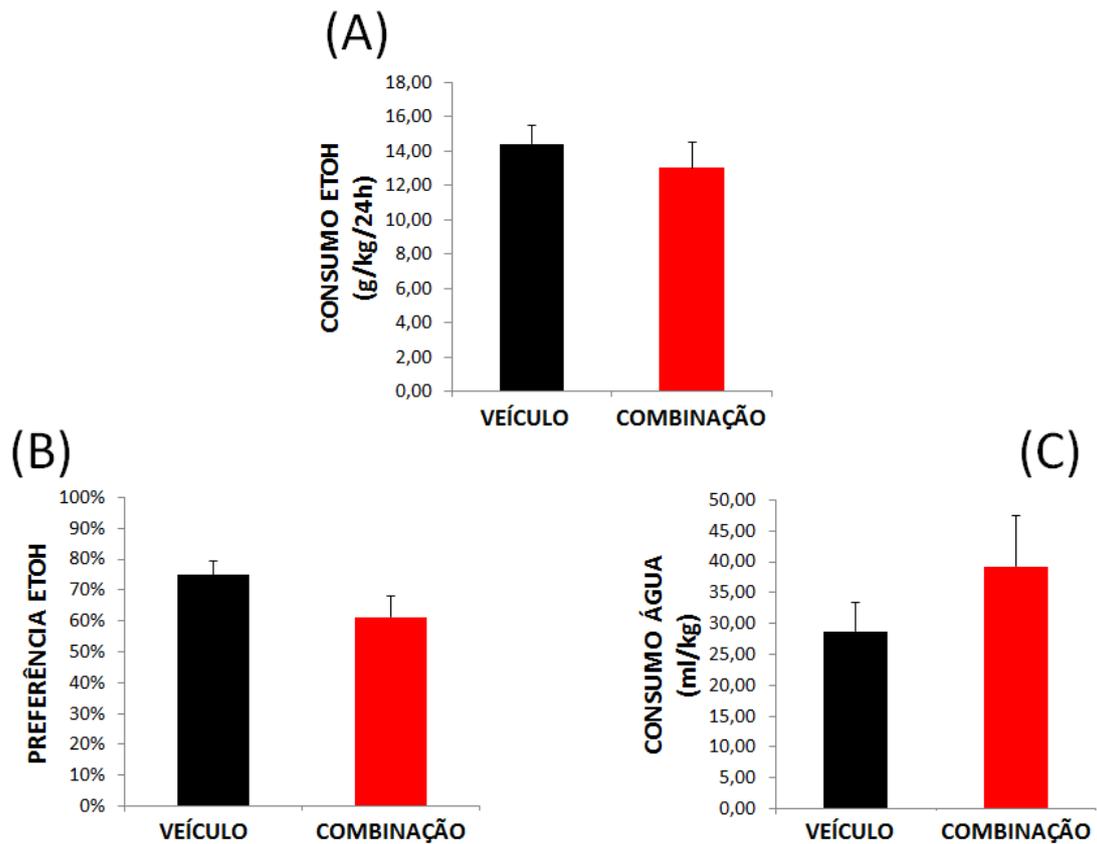


Figura 9. Consumo de etanol em 24 horas após tratamento com a combinação de PF-4708671 e 4EGI-1 (50 mg/kg, i.p.). Os animais tiveram acesso à EtOH 20% e água durante 24 horas. O tratamento com 4EGI-1 foi realizado três horas antes do começo do acesso ao EtOH. As barras representam a média \pm EPM. **(A)** Consumo de EtOH após 24 horas de acesso à EtOH 20% (n=14-15/grupo). **(B)** Preferência por etanol após 24 horas de acesso à EtOH 20% (n=14-15/grupo). **(C)** Consumo de água, após 24 horas de acesso (n=12-14/grupo).

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que o tratamento combinado do inibidor da S6K (PF-4708671) com o inibidor da interação entre eIF4E/eIF4G (4EGI-1) diminuiu o consumo e preferência do etanol em "binge" no acesso intermitente a duas garrafas, sugerindo que, juntos, esses dois componentes da cascata "downstream" da mTORC1 podem estar envolvidos na manutenção da dependência ao etanol.

A dependência de drogas de abuso é caracterizada como sendo uma patologia dos mecanismos relacionados à memória e aprendizado (NEASTA et al., 2010). As plasticidades sinápticas de longa duração e de memórias dependem da formação de novas proteínas e vários estudos têm demonstrado que a mTORC1 está intimamente relacionada com a iniciação sináptica local de síntese de proteínas (NEASTA et al., 2010; COSTA-MATTIOLI e MONTEGGIA, 2013). Dessa maneira, a mTORC1 contribui para a formação, manutenção e consolidação de memórias, inclusive as relacionadas com o abuso do etanol (NEASTA et al., 2010).

Uma vez que a mTORC1 têm sido demonstrada como um componente importante no desenvolvimento da dependência ao etanol no sistema límbico (NEASTA et al., 2010; BARAK et al., 2013; COSTA-MATTIOLI e MONTEGGIA, 2013; NEASTA et al., 2014), diversas alternativas farmacológicas têm sido testadas para estudar se a inibição dessa cascata interfere na busca, consumo e recaída ao etanol.

Um dos fármacos utilizados é a rapamicina (NEASTA et al., 2010; BARAK et al., 2013), que age como um inibidor específico para a mTORC1, inativando sua cascata (NEASTA et al., 2014). Contudo, a rapamicina possui

propriedades imunossupressoras (HARTFORD e RATAIN, 2007), limitando assim seu uso no tratamento da dependência ao etanol. Dessa maneira, como uma tentativa de contornar esse problema, nos últimos anos pesquisadores têm desenvolvido fármacos para o uso de desordens metabólicas com foco no controle traducional (MOERKE et al., 2007; PEARCE et al., 2010), levando ao desenvolvimento de várias moléculas inibidoras da cascata da mTORC1. Pearce et al. (2010) desenvolveram e caracterizaram um inibidor altamente específico da S6K1, chamado PF-4708671, que causa a diminuição da produção de proteínas. No mesmo sentido, Moerke et al. (2007) desenvolveram uma molécula inibidora, chamada 4EGI-1, que especificamente liga-se à proteína eIF4E e interrompe a associação do complexo eIF4E e eIF4G, o que inibe o processo de tradução.

Nossos resultados demonstraram que os tratamentos separados com os inibidores PF-4708671 e 4EGI-1 não alteraram o consumo e preferência de etanol no modelo de acesso intermitente ao etanol em camundongos. Contudo, o tratamento com a associação desses dois inibidores diminuiu significativamente o consumo e preferência ao etanol no "binge", sugerindo que a associação dessas substâncias diminui a busca pelo etanol.

Esses resultados sugerem também que a ativação da mTORC1 pelo etanol ativa cascatas distintas, a S6K e a cascata da 4E-BPs, iniciando processos de tradução e a formação de proteínas, que podem estar envolvidas em neuroplasticidades relacionadas a formação e consolidação de memórias relacionadas com o desenvolvimento da dependência ao etanol, demonstrando ser necessário o bloqueio de ambas as cascatas para que a diminuição do consumo e da preferência ao etanol sejam efetivas.

Assim, de forma semelhante a resultados anteriores que demonstraram que a mTORC1 parece ser sensível somente ao tratamento agudo de rapamicina (NEASTA et al., 2010), o tratamento com ambos os inibidores diminuiu o consumo e preferência de etanol após 4 horas, sem diminuir o consumo de água, demonstrando que o efeito combinado desses fármacos são de curta duração e específicos para o etanol. Provavelmente durante o período de 4 horas houve a interrupção da formação de proteínas relacionadas com a memória de busca ao etanol, o que levou à diminuição da motivação para busca e conseqüentemente diminuição do consumo e preferência pelo etanol. Contudo, o efeito dessas substâncias desaparece após 24 horas, demonstrando que os efeitos são transitórios, talvez devido a rápida metabolização e/ou excreção dessas substâncias. Esse rápido efeito das substâncias faz com que o consumo de etanol após 24 horas retorne ao observado no grupo controle, demonstrando que de fato, mesmo sendo rápido, o bloqueio da cascata da mTORC1 está relacionado com o bloqueio de memórias associativas de motivação e procura pelo etanol, que retornam após a provável metabolização das substâncias.

Nossos resultados demonstram que a associação de PF-4708671 e 4EGI-1 diminuiu o consumo e preferência de etanol, entretanto, outros estudos com diferentes modelos animais (autoadministração, preferência condicionada por lugar, por exemplo) em diferentes tempos (tratamentos crônicos) e em diferentes espécies são necessários para investigar o efeito desses fármacos não somente nos efeitos relacionados ao consumo e preferência de etanol, mas também em modelos relacionados a memórias emocionais, espaciais e de cognição.

6. CONCLUSÃO

O objetivo desse estudo foi investigar o papel das proteínas “*downstream*” da mTORC1, 4E-BP e S6K, no comportamento de busca e consumo excessivo de etanol. Nossos resultados demonstram que o tratamento combinado do inibidor da S6K (PF-4708671) e com o inibidor da interação entre eIF4E/eIF4G (4EGI-1) diminuiu o consumo e preferência do etanol em “binge” no acesso intermitente a duas garrafas, sugerindo que, juntos, esses dois componentes da cascata “*downstream*” da mTORC1 podem estar envolvidos na manutenção da dependência ao etanol.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAK, S.; LIU, F.; HAMIDA, S.B.; YOWELL, Q.V.; NEASTA, J.; KHARAZIA, V.; JANAK, P.H.; RON, D. Disruption of alcohol-related memories by mTORC1 inhibition prevents relapse. *Nat. Neurosci.*, v. 16 (8), p. 1111-1117, 2013.

BUFFINGTON, S.A.; HUANG, W.; COSTA-MATTIOLI, M. Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 37, p. 17-38, 2014.

COSTA-MATTIOLI, M.; SOSSIN, W.S.; KLANN, E.; SONENBERG, N. Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Cell.*, v. 61, p. 10-26, 2009.

COSTA-MATTIOLI, M.; MONTEGIA, L.M. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.*, v. 16 (11), p. 1537-1543, 2013.

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V), 2013. Acesso em: 5 de outubro de 2015.

GINGRAS, A.; RAUGHT, B.; GYGI, S.P.; NIEDZWIECKA, A.; MIRON, M.; BURLEY, S.K.; POLAKIEWICZ, R.D.; WYSLOUCH-CIESZYNSKA, A.; AEBERSOLD, R.; SONENBERG, N. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.*, v. 15, p. 2852-2864, 2001.

HARTFORD, C.M.; RATAIN, M.J. Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin. Pharmacol, Ther.*, v. 82 (4), p. 381-388, 2007.

HILLEMACHER, T.; LEGGIO, L.; HEBERLIN, A. Investigational therapies for the pharmacological treatment of alcoholism. *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, v. 28, p. 1-14, 2014.

HOEFFER, C.A.; COWANSAGEA, K.K.; ARNOLD, E.C.; BANKOD, J.L.; MOERKE, N.J.; RODRIGUEZ, R.; SCHMIDT, E.K.; KLOSI, E.; CHOREV, M.; LLOYD, R.E.; PIERRE, P.; WAGNER, G.; LEDOUX, J.E.; KLANN, E. Inhibition of the interactions between eukaryotic initiation factors 4E and 4G impairs long-term associative memory consolidation but not reconsolidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 108 (8), p. 3383-3388, 2011.

HOLZ, M.K.; BALLIF, B.A.; GYGI, S.P.; BLENIS, J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell.*, v. 123, p. 569-580, 2005.

HUYNH, T.N.; SANTINI, E.; KLANN, E. Requirement of mammalian target of rapamycin complex 1 downstream effectors in cued fear memory reconsolidation and its persistence. *J. Neurosci.*, v. 34 (27), p. 9034-9039, 2014.

KARASOV, O.; OSTACHER, M.J. Alcohol and the law. *Handb. Clin. Neurol.*, v. 125, p. 649-657, 2014.

KOOB, G.F. Negative reinforcement in drug addiction: the darkness within. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 23, p. 559-563, 2013.

MILTON, A.L.; EVERITT, B.J. The persistence of maladaptive memory: Addiction, drug memories and anti-relapse treatments. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 36, p. 1119-1139, 2012.

MOERKE, N.J.; AKTAS, H.; CHEN, H.; CANTEL, S.; REIBARKH, M.Y.; FAHMY, A.; GROSS, J.D.; DEGTEREV, A.; YUAN, J.; CHOREV, M.; HALPERIN, J.A.; WAGNER, G. Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell.*, v. 128 (2), p. 257-267, 2007.

MOST, D.; WORKMAN, E.; HARRIS, R.A. Synaptic adaptations by alcohol and drugs of abuse: changes in micro RNA expression and mRNA regulation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 7 (85), p. 1-10, 2014.

NEASTA, J.; HAMIDA, S.B.; YOWELLA, Q.; CARNICELLA, S.; RON, D. Role for mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in neuroadaptations underlying alcohol-related disorders. *PNAS.*, v. 107 (46), p. 20093-20098, 2010.

NEASTA, J.; BARAK, S.; HAMIDA, S.B.; RON, D. mTOR complex 1: a key player in neuroadaptations induced by drugs of abuse. *J. Neurochem.*, v. 130 (2), p. 172-184, 2014.

PEARCE, L.R.; KOMANDER, D.; ALESSI, D.R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature Reviews: Molecular cell Biology*, v. 11, p. 9-22, 2010.

RAUGHT, B.; PEIRETTI, F.; GINGRAS, A.; LIVINGSTONE, M.; SHAHBAZIAN, D.; MAYEUR, G.L.; POLAKIEWICZ, R.D.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J.W.B. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *The EMBO Journal.*, v. 23, p. 1761-1769, 2004.

RICHTER, J.D.; KLANN, E. Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation. *Genes Dev.*, v. 23 (1), p. 1-11, 2009.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Rev.*, v. 18 (3), p. 247-291, 1993.

SINHA, R.; FOX, H.C.; HONG, K.I.; HANSEN, J.; TUIT, K.; KREEK, M.J. Effects of adrenal sensitivity, stress- and cue-induced craving, and anxiety on subsequent alcohol relapse and treatment outcomes. *Arch. Gen Psychiatry.*, v. 68 (9), p. 942-952, 2011.

STEENSLAND, P.; SIMMS, J.A.; HOLGATE, J.; RICHARDS, J.K.; BARTLETT, S.E. Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist,

selectively decreases ethanol consumption and seeking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 104 (30), p. 12518-12523, 2007.

VON DER GOLTZ, C.; VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; PERREAU-LENZ, S.; PAWLAK, C.R.; KIEFER, F.; SPANAGEL, R. Cue-induced alcohol-seeking behaviour is reduced by disrupting the reconsolidation of alcohol-related memories. *Psychopharmacology (Berl)*., v. 205 (3), p. 389-397, 2009.

WANG, M.; PANASYUK, G.; GWALTER, J.; NEMAZANYI, I.; FENTON, T.; FILONENKO, V.; GOUT, I. Regulation of ribosomal protein S6 kinases by ubiquitination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 369, p. 382-387, 2008.

WISE, R.A. Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. *Psychopharmacologia*, v. 29 (3), p. 203-210, 1973.

WOO, S.; KIM, D.; JUN, C.; KIM, Y.; HAAR, E.V.; LEE, S.; HEGG, J.W.; BANDHAKAVI, S.; GRIFFIN, T.J.; KIM, D. PRR5, a novel component of mtor complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor β expression and signaling. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282 (35), p. 25604-25612, 2007.