



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

MARINUS VAN LEEUWEN

**EFEITOS LONGITUDINAIS DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA
NA ADOLESCÊNCIA EM UM MODELO DE TRANSTORNO
POR USO DE ÁLCOOL EM RATOS WISTAR
ADULTOS MACHOS E FÊMEAS**

Londrina
2025

MARINUS VAN LEEUWEN

**EFEITOS LONGITUDINAIS DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA
NA ADOLESCÊNCIA EM UM MODELO DE TRANSTORNO
POR USO DE ÁLCOOL EM RATOS WISTAR
ADULTOS MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de
Londrina para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Célio Roberto Estanislau.
Coorientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa.

Londrina
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L487e Leeuwen, Marinus van.
Efeitos longitudinais da intoxicação alcoólica na adolescência em um modelo de
Transtorno por Uso de Álcool em ratos Wistar adultos machos e fêmeas / Marinus
van Leeuwen. - Londrina, 2025.
74 f. : il.

Orientador: Célio Roberto Estanislau.

Coorientador: Ernane Torres Uchôa.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, 2025. Inclui bibliografia.

1. Adolescência - Tese. 2. Transtorno por Uso de Álcool - Tese. 3. Consumo
operante - Tese. 4. Intoxicação - Tese. I. Estanislau, Célio Roberto. II. Uchôa,
Ernane Torres. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da
Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 61

MARINUS VAN LEEUWEN

**EFEITOS LONGITUDINAIS DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA
NA ADOLESCÊNCIA EM UM MODELO DE TRANSTORNO
POR USO DE ÁLCOOL EM RATOS WISTAR
ADULTOS MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de
Londrina para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Célio Roberto Estanislau
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profª. Dra. Gláucia Maria Bressan
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Prof. Dr Fábio Leyser Gonçalves
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Londrina, 19 de setembro de 2025.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos foram a última parte a ser redigida para esta dissertação. De fato, ela reflete não somente o período do mestrado, mas sim as diversas pessoas, experiências e afetos que me trouxeram até o dia de hoje. Portanto, optei por fazer algo sucinto apenas para marcar, no âmbito físico, algo que talvez um dia memória já não consiga recuperar.

Nada mais justo do que iniciar mencionando o meu orientador, Célio, que promoveu, ao longo de mais de meia década, diferentes oportunidades para que eu pudesse amadurecer enquanto pessoa e profissional. Ainda no âmbito da docência, outras (muitas) personagens fizeram e fazem parte dessa história. Dentre essas figuras, gostaria de ressaltar o papel da minha primeira orientadora de Iniciação Científica, Cassiana Stersa Versoza-Carvalho, que me acolheu ainda no início da graduação em Psicologia. Também agradeço, aqui, a função fundamental que os antigos coordenadores do Serviço de Aconselhamento Genético da UEL, Renata Grossi e Wagner Paiva (*in memoriam*), tiveram no meu desenvolvimento profissional. Registro, ainda, a influência que a professora Karina Possa Abrahão teve sobre minha formação crítica enquanto pesquisador, me permitindo aprimoramento excepcional no âmbito dos modelos, métodos e discussões sobre o uso de álcool. Finalmente, deixo meus agradecimentos, de maneira coletiva, a todos os docentes do PPG em Ciências da Saúde e da especialização em Estatística com ênfase em pesquisa quantitativa da UEL pelos diferentes ensinamentos.

Quanto aos amigos, felizmente a vida me afortunou com diferentes pessoas nos mais diversos lugares, cidades e instituições em que passei. Eles foram pilar central que me sustentou ao longo da trajetória, especialmente, mas não só, durante o mestrado. De maneira breve, agradeço a todos que ingressaram em diferentes momentos na minha história, dos quais destaco a infância e adolescência, o período pré-vestibular e, finalmente, meu tempo em Londrina. Apesar de breve, diversos nomes, rostos, jeitos, histórias e afetos estão por trás deste singelo parágrafo, sobre o qual não me prolongarei pois se trata de uma tarefa impossível para este espaço.

Por fim, recorrentemente atribuímos ao orientador o último reconhecimento em frutos acadêmicos. Eis que utilizarei este derradeiro parágrafo para agradecer à minha família, cujos membros foram os primeiros guias nesta história e até hoje me provém suporte e ensinamentos.

Muito obrigado!

*Since all models are wrong
the scientist must be alert to
what is importantly wrong.
George E. P. Box (1976)*

RESUMO

LEEUEWEN, M.V.; UCHÔA, E.T.; ESTANISLAU, C.R.. **Efeitos longitudinais da intoxicação alcoólica na adolescência em um modelo de transtorno por uso de álcool em ratos Wistar adultos machos e fêmeas**. 2025. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

Introdução: A exposição pesada ao álcool na adolescência já foi associada a desfechos negativos na vida adulta, incluindo aumento do risco de desenvolver Transtorno por Uso de Álcool (TUA). Embora pesquisas pré-clínicas tenham contribuído para o entendimento dessas consequências a longo prazo, muitos estudos não incorporaram características importantes do TUA em seus modelos, como diferenças sexuais, protocolos de consumo voluntários e desenhos experimentais de alta replicabilidade. O presente estudo teve como objetivo suprir essas lacunas, avaliando os efeitos a longo prazo da intoxicação alcoólica na adolescência sobre comportamentos tipo TUA em ratos Wistar adultos de ambos os sexos. **Método:** 110 ratos Wistar (55 machos e 55 fêmeas) foram divididos em oito grupos de acordo com as variáveis: (1) sexo (masculino ou feminino), (2) intoxicação alcoólica na adolescência (expostos ou não expostos) e (3) exposição ao álcool na fase adulta (expostos ou não expostos). O primeiro protocolo ocorreu entre os dias pós-natais (DPN) 30 e 48, período em que os ratos receberam solução alcoólica a 3,5 g/Kg via intraperitoneal (i.p.). Foram avaliadas a latência e a duração da Perda do Reflexo Postural (LORR). Ao término do protocolo, os animais foram submetidos a aproximadamente três semanas de privação de álcool. No DPN 72, o consumo voluntário de álcool e água foi avaliado por meio do protocolo *Two-bottle choice* (TBC) por cerca de cinco semanas (total de 14 sessões). Os ratos foram colocados em gaiolas individuais por 24 horas, com uma garrafa contendo água potável e outra com solução alcoólica a 20% v/v em água potável. Após o término do TBC, o comportamento de pressão à barra foi modelado para autoadministração operante de álcool. Quando a resposta-alvo foi selecionada, os animais passaram por 10 sessões do protocolo de esvanecimento de sacarose (*sucrose fading*). Posteriormente, ocorreu a fase de testes, composta por cinco sessões de autoadministração operante de álcool. Os ratos foram privados de álcool para avaliação dos efeitos tipo abstinência no labirinto elevado em cruz (EPM) e em uma sessão única de autoadministração de álcool. O método de clusterização Fuzzy C-Means foi aplicado para avaliar possíveis subgrupos mais susceptíveis ao consumo de álcool. **Resultados:** Os ratos apresentaram aumento da sensibilidade aos efeitos do álcool no protocolo LORR. Os resultados do TBC indicaram que a exposição alcoólica na adolescência pode aumentar a preferência e o consumo de álcool na vida adulta. Foi observada diferença significativa entre os sexos na autoadministração operante de álcool. A exposição alcoólica na adolescência também foi associada a prejuízos na avaliação de risco no EPM. As análises provenientes da clusterização sugeriram a existência de subgrupos com maior motivação para o consumo operante de álcool. O tratamento LORR alterou o peso corporal no grupo que recebeu álcool na adolescência. Ratos machos exibiram crescimento compensatório (*catch-up*), recuperando o peso típico na fase adulta, enquanto as fêmeas não apresentaram tal recuperação. **Conclusão:** A exposição intensa ao álcool durante o início da adolescência pode gerar consequências duradouras na vida adulta, aumentando comportamentos semelhantes ao TUA, particularmente em subgrupos de animais.

Palavras-chave: Wistar, Adolescência; Transtorno por Uso de Álcool; Comportamento Operante; Lorr.

ABSTRACT

LEEUWEN, M.V.; UCHÔA, E.T.; ESTANISLAU, C.R.. **Heavy adolescent alcohol exposure in Wistar rats long-term adult outcomes and sex-specific effects in an alcohol use disorder model.** 2025. 74p. Master's Thesis (Master in Science in Computer Science) – State University of Londrina, Londrina, 2025.

Background: Heavy alcohol exposure in early to mid adolescence has been associated with long-term negative outcomes in adulthood, including as augmented risk of Alcohol Use Disorder (AUD). Although preclinical research has improved the understanding of these consequences, many studies have not incorporated key features of AUD in their models, such as sex differences, voluntary protocols, and highly replicable experimental designs. The present study aimed to address these gaps by evaluating the long-term effects of adolescent alcohol intoxication on AUD-like behaviors in adult female and male Wistar rats. **Methods:** 110 Wistar rats (55 males and 55 females) were divided into eight groups according to the variables (1) sex (male or female), (2) adolescent alcohol intoxication (exposed or unexposed), and (3) adult alcohol exposure (exposed or unexposed). The first protocol occurred between PND 30 and 48. Rats received 3.5g/Kg alcohol solution intraperitoneally (I.P.). The latency and duration of the Loss of Righting Reflex (LORR) were further assessed. At the end of the protocol, rats were subjected to roughly 3 weeks of alcohol deprivation. At PND 72, voluntary alcohol and water consumption were evaluated with a Two-bottle choice protocol for around 5 weeks (total of 14 sessions). Rats were placed in individual cages for 24h with one bottle of tap water and one bottle of 20% v/v alcohol solution. After the end of TBC, bar press response was modeled for alcohol operant self-administration. When the aimed response was acquired, rats undergo 10 sessions of sucrose fading protocol. Subsequently, the test phase occurred for a total of five alcohol operant self-administration sessions. Rats were deprived to determine the abstinence-like effects in the elevated plus maze (EPM) and in a single alcohol self-administration session. Fuzzy C-Means clustering was applied to evaluate possible subgroups. **Results:** Rats exhibited increasing sensitivity to alcohol effects in the LORR protocol. TBC results indicated adolescent alcohol exposure may increase alcohol preference and consumption. A significant sex difference was observed in operant self-administration of alcohol. Adolescent alcohol exposure was also linked to impaired risk assessment in the EPM. Clustering analyses suggested the existence of subgroups with heightened motivation for operant alcohol consumption. LORR treatment altered body weight in the alcohol-administered group. Male rats exhibited a catch-up growth, regaining typical weight in adulthood, whereas females did not. **Conclusion:** Heavy alcohol exposure during early adolescence may produce lasting consequences in adulthood, enhancing AUD-like behaviors, particularly in a subgroup of animals.

Key-words: Wistar, Adolescence, Alcohol Use Disorder; Operant Behavior, Lorr.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Molécula do etanol ⁸	16
Figura 2 -	Vias oxidativas do metabolismo do álcool. A conversão do álcool em acetaldeído pode resultar na geração de subprodutos nocivos, como no caso do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). O acetaldeído é convertido em acetato pelo aldeído desidrogenase (ALDH). Por fim, o acetato pode ser utilizado no metabolismo energético nas mitocôndrias ¹³	17
Figura 3 -	Diagrama simplificado da organização das principais vias do circuito cortico-estriato-talamo-cortical.....	19
Figura 4 -	Marcos do neurodesenvolvimento no Sistema Nervoso Central (SNC) de ratos e humanos. Os picos de cada processo do neurodesenvolvimento estão indicados pela porção mais larga da linha ⁴⁸	25
Figura 5 -	Esquematização do DBC completo e não balanceado do estudo. Abaixo de cada bloco, consta a data de início do experimento. Nota-se a relação de dependência hierárquica, que pode ser descrita como: observações agrupadas no nível “sujeitos” , que por sua vez estão agrupados dentro do nível “blocos” . A quantidade de sujeitos por bloco se refere ao número de animais que prosseguiram até o fim do experimento. Animais eventualmente excluídos durante os protocolos não estão representados.....	30
Figura 6 -	Delineamento experimental simplificado (sem considerar a variável sexo).....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
BD	<i>Binge-drinking</i>
CAT	Compartimento de água total
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DBC	Delineamento em bloco casualizado
DSM-V-TR	Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, 5ª edição, texto revisado
EPM	Labirinto em Cruz Elevado
FCM	Fuzzy C-Means
GAM	Modelos Aditivos Generalizados
GAMLSS	Modelos Aditivos Generalizados de Localização, Escala e Forma
GEE	Equações de estimativa generalizada
GLMM	Modelo Linear Generalizado Misto
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
HED	Beber episódico pesado ou <i>heavy episodic drinking</i>
HID	<i>High-intensity drinking</i>
I.P.	Injeção Intraperitoneal
LORR	<i>Loss of Righting Reflex</i>
MSN	Neurônios espinhosos médios
NB	Núcleos da base
PFC	Córtex pré-frontal
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SNpr	Substância Negra <i>pars reticulata</i>
TBC	<i>Two-bottle choice</i>
TUA	Transtorno por Uso de Álcool
VTA	Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O álcool.....	14
1.1.1	Características físico-químicas.....	16
1.1.2	Farmacocinética do álcool.....	16
1.1.3	Farmacodinâmica do álcool	18
1.2	Epidemiologia do uso de álcool - Mundo e Brasil	20
1.3	Implicações do uso de álcool no período da adolescência.....	24
1.4	Problemática	26
2	OBJETIVOS	28
2.1	Geral	28
2.2	Específicos	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Roedores	30
3.2	Droga e método de preparo	31
3.3	<i>Loss of Righting Reflex (LORR)</i>.....	31
3.4	<i>Two-bottle choice (TBC)</i>.....	33
3.5	Autoadministração de álcool	33
3.5.1	Modelagem.....	34
3.5.2	Protocolo de sucrose fading	35
3.5.3	Fase de testes	35
3.5.4	Efeitos comportamentais da privação ao etanol	35
3.5.5	Labirinto em Cruz Elevado (EPM)	36
3.5.6	Reteste autoadministração	36
3.5.7	Eutanásia	37
3.5.8	Análise estatística	37
3.5.8.1	<i>Pré-tratamento dos dados</i>	<i>38</i>
3.5.8.2	<i>Definição dos grupos</i>	<i>38</i>
3.5.8.3	<i>Análise exploratória</i>	<i>39</i>
3.5.8.4	<i>Testes de normalidade</i>	<i>39</i>
3.5.8.5	<i>Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM)</i>	<i>39</i>

3.5.8.6	<i>Modelos Aditivos Generalizados de Locação, Escala e Forma (GAMLSS)</i>	42
3.5.8.7	<i>Fuzzy C-Means clustering</i>	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	72
	ANEXO A - Of. Circ. CEUA no 042/2023	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 O álcool

O uso de álcool, também chamado de etanol ou álcool etílico, remonta há milênios na história da humanidade. Essa prática provavelmente surgiu de modo acidental, algo que tardiamente foi alterado com o domínio de processos de fermentação de alimentos ricos em certos nutrientes. As aplicações dessa substância são múltiplas. De modo geral, o álcool pode ser utilizado como conservantes, solventes industriais, combustíveis alternativos aos derivados de petróleo e, por fim, na forma de bebidas alcoólicas¹.

Curiosamente, a história entre humanos e o álcool não aparenta ser exclusiva no reino animal. Ela é compartilhada com outros mamíferos, aves e, até mesmo, insetos. Há relatos na literatura, de modo abrangente — não somente científica —, de elefantes, babuínos, girafas, chimpanzés, aves, entre outras espécies, apresentando comportamentos relativos à embriaguez. Inclusive, aparentemente, esse é mais um traço evolutivo que humanos compartilham com outros animais: a ebriedade².

Dentre os relatos da “bebedeira” no reino animal, é relativamente comum o consumo de frutas com teor alcoólico por diferentes espécies. Uma das mais conhecidas talvez seja a marula, presente no sul do continente africano. No ambiente natural, essa fruta de cor amarela e cerca de 4 cm entra em processo de fermentação após cair dos galhos da árvore e a fauna local, incluindo seres humanos, a consome. Há destaque especial para os elefantes, pois são os figurantes principais de diferentes histórias de embriaguez na região envolvendo essa fruta. A marula tornou-se conhecida, entre humanos, por sua fermentação alcoólica principalmente por conta do licor produzido a partir dela, o licor de Amarula².

Além desses grandes mamíferos, há também estudos envolvendo animais voadores, como borboletas, morcegos e diversos pássaros. Uma característica peculiar a essas espécies, em comparação às terrestres, é a de que a ebriedade gerada pelo consumo excessivo de álcool proveniente de frutas e néctar pode incapacitá-los de voar. Isso apresenta um risco substancial a esses seres vivos, dado que os expõe a uma gama de ameaças de predadores².

Dentre esses animais voadores, os grandes morcegos do Deserto de Negev, em Israel, evitam consumir soluções que contenham mais de 1% de álcool. Essa característica é indicativa de uma história de seleção natural nessa espécie. Os morcegos com paladar mais sensível ao álcool tiveram vantagem evolutiva frente a seus pares, provavelmente

por se exporem menos a situações de risco. Esse fenômeno é indicativo de que, apesar do consumo de álcool ser recorrente em diferentes espécies, comportamentos diferentes relacionados ao uso dessa substância podem ter sido selecionados em cada espécie².

Como supracitado, os primeiros relatos do consumo de bebidas alcoólicas por humanos datam de milênios atrás, possivelmente ainda durante o período Neolítico (5000 a.C.), em diferentes culturas e sociedades, tais como as do Oriente Médio, Europa Ocidental e leste asiático^{3,4}. O principal meio de obtenção dessas bebidas é a fermentação alcoólica. Esse processo pode ser basicamente entendido como a oxidação de componentes orgânicos, especialmente carboidratos, que resulta na geração do álcool como um de seus principais bioprodutos. Esse é o modo de produção de bebidas alcoólicas mais amplamente empregado no mundo⁵.

A produção do álcool normalmente também conta com a presença de leveduras que realizam as reações químicas da fermentação alcoólica. Dentre elas, destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*, que, em ambiente anaeróbico, é capaz de oxidar diferentes açúcares e produzir álcool, entre outros componentes⁶. Por fim, o substrato utilizado na reação de oxidação pode ser composto por uma gama de produtos orgânicos. Isso permite a produção de bebidas alcoólicas com diferentes teores alcoólicos e características físicas, como gosto, cheiro e aparência. A escolha do substrato também tem forte influência de traços culturais. Por ora, evidencia-se a produção de cerveja a partir da cevada; o saquê com o uso de arroz; a vodca, com a oxidação de batatas e, por fim, o vinho, tendo as uvas como substrato⁵.

Tem-se que a relação entre humanos e bebidas alcoólicas é vasta e de longa data. Curiosamente, assim como no exemplo dos morcegos do Deserto de Negev, também é possível tecer relações entre comportamentos de consumo de álcool e polimorfismos genéticos em humanos. Evidências em populações humanas já apontaram para a relação entre as isoformas da álcool desidrogenase e o risco para o desenvolvimento do consumo abusivo do álcool⁷.

Apesar disso, no caso humano, é difícil tecer uma relação clara de causalidade entre a existência, por seleção natural, de variações alélicas dessa enzima com o comportamento de consumo de álcool, semelhante ao que ocorre com os morcegos mencionados. Mesmo assim, o fato essencial dessa comparação é ressaltar como a heterogeneidade genética em humanos exerce função importante nos comportamentos de consumo de bebidas alcoólicas, importante para o desenvolvimento do Transtorno por Uso de Álcool (TUA). Por fim, ressalta-se que o uso dessa substância não é exclusividade humana, sendo característica presente em múltiplos seres vivos.

1.1.1 Características físico-químicas

O etanol é uma substância volátil e inflamável composta pela molécula C_2H_6O e tem peso molecular de 46,07 g/mol. Uma das principais características dessa molécula é a presença do grupo funcional hidroxila (-OH) em sua composição⁸ (Figura 1). Há muito, já foi descrito que essa ligação à cadeia de hidrocarbonetos torna a molécula solúvel em água, fato importante do ponto de vista biológico⁹.

O ponto de ebulição do etanol é de aproximadamente 78°C, enquanto o ponto de fusão é de cerca de -114°C. Já o ponto de fulgor dessa molécula é por volta de 14°C. Tem densidade na ordem de 0,79 g/cm³ a temperatura ambiente (25°C). Possui viscosidade de 1,074 mPa*s a 25°C, semelhante à água. A tensão superficial do etanol é de 21,97 mN/m (25°C), consideravelmente menor que a da água (71,97 mN/m à 25°C). Quando solubilizado a aproximadamente 95% em água, forma uma mistura azeotrópica com ponto de ebulição constante. A altíssima solubilidade do etanol em água permite a formação de solução homogênea. Além disso, ele é miscível com diversos outros solventes orgânicos, como éter, clorofórmio, benzeno e acetona⁸.

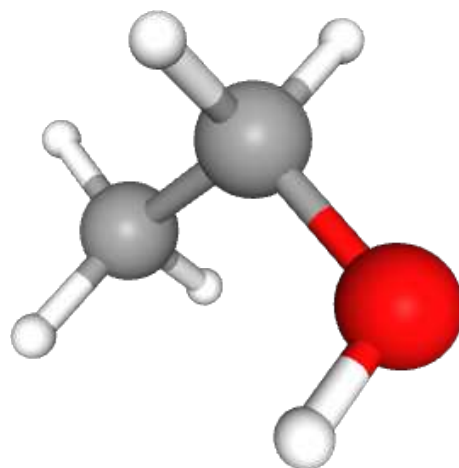


Figura 1 – Molécula do etanol⁸.

A aparência física do etanol, à temperatura ambiente, é a de um líquido incolor, claro e de baixa viscosidade, móvel, semelhante à água. Possui cheiro vínico e característico, com gosto pouco palatável e ardido⁸.

1.1.2 Farmacocinética do álcool

Um dos pontos-chave para a compreensão dos efeitos de uma droga em um organismo é entender a farmacocinética dessa substância. Pode-se entender a farmacocinética pelo estudo dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco (ou droga). Esses quatro aspectos determinam se essa molécula será capaz de exercer um efeito fisiológico em seu sítio-alvo¹⁰.

Devido às propriedades físico-químicas, especialmente quanto à sua estrutura polar e altamente solúvel em água, bem como seu pequeno tamanho molecular, a absorção do álcool ocorre principalmente por meio da difusão simples pela membrana celular. Os principais locais de absorção do etanol administrado oralmente são, respectivamente, duodeno, jejuno e estômago. O conteúdo estomacal pode influenciar nesse processo, sendo a presença de alimentos um entrave para a rápida absorção dessa

molécula¹¹. Somado a isso, uma pequena parte do etanol ingerido pode ser metabolizada, durante a absorção, pelas enzimas gástricas ADH1C * 1/*1 e ADH1C * 2/*2¹².

Quanto à distribuição, após ser absorvido no estômago e intestino, o álcool chega ao fígado via circulação porta-hepática. Uma vez no fígado, o álcool será metabolizado por três vias enzimáticas: (1) álcool desidrogenase (ADH), (2) catalase e (3) CYP2E1 (microsomal), que caracterizam o mecanismo de metabolismo de primeira passagem mais importante do álcool (Figura 2). A ADH compõe a principal via de oxidação do álcool em acetaldeído, sendo esse último metabolizado em acetato pela aldeído desidrogenase (ALDH). O acetato resultante poderá ser utilizado no ciclo de Krebs, completando a transformação do álcool. Em baixas concentrações de etanol no organismo, a catalase e a CYP2E1 apresentam participação negligenciável no metabolismo. Entretanto, em circunstâncias de alta concentração, é possível que elas tenham uma atividade maior^{13,14}.

Após isso, o sangue contendo álcool chega às veias hepáticas e cava, as quais o levam ao coração. A partir disso, ele segue aos pulmões, de volta ao coração e, por fim, atinge toda a circulação sistêmica, alcançando os meios intra e extracelulares. A quantidade de etanol distribuído aos tecidos depende da capilaridade e fluxo sanguíneo. Assim, tecidos como encéfalo, fígado e rins atingem equilíbrio nas concentrações entre água e álcool rapidamente. Essa droga é capaz de se distribuir por todo o compartimento de água total (CAT) do organismo, mantendo concentrações mais altas nos biofluidos, como o sangue. Esse aspecto é importante, visto que há diferenças sexuais no volume do CAT entre machos e fêmeas. Para uma mesma dose/Kg corporal de álcool, é possível que as fêmeas atinjam aproximadamente 15% de concentração alcoólica sérica a mais do que os machos¹⁵.

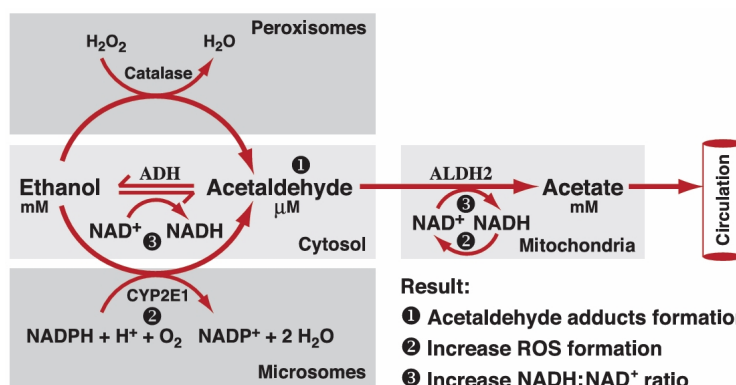


Figura 2 – Vias oxidativas do metabolismo do álcool. A conversão do álcool em acetaldeído pode resultar na geração de subprodutos nocivos, como no caso do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). O acetaldeído é convertido em acetato pela aldeído desidrogenase (ALDH). Por fim, o acetato pode ser utilizado no metabolismo energético nas mitocôndrias¹³.

Como já citado anteriormente (Figura 2), o principal responsável pelo metabolismo do álcool é o fígado por meio das três vias descritas. Além disso, a transformação dessa droga também ocorre, em menor magnitude, no encéfalo. Nessa região, a ca-

talase e a CYP2E1 aparentam ter papel mais significativo quando comparadas à ADH no fígado. Elas constituem as principais vias metabólicas do álcool no sistema nervoso central¹⁴. Em animais pequenos, o metabolismo do álcool é mais rápido em comparação a em humanos. Por exemplo, essa diferença pode chegar a ser de até cinco vezes em camundongos¹¹.

Por fim, a excreção do álcool acontece principalmente pela oxidação da molécula em acetaldeído e, depois, em acetato. A via oxidativa corresponde a pelo menos 90% da excreção de todo o etanol consumido, sendo o restante eliminado diretamente pela urina, respiração e suor¹⁵.

1.1.3 Farmacodinâmica do álcool

A farmacodinâmica busca descrever os efeitos de um fármaco no organismo. Para isso, utiliza-se análises quantitativas para determinar faixas de doses e caracterizar os respectivos efeitos da interação fármaco-receptor¹⁰. Por conta das características físico-químicas do álcool, essa molécula é capaz de interagir com múltiplos sítios de ligação em tecidos variados de um organismo. As principais vias de atuação do álcool na modulação do comportamento acontecem por sua atuação no encéfalo. Portanto, o foco da descrição da farmacodinâmica dessa substância será em seus efeitos centrais.

No sistema nervoso central (SNC), o álcool atua em uma amplitude de mecanismos diferentes. Uma revisão recente¹⁶ indicou que essas vias englobam predisposições genéticas, alterações epigenéticas, atividade transcricional, a ocorrência de splicing alternativo, tradução e modificações pós-traducionais de proteínas e, por fim, mudanças a nível de funcionamento da circuitaria neuronal. Em última instância, todas essas mudanças resultam na alteração do funcionamento do SNC principalmente por vias de neuroplasticidade, podendo alterar até mesmo a excitabilidade intrínseca dos neurônios¹⁷.

Em relação à circuitaria alterada pelo álcool Figura 3, a principal hipótese é de que ele altera o funcionamento dos Núcleos da Base (NB). Essa região é altamente conservada entre os animais vertebrados, fato que indica sua importância adaptativa. Apesar de cerca de 560 milhões de anos separarem as lampreias, que constituem os vertebrados filogeneticamente mais distantes dos mamíferos, dos humanos, nota-se que os NB dessas duas espécies têm regiões e funcionamento análogos¹⁸. Em ambos os casos, bem como em diversos outros vertebrados, nota-se que esse conjunto de neurônios exerce controle sobre os comportamentos, especialmente no que tange à seleção de ações. A maior complexidade do repertório comportamental existente nos mamíferos, em comparação às lampreias, possivelmente envolve um processo de exaptação dos NB por meio de sua integração a regiões anatômicas evolutivamente mais recentes, como o córtex cerebral^{19,20}.

Tendo em vista o perfil evolutivo altamente conservado dos NB, bem como suas

conexões corticais, é necessário aprofundar a discussão quanto aos meios pelos quais essas regiões selecionam os diferentes comportamentos dos vertebrados. Há diversos loopings que coordenam as conexões córtico-estriato-tálamo-cortical no SNC. O estriado ocupa uma posição central nos NB por ser a principal região receptora de projeções neuronais. Ele é composto, em sua grande maioria, por neurônios inibitórios GABAérgicos que projetam as informações downstream por meio de duas vias: a direta e a indireta. Os neurônios que compõem essas duas vias são chamados de neurônios espinhosos médios (MSN), que se diferenciam por projetarem para o GPe ou para a Substância Negra pars reticulata (SNpr) e para o GPi. Respectivamente, essas vias são chamadas de indireta (MSNi) e direta (MSNd)²⁰.

Acrescenta-se, também, que os MSN diferem quanto à expressão de receptores dopaminérgicos de acordo com a via. Esses receptores são metabotrópicos e estão acoplados a uma proteína G, exercendo, assim, efeito indireto sobre a polaridade da membrana. Enquanto os MSNd expressam receptores dopaminérgicos do tipo 1 (D1r), que são acoplados a uma proteína estimulatória Gs, os MSNi se encontram ligados a uma proteína inibitória Gi²¹.

A principal fonte de projeções dopaminérgicas aferentes no estriado provém do mesencéfalo. Notoriamente, os neurônios dessas projeções se originam na Área Tegmental Ventral (VTA) e na Substância Negra pars compacta (SNc). Ambas atuam na modulação da sinalização dos NB²⁰. De modo geral, os MSNd atuam na ativação comportamental, enquanto os MSNi têm papel inibitório²¹. Por fim, ainda há uma terceira via importante de sinalização nos NB, a hiperdireta, que tem projeções excitatórias provenientes do córtex diretamente para o Núcleo Subtalâmico. Essa via, por sua vez, aparenta promover a inibição de programas motores já em andamento²². Ainda há outras conexões e loopings que não foram descritos aqui.

Considerando o funcionamento e organização dos NB, o álcool exerce seus efeitos comportamentais por meio de interações de baixa afinidade com múltiplos alvos mo-

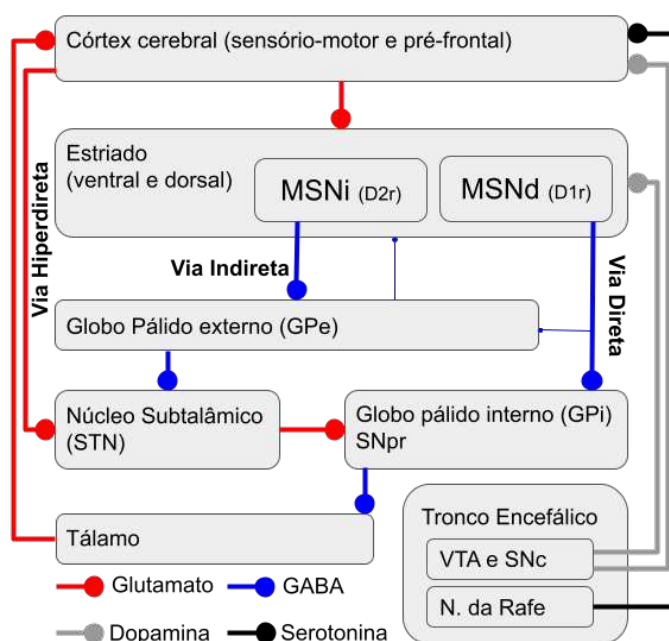


Figura 3 – Diagrama simplificado da organização das principais vias do circuito córtico-estriato-tálamo-cortical.

leculares. Diferentemente de outras drogas de abuso, como a heroína, ele não apresenta especificidade com receptores, seja em concentrações altas ou baixas. Dentre esses alvos, há a presença de vias dopaminérgicas, GABAérgicas, opiodérgicas, endocanabinóides, NMDAérgicas, glutamatérgicas e, até mesmo, interação a nível de funcionamento de canais de potássio BK. Somado a isso, tem-se que subpopulações de neurônios de uma mesma área podem reagir diferentemente em função da concentração de álcool²³. Soma-se a isso que a exposição a essa droga também pode causar alteração na força das sinapses de diversas áreas, dentre as quais se destacam o córtex, o estriado e o hipocampo (AVCHALUMOV; MANDYAM, 2020). Tratando-se das vias diretas e indiretas, o consumo repetido de álcool aparenta causar potenciação de longa duração na sinalização aferente glutamatérgica nos MSNd (D1r) e GABAérgica nos MSNi (D2r). Essa dinâmica foi ligada ao maior nível de consumo voluntário de álcool em camundongos²⁴.

Como resultado das alterações causadas pelos mecanismos supracitados, há duas hipóteses importantes envolvendo o uso e abuso do etanol: (1) a redução da capacidade das áreas corticais de engajar os NB no controle inibitório de comportamentos e (2) na maior aptidão de pistas contextuais para evocar comportamentos de busca e consumo de álcool por meio do sistema de recompensa — via mesolímbica — nos NB. Entretanto, por se tratar de mecanismos amplos e complexos com múltiplas interações na seleção do comportamento de uso dessa droga, ressalta-se a necessidade de modelos mais diversos no campo²³.

1.2 Epidemiologia do uso de álcool - Mundo e Brasil

O álcool é uma droga de abuso utilizada em boa parte do mundo, de maneira lícita ou ilícita. Seu uso é influenciado por diversos aspectos, sendo eles socioeconômicos, culturais, de gênero, idade, religião, entre outros^{25,26}. Em 2019, a maior parte da população (56,2%) mundial com 15 anos ou mais podia ser considerada abstinência, ou seja, não fez uso de álcool nos 12 meses anteriores à pesquisa. Por outro lado, os outros quase 44%, que juntos somam mais de 2 bilhões de pessoas, fizeram uso dessa droga no último ano (Figura 4). Por ano, cerca de 27g de álcool puro por dia são ingeridos, em média, pela população mundial não abstinência²⁶.

Nessa população, há diferença nas prevalências do consumo entre pessoas do sexo masculino e feminino, sendo elas, respectivamente, 52,2% e 35,4%. Além disso, a quantidade consumida também é maior nesse primeiro grupo em comparação ao segundo²⁶.

Até o relatório passado da OMS²⁵ sobre uso de álcool na população mundial, 37,5% dos jovens de 15 a 19 anos, no mundo, consumiram álcool em algum momento da vida. Já as informações mais atuais²⁶, referentes ao ano de 2019, indicam que ao

menos 22% dos jovens (15 a 19 anos) consumiram álcool nos últimos 12 meses. Não houve mudança significativa na prevalência global de jovens não abstêmios, apenas regionais. Quanto ao uso de acordo com o sexo, respectivamente, 23,5% e 20,5% dos jovens do sexo masculino e feminino consumiram álcool no último ano de referência.

No Brasil, apesar de algumas diferenças em relação aos critérios de consumo alcoólico utilizados pela Organização Mundial da Saúde^{25,26}, os dados indicam para um consumo significativo de álcool na população. Os dados mais recentes²⁷ indicam que, em 2015, cerca de 66,4% da população, entre 12 e 65 anos, consumiu álcool em algum momento da vida. Dentre eles, 43,1% o fizeram nos últimos 12 meses, com maior prevalência em jovens entre 18 a 24 anos (53,2%) e 25 a 34 anos (51,9%). Quanto ao fator gênero, a prevalência entre homens foi maior tanto no consumo em algum momento da vida (74,3%) quanto no período de 12 meses anterior à pesquisa (51,6%) em comparação às mulheres (respectivamente, 59% e 35%). Quanto aos jovens brasileiros de 12 a 17 anos, cerca de 34,3% já fez consumo de álcool na vida e 22,2% o fez nos 12 meses anteriores à pesquisa²⁷.

Um possível agravo na saúde decorrente do consumo dessa droga é o Transtorno por Uso de Álcool (TUA). Segundo o DSM-5-TR²⁸, esse transtorno pode ser definido por um conjunto de sintomas físicos e comportamentais. Sintomas característicos desse conjunto são tolerância, altas concentrações de consumo da droga, forte engajamento comportamental na obtenção do álcool e períodos marcados por abstinência e fissura pela droga. É estimado que aproximadamente 400 milhões de pessoas, ou 7% da população mundial com 15 anos ou mais convivam com transtornos por uso de álcool. Dentre eles, 209 milhões, ou 3,7%, apresentam dependência ao álcool²⁶.

A prevalência do Transtorno por Uso de Álcool em adultos (15+ anos) é de 264 milhões (9,3%) entre pessoas do sexo masculino e 136 milhões (4,8%) entre pessoas do sexo feminino no mundo. Essa diferença de prevalência entre os sexos é observada em todas as regiões do mundo²⁶.

Além dos dados sobre o consumo de álcool no mundo e no Brasil, um outro aspecto crucial são os padrões de consumo dessa droga, que estão associados a uma diversidade de prejuízos ao usuário²⁹. Dentre os padrões de consumo do álcool mais discutidos, existe o beber episódico pesado (*heavy episodic drinking*, HED) e o *binge drinking* (BD). Essas duas classificações são as mais utilizadas mundialmente para descrever episódios de intoxicação aguda, pois estão relacionadas a maior risco de desfechos negativos ao usuário de álcool³⁰. Essas consequências negativas são variadas, podendo estar relacionadas com situações de doenças agudas e crônicas, violência, exposição sexual, acidentes variados em decorrência dos prejuízos cognitivos e psicomotores, entre outros. Um dos principais aspectos também é a maior prevalência de Transtorno por Uso de Álcool entre pessoas que fazem esse tipo de consumo do álcool³¹.

Segundo a Organização Mundial da Saúde^{25,26}, o beber episódico pesado (*heavy episodic drinking*, HED) pode ser considerado como um episódio único no qual 60g ou mais de álcool puro foram consumidos. O outro critério para caracterizar o uso pesado de álcool é a definição de *binge drinking* (BD), utilizado pelo *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) nos EUA. De acordo com esse órgão, o padrão BD ocorre quando o indivíduo atinge concentração sérica igual ou superior a 0,08g/dL de álcool. Isso normalmente corresponde ao consumo de 5 doses (14g de álcool puro/bebida) para homens (70g de álcool puro) e 4 para mulheres (56g de álcool puro) em um período de aproximadamente 2h³². Apesar de já existir evidência de que a divergência entre os critérios (i.e., limite de tempo para o consumo alcoólico) de HED (OMS) e de BD (NIAAA) implique também em resultados diferentes nas pesquisas, as duas classificações estão, em linhas gerais, relacionadas a desfechos graves do uso dessa droga³⁰.

Por exemplo, o BD foi associado a mais da metade das mortes atribuídas ao uso de álcool nos Estados Unidos da América (EUA). Ao todo, 1 a cada 5 jovens adultos (20 a 49 anos de idade) morreram, no período entre 2015 a 2019, em decorrência do consumo de álcool nos EUA³³. No mundo, o uso abusivo de álcool foi responsável por cerca de 5% de todas as mortes em 2010 e 2016. Somente em 2016, aproximadamente 3 milhões de mortes foram atribuídas ao uso nocivo do álcool no mundo²⁵.

Ainda segundo a OMS²⁵, o padrão de consumo pesado é recorrente em significativa parte da população mundial. Considerando a proporção da população que consome álcool, 39,5% dela apresentou consumo HED nos 12 meses anteriores à pesquisa. Se considerarmos a prevalência na população geral (consumidores e abstinidos), esse valor é reduzido para 18,2% de todas as pessoas com pelo menos 15 anos. Focando na América do Sul, países como Brasil, Paraguai, Peru e Bolívia apresentaram prevalência maior de HED que a média mundial, ficando na faixa de 45% a 60% entre os não-abstinidos.

Especialmente se tratando do Brasil, apesar do relatório da OMS²⁵ ter apontado que cerca de 45% a 60% da população brasileira era consumidora pesada de álcool, um estudo mais recente³⁴ identificou flutuações nessa prevalência. De acordo com essa pesquisa, que teve como base a Pesquisa Nacional de Saúde de 2019, 26,5% da população brasileira, com pelo menos 18 anos, é consumidora de álcool, sendo 1,8% consumidor pesado de álcool (> 50g/etanol por sessão). Por fim, um outro estudo²⁷, realizado pela Fundação Oswaldo Cruz referente ao ano de 2015, encontrou que 30,1% dos brasileiros, com 12 a 65 anos, consumiram álcool nos 30 dias anteriores ao questionário. Desses, 16,5% tiveram uma sessão de BD nesse intervalo de tempo.

Com base nos estudos acima, é possível afirmar que o uso pesado de álcool, tendo tanto o BD quanto o HED como critério, tem significativa presença, recorrência e

impacto negativo na população mundial e brasileira. Entretanto, apesar de os padrões BD e HED comporem alguns dos principais indicadores utilizados nas pesquisas e políticas públicas sobre o uso abusivo de álcool, notou-se a existência de um padrão de consumo ainda mais nocivo à saúde do usuário. Esse padrão está associado a desfechos mais negativos do uso abusivo de álcool em comparação ao BD e ao HED³⁵. Por conta disso, o padrão *high-intensity drinking* (HID) foi proposto.

Apesar de seus critérios ainda não serem consensuais, o HID pode ser caracterizado pelo consumo de, pelo menos, duas a três vezes o valor definido no binge drinking, ajustado para cada sexo, em uma mesma sessão de consumo^{35,36}. Outros estudos também definem o HID como o consumo de 10 ou mais doses (14g de álcool/bebida) em uma única sessão de consumo³⁷. Ainda não há consenso sobre a necessidade de se estabelecer critério de duração da sessão de consumo no HID, tal como ocorre no BD. Há evidência que indica diferenças na duração e intensidade de uso do álcool em padrões HID e BD, porém não houve um ponto de corte de duração significativo que pudesse prever quais consumidores no HID têm maiores riscos (em relação aos do BD) de desfechos negativos do consumo de álcool. Essa métrica seria uma das justificativas para a inclusão de duração de tempo em uma sessão de HID³⁸.

O HID é mais frequente entre adolescentes e jovens adultos, tendo como “pico” da prevalência a idade por volta de 21 anos^{36,39}. O relatório anual sobre o uso de substâncias entre adultos de 19 a 65 anos nos EUA⁴⁰ indicou que o HID, apesar de negligenciado de certo modo pela comunidade científica, ocorreu em aproximadamente 8,5% dos adolescentes e jovens de 18 a 30 anos nos EUA nas 2 últimas semanas de referência ao estudo. Há uma tendência de queda entre os mais jovens (18 a 22 anos). Entretanto, esse padrão de consumo ainda é relativamente bem frequente na população jovem⁴⁰. Desconhecem-se informações específicas sobre o HID na população jovem brasileira a nível nacional.

Estudos em humanos, especialmente jovens, sobre o padrão HID apresentam limitações e são escassos em relação aos que avaliaram o *binge-drinking* (BD) e *heavy episodic drinking* (HED)⁴¹. Normalmente, esses estudos também são concentrados em países desenvolvidos, com destaque para os EUA. Muitos deles falham em reconhecer com precisão as múltiplas causalidades do HID em jovens, além de serem limitados por métodos de autorrelato, como entrevistas. Isso limita a capacidade desses estudos em identificar quais fatores na história de vida do sujeito o levaram ao consumo HID^{42,43}. Com isso, a pesquisa com modelos animais contribui significativamente para a compreensão de alguns aspectos envolvendo a intoxicação aguda e pesada por etanol na adolescência, na qual o HID tem alta prevalência⁴⁴.

1.3 Implicações do uso de álcool no período da adolescência

O termo “adolescência” tem sua origem do latim *adolescere*, que pode ser entendido como “crescer”. Esse período do desenvolvimento humano pode ser caracterizado como um estágio intermediário entre a infância e a vida adulta. Seus limites são de difícil acesso, não sendo possível definir critérios específicos, para além dos legais — definidos constitucionalmente —, quanto ao seu começo e fim. Há também de ser citado que o termo “juventude” por vezes converge ao significado da adolescência. Entretanto, é discutido existir distinção entre esses períodos⁴⁵.

A definição da adolescência leva em consideração fatores biopsicossociais. Portanto, não é possível reduzir esse conceito à maturação puberal, que tem seu pico por volta dos 11 aos 13 anos de idade em pessoas do sexo masculino e feminino. Junto a isso, uma outra variável biológica essencial para a compreensão desse período é o neurodesenvolvimento. Apesar do encéfalo de um adulto ser vastamente semelhante ao de uma criança um pouco mais velha, diversos processos de maturação de vias neuronais continuam ocorrendo durante a terceira década de vida. Dentre essas áreas, destacam-se as relacionadas ao refinamento do processo de realização de escolhas e seleção comportamental. Tendo em vista essas informações, há a proposta de que o período da adolescência humana engloba, atualmente, as idades dos 10 aos 24 anos⁴⁵.

Em ratos, o período análogo à adolescência humana ocorre aproximadamente entre os dias 28 e 55⁴⁶. Essa fase do desenvolvimento ainda pode ser dividida em adolescência inicial (DPN 28 a 42) e tardia (DPN 43 a 55). Esse intervalo engloba a puberdade, mas não é restrito a ela⁴⁷. Apesar de semelhantes, comparações entre o período de desenvolvimento humano e de ratos demandam cautela. Afinal, são duas espécies que compartilham traços evolutivos, porém ainda assim são diferentes. Essas particularidades necessitam ser incluídas nas hipóteses de pesquisas comparadas, especialmente se tratando da idade dos animais dos modelos. Focando no neurodesenvolvimento do sistema nervoso central, há intervalos importantes para a maturação encefálica. Há destaque para a poda sináptica e mielinização de neurônios durante a adolescência e o começo da vida adulta tanto de roedores quanto de humanos⁴⁸ (Figura 4).

Focando no córtex pré-frontal (PFC), que, como mencionado anteriormente, é essencial para o funcionamento do circuito córtico-estriato-tálamo-cortical, o período da adolescência em humanos e roedores é crítico para o neurodesenvolvimento dessa área. Os neurônios piramidais são característicos dessa região. Eles recebem múltiplas sinapses aferentes de partes diversas do encéfalo, como as da Área Tegmental Ventral e do tálamo. A sinalização do PFC depende, portanto, de diferentes neurotransmissores, como o GABA (inibitório) e o glutamato (excitatório). Por isso, a razão entre estímulos excitatórios e inibitórios (E-I) pode determinar o funcionamento do PFC. Além disso, esses neurônios também têm sua fisiologia modulada especialmente por catecolaminas

e serotonina provenientes do mesencéfalo⁴⁹.

Em roedores, o período crítico para a remodelação do PFC ocorre aproximadamente entre os dias 40 a 50 pós-natal. Durante esse intervalo de tempo, nota-se um aumento das correntes inibitórias pós-sinápticas (IPSC), com uma relativa manutenção das correntes excitatórias pós-sinápticas (EPSC) nos neurônios piramidais do PFC. Apesar de ainda não ser totalmente descrito como isso ocorre, uma hipótese recai sobre o aumento da via glutamatérgica aferente nos interneurônios PV/FSI GABAérgicos do PFC. Esses interneurônios, por sua vez, realizam a inibição da sinalização eferente dos neurônios piramidais. Tais alterações estão relacionadas à mudança da atividade do PFC em outras regiões encefálicas, como no funcionamento dos núcleos da base⁴⁹.

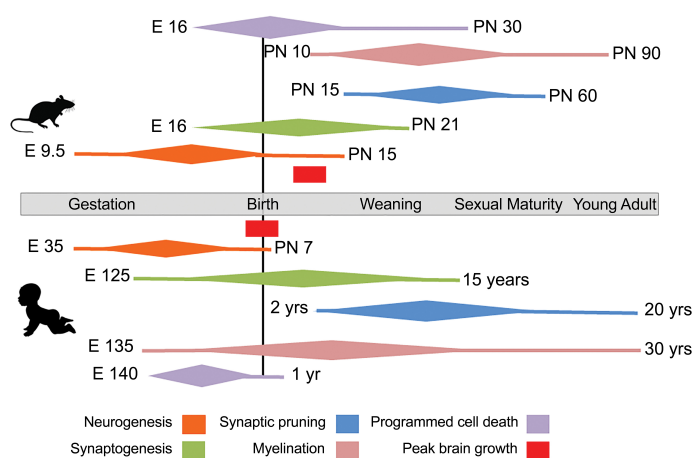


Figura 4 – Marcos do neurodesenvolvimento no Sistema Nervoso Central (SNC) de ratos e humanos. Os picos de cada processo do neurodesenvolvimento estão indicados pela porção mais larga da linha⁴⁸.

Eventos que afetem o equilíbrio da sinalização no PFC durante esse período crítico podem causar alterações duradouras no funcionamento neuronal dessa região. Dentre eles, destaca-se o uso de drogas⁴⁹. Por exemplo, já foi demonstrado que o consumo intermitente pesado de álcool (IA EtOH) na adolescência pode induzir alteração persistente na excitabilidade intrínseca dos neurônios piramidais do PFC. Isso está relacionado a uma redução no potencial de repouso (RMP) nesses neurônios, possivelmente mediado pela atividade diferente dos canais HCN (canais de hiperpolarização e nucleotídeos cíclicos). Esses canais produzem a corrente SAG (corrente ativada por hiperpolarização), caracterizada pela entrada de íons que leva (ou facilita) à despolarização do potencial de membrana. A redução da geração das SAG resulta em uma menor probabilidade de disparo dos neurônios piramidais⁵⁰.

Soma-se a isso que a exposição ao álcool na adolescência acarreta múltiplas consequências comportamentais na vida adulta. Dentre elas, destaca-se o aumento da motivação pela busca e consumo voluntário de álcool, déficits comportamentais relacionados a menor inibição, maior exposição ao risco e o incremento de comportamentos ansiosos. Esses traços aparentam ser compartilhados entre humanos e modelos experimentais com roedores⁵¹.

Esses comportamentos da vida adulta relativos à exposição ao álcool na adoles-

cência aparentam ter relação especialmente com a conectividade do PFC com os núcleos da base. Dessa forma, tais regiões corticais afetam o controle inibitório em um sentido top-down (córtex → regiões subcorticais) do circuito córtico-estriato-tálamo-cortical. A alteração nesse sistema está relacionada a maior propensão para o desenvolvimento de transtornos relativos ao uso abusivo do álcool⁵².

1.4 Problemática

Apesar do álcool ser a droga de abuso mais amplamente pesquisada, a ampla gama de efeitos dele sobre o funcionamento do sistema nervoso central traz desafios na compreensão das bases biopsicossociais que regulam o uso e abuso dessa substância. Contudo, já há certo consenso de que seu uso durante o período de desenvolvimento, mais especificamente durante a adolescência, acarreta em alterações duradouras no funcionamento encefálico. Essas alterações acontecem em múltiplas esferas, indo desde o molecular até o complexo dinamismo das conectividades sinápticas. Nesse sentido, há destaque para o circuito córtico-tálamo-cortical, que está envolvido, entre outras atividades, no processo de tomada de decisões e controle inibitório do comportamento. Notadamente, o álcool é capaz de alterar o funcionamento desse circuito a nível molecular, estrutural e funcional. A desregulação dessa via aparenta estar relacionada a múltiplas alterações neurofisiológicas e comportamentais importantes para o desenvolvimento do uso abusivo de álcool na vida adulta.

Considerando esse cenário, os estudos pré-clínicos têm sido muito utilizados para caracterizar variáveis biológicas e comportamentais que sustentam essas alterações. A validade desses métodos decorre da semelhança evolutiva entre o período de desenvolvimento de roedores e de humanos. Todavia, essa área enfrenta certos desafios no estabelecimento desses modelos. Nesse sentido, o presente trabalho busca suprir as seguintes lacunas da literatura científica:

- Embora existam muitos estudos sobre intoxicação alcoólica na adolescência, a maior parte deles foi conduzida apenas em animais machos, mesmo existindo diferenças intersexuais no consumo do álcool⁵³.
- Apesar da tolerância aos efeitos sedativos-hipnóticos à exposição pesada ao álcool ter papel substancial no desenvolvimento de transtornos relacionados ao abuso dessa droga, estudos nessa área têm sido negligenciados nos últimos anos. Melhores modelos pré-clínicos permitem estabelecer as bases biológicas relativas a esse processo⁵⁴.
- Considerável parte dos modelos pré-clínicos que exploram as bases do uso abusivo do álcool utilizam administrações involuntárias e não contingentes dessa

droga. Há necessidade de modelos comportamentais mais complexos que utilizem métodos de autoadministração para aprimorar o valor translacional dos resultados. Esses recursos possibilitam melhor averiguação do processo de desenvolvimento da dependência e das variáveis psicofisiológicas relativas à síndrome de abstinência^{55,56}.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar efeitos da intoxicação alcoólica na adolescência em comportamentos característicos do Transtorno por Uso de Álcool na vida adulta em ratos Wistar machos e fêmeas.

2.2 Específicos

- Avaliar a tolerância comportamental ao álcool na adolescência;
- Aferir o consumo voluntário de etanol;
- Avaliar propriedades motivacionais do consumo de etanol;
- Examinar os efeitos comportamentais da privação do consumo de etanol;
- Investigar diferenças nos efeitos à exposição ao álcool em função do sexo;
- Identificar possíveis grupos de animais com base no padrão de consumo de álcool.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa com animais de experimentação tem sido alvo de críticas contundentes quanto a sua baixa reprodutibilidade há anos. Esses estudos, por vezes publicados em periódicos científicos de alto prestígio, apresentam significativas taxas de resultados falsos positivos. A essa conjuntura, deu-se o nome de crise de reprodutibilidade⁵⁷. Uma das principais causas para esse problema pode estar relacionada à padronização excessiva dos procedimentos experimentais, por vezes chamada de “falácia da padronização”. Nela, acredita-se que, ao se controlar e padronizar excessivamente todos os protocolos, haverá melhor consistência nos resultados, visto que qualquer variação entre as coortes decorrerá do tratamento⁵⁸.

Para contornar o excesso de padronização nos protocolos, há uma série de recomendações para a inserção de heterogeneização sistemática e intencional nos delineamentos experimentais⁵⁸⁻⁶⁰. Dentre elas, do ponto de vista biológico, há a incorporação de linhagens *outbreds* de roedores, para reduzir a padronização genética do experimento, e o uso de animais de ambos os sexos⁵⁹.

Sob a óptica do delineamento, há diferentes designs experimentais utilizados em estudos pré-clínicos. Apesar disso, já foi apontado que os delineamentos completamente casualizados e os delineamentos em blocos casualizados (DBC) oferecem vantagens em relação à reprodutibilidade do estudo. Com eles, é possível melhorar a qualidade dos erros experimentais e a consistência das inferências realizadas, garantindo maior validade externa⁶⁰. Dentre esses dois delineamentos, o com maior capacidade de minimizar o viés tanto da variação individual quanto da variação em decorrência das condições experimentais (ex.: tempo e local) é o DBC^{60,61}. Cada bloco pode ser entendido como um “mini-experimento” que ocorre em momentos diferentes e ajuda a reduzir o viés causado por variáveis não controladas sobre o resultado total⁶¹. Além disso, o uso de esquemas fatoriais permitem avaliar isoladamente os possíveis efeitos de interações entre as covariáveis do modelo, resultando em ganhos de reprodutibilidade⁵⁹.

Levando em consideração os pontos mencionados acima, o delineamento experimental do presente trabalho ocorreu pelo Delineamento em Blocos Casualizados, completos e não balanceados, em esquema fatorial triplo (2x2x2) (Figura 5). Cada bloco consistiu em uma, entre 6, iterações do experimento, de modo que o total de animais foi subdividido em 6 blocos. Cada bloco contou com o mesmo número de animais machos e fêmeas. Todos os blocos contaram com ao menos um dos tratamentos. Os tratamentos foram distribuídos de maneira aleatória entre os indivíduos de cada bloco. Apesar disso, o DBC teve caráter não balanceado, ou seja, entre os blocos poderia haver números diferentes de repetições de um mesmo tratamento. Portanto, havia homoge-

neidade intra-bloco, porém heterogeneidade inter-bloco. O não balanceamento entre os blocos decorre de: perda de dados experimentais por motivos variados (aleatórios) e não controlados e diferenças nos tamanhos dos grupos em função do tratamento na vida adulta, como descrito abaixo.

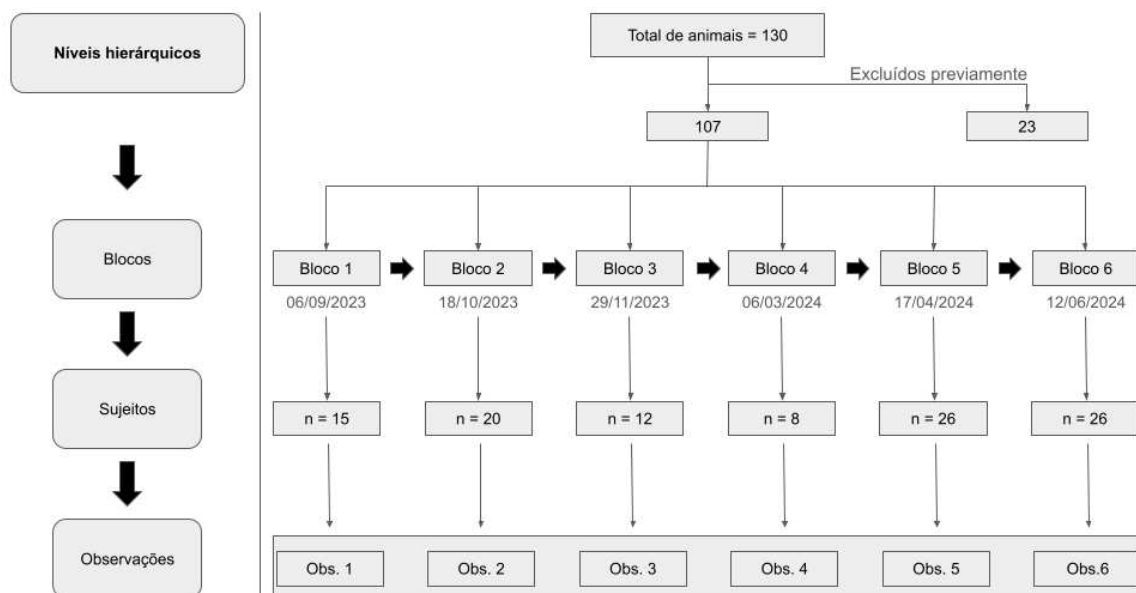


Figura 5 – Esquemática do DBC completo e não balanceado do estudo. Abaixo de cada bloco, consta a data de início do experimento. Nota-se a relação de dependência hierárquica, que pode ser descrita como: observações agrupadas no nível “sujeitos”, que por sua vez estão agrupados dentro do nível “blocos”. A quantidade de sujeitos por bloco se refere ao número de animais que prosseguiram até o fim do experimento. Animais eventualmente excluídos durante os protocolos não estão representados.

3.1 Roedores

O projeto foi apreciado e aprovado (protocolo nº 021.2023 via Ofício Circular nº 042/2023 - Anexo A) pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA - UEL). A retirada de animais no biotério e todos os protocolos experimentais só ocorreram após a aprovação mencionada.

Os experimentos foram realizados em 130 (65 machos e 65 fêmeas) ratos Wistar com 30 ± 1 dias de idade ao início do protocolo experimental. Inicialmente, o projeto previa a coleta de fígado, coração, rins e encéfalo para avaliar os impactos da intoxicação alcoólica pesada na adolescência sobre o perfil molecular e histológico desses órgãos. Entretanto, devido a entraves na execução dessas análises, as amostras coletadas foram apenas fixadas e preservadas. Devido à impossibilidade de resolução dessas dificuldades em prazo hábil durante o presente mestrado, foi necessária a interrupção de tal protocolo. Juntamente a isso, alguns animais, em menor escala, foram excluídos da pesquisa por motivos descritos abaixo e relacionados à saúde e ao bem-estar. Assim, dos 130 ratos inicialmente incluídos no projeto, 23 foram retirados após o protocolo

LORR.

Os outros 107 (54 machos e 53 fêmeas) animais foram divididos em 8 grupos em função das variáveis independentes: (1) sexo, (2) intoxicação alcoólica na adolescência e (3) exposição ao álcool na vida adulta. Os 4 grupos expostos ao álcool na vida adulta tinham tamanho de $n = 15$ (total = 60), enquanto os 4 grupos expostos à água na vida adulta tinham tamanho de $n = 11$ 12 (total = 47).

Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e foram mantidos no Biotério do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento (PGAC) por pelo menos 5 dias antes do início do experimento para adaptação ao biotério local. O alojamento dos animais contava com ciclo claro/escuro controlado (12/12h, luzes acesas às 07:30), em temperatura controlada ($23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) sob regime *ad libitum* de água e comida. Os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno (28 cm X 23 cm X 13 cm), em grupos de 3 a 4 ratos por gaiola. As gaiolas contavam com simples enriquecimento ambiental feito por um cano PVC de 50mm de espessura e 15 a 20 cm de comprimento. Todos os protocolos experimentais ocorreram entre 14:30 e 19:30.

3.2 Droga e método de preparo

O álcool utilizado foi o Álcool Etilico 95% P.A. – A.C.S 1000 ml proveniente do laboratório Dinâmica Química Contemporânea LTDA (Indaiatuba - SP, Brasil). Ele foi administrado via injeção intraperitoneal (I.P.) em concentrações de 3,5 g/kg⁶² diluídas 20%v/v em solução fisiológica 0,9% NaCl estéril.

A solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% injetável utilizada foi proveniente do laboratório Equiplex Indústria Farmacêutica Ltda. (Goiânia - GO, Brasil). A apresentação escolhida foi em flaconetes de 10ml de solução injetável estéril. Todas as ampolas foram abertas logo antes do procedimento e descartadas em seguida, de modo a evitar a contaminação do conteúdo.

A solução injetável de álcool 20% v/v em solução fisiológica 0,9% NaCl foi preparada logo antes de cada experimento. O preparo da solução ocorreu com o uso de material estéril. Todas as embalagens de seringas e agulhas eram estéreis e foram abertas logo antes da administração e descartadas após término de cada protocolo. Buscou-se evitar a contaminação do conteúdo e das vias de administração da solução.

3.3 *Loss of Righting Reflex* (LORR)

Um indicador comportamental usualmente utilizado na avaliação dos efeitos da intoxicação aguda do etanol é por meio da análise da perda do reflexo postural (em

inglês, loss of righting reflex, LORR). Essa avaliação permite investigar a sensibilidade do animal aos efeitos do etanol, sendo a duração do LORR diretamente relacionada à sensibilidade⁶³. O LORR pode ser definido como a incapacidade de um animal retomar sua postura pronada após ser colocado em posição supinada⁶⁴.

Baseado em protocolo já existente⁶², no 30º dia PN os animais receberam injeção intraperitoneal (I.P.) de 3,5 g/kg de etanol (20% v/v) ou salina 0,9% NaCl. Foram aplicadas 3 I.P. por semana em dias intercalados durante 3 semanas consecutivas, totalizando 9 injeções ao fim do processo. Após cada injeção, eles foram posicionados deitados na aresta inferior de uma caixa individual apoiada em uma grade metálica de modo a formar um ângulo aproximado de 45º em relação à superfície da mesa. A cronometragem teve início após o animal falhar duas vezes em retomar a posição pronada em um período de 30 segundos. As tentativas de virar o animal começaram apenas após 50 segundos da administração da I.P visando reduzir o impacto do possível cansaço que tentativas consecutivas de retornar à posição pronada influenciassem no tempo do LORR.

Foi contabilizado o tempo até que os animais recuperassem o reflexo de retornar a sua posição pronada depois de pelo menos três tentativas em menos de 60 segundos de intervalo. Animais que não perderam o reflexo postural em até 4 minutos foram excluídos da análise naquele dia (dado censurado).

Os animais foram monitorados visualmente quanto a possíveis expressões faciais de nocicepção, com o uso da escala Grimace para ratos⁶⁵, quando sinais de “dor” eram identificados. Comportamentos relacionados à dor abdominal, que podem ser sinais de peritonite, também foram avaliados de acordo com estudo prévio⁶⁶. Em especial, observou-se a presença de postura arqueada nos animais. Outros aspectos como perda significativa de peso, pelagem bagunçada e presença de porfirinas nos olhos, ambos indicativos de redução do autogrooming, e machucados na pele, especialmente na região facial, também foram visualmente avaliados⁶⁷⁻⁶⁹.

Animais com significativos indícios de “dor” foram retirados do estudo e eutanasiados, conforme recomendações do Comitê para o Reconhecimento e Alívio do Sofrimento em Animais de Laboratório do Instituto para Pesquisa com Animais de Laboratório dos EUA⁷⁰ quanto aos pontos finais humanos (*humane endpoints*) de animais em sofrimento. Para tanto, os critérios utilizados neste estudo foram: perda de peso entre os dias de cada I.P. (perda > 15%), presença de ao menos uma alteração com escore 2 na escala Grimace para ratos e alterações significativas no cuidado e integridade da superfície corporal do animal. Tais critérios buscaram estabelecer limites entre a justificativa científica e características do estudo e o bem-estar animal, reduzindo o sofrimento desnecessário. Como a própria administração de altas e repetidas doses de etanol pode acarretar na alteração da ativação de vias e comportamentos relacionados

ao estresse⁷¹, definiu-se um limiar plausível entre a presença de algumas características indicativas de “dor” e a necessidade de eutanásia.

3.4 *Two-bottle choice* (TBC)

O paradigma do Two-Bottle Choice é um dos procedimentos mais bem estabelecidos na literatura científica para o estudo de consumo episódico de álcool, com alta relevância translacional para o estudo da dependência ao álcool⁷². O protocolo consistiu na disponibilização intermitente (dia sim, dia não), 3 dias por semana, de duas garrafas, sendo uma contendo álcool (20% v/v) diluído em água potável e, a outra, apenas água potável durante 24h. Para o período de consumo, os animais foram alojados em gaiola individual e as garrafas foram alternadas de posição a cada sessão para evitar estabelecimento de preferência ao lugar. As caixas individuais foram posicionadas lado-a-lado na tentativa de atenuar o estresse por isolamento social durante o protocolo, visando principalmente o bem-estar animal. Essa estratégia foi baseada em estudo de condicionamento de preferência ao lugar em ratos separados por uma tela, o qual demonstrou certo valor positivo para o animal⁷³. Houve alimento disponível *ad libitum* durante todo o período e, após o teste, eles foram realocados em suas moradias grupais habituais.

Os volumes iniciais (Vi) e finais (Vf) de cada garrafa foram contabilizados antes e depois das 24h de consumo. Tal fato permitiu avaliar (1) o consumo total de cada um dos líquidos e (2) o consumo estimado de etanol (em g/Kg/24h de massa do animal) durante a sessão⁷⁴. Os animais e a ração individual foram pesados antes de cada sessão de consumo. O vazamento das garrafas foi estimado por um Modelo Linear Misto em função do peso inicial da garrafa e do conteúdo líquido (ver Apêndice 2). A estimativa do vazamento foi descontada do resultado da diferença entre Vi e Vf para cada garrafa.

Para a aplicação do protocolo *Two-Bottle Choice*, os animais, até então alojados em grupo, foram submetidos ao protocolo descrito acima por um período de 14 sessões, totalizando aproximadamente 5 semanas, a fim de estabelecer o consumo e a preferência pelo etanol.

3.5 Autoadministração de álcool

Os procedimentos de autoadministração têm o maior valor translacional para o estudo do uso abusivo de drogas dentre todos os modelos animais propostos. Eles permitem quantificar propriedades motivacionais e reforçadoras de uma droga a partir de alterações nos esquemas de reforçamento do ambiente⁵⁶. Apesar disso, uma das dificuldades na utilização de autoadministração de álcool é o gosto pouco palatável do etanol. Estudos têm utilizado o protocolo de Two-Bottle Choice previamente ao condicionamento operante utilizado na autoadministração, visto que essa dificuldade me-

etológica tende a ser atenuada em ratos que já fazem consumo voluntário de etanol e apresentam comportamentos tipo-dependentes⁷⁵. Portanto, a autoadministração de etanol ocorreu após nosso protocolo de Two-Bottle Choice.

Para a realização do protocolo de autoadministração, 10 caixas de Skinner do modelo Eltrones ELT-02 (Joinville - SC, Brasil) do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento (PGAC-UEL) foram utilizadas. Cada aparelho contava com uma barra para pressão e um dispenser de líquidos posicionado abaixo da barra, além dos controladores que realizavam as contagens das pressões à barra. As caixas tinham duas configurações para a entrega do líquido, sendo uma a opção manual, na qual o experimentador realiza a ação, e a outra, automática, que entrega uma gota do líquido a cada pressão à barra (esquema de reforçamento em Razão Fixa = 1). Cada gota entregue tinha aproximadamente 0,1 ml da solução. Para a modelagem do comportamento de pressão à barra, utilizou-se a entrega manual de reforçadores. Para a fase de sucrose fading e as sessões de testes, a opção automática foi configurada, tendo o experimentador anotado a quantidade de pressões ao final do tempo estabelecido. Os animais foram sujeitos à privação hídrica previamente às sessões somente na etapa de modelagem. Todos os outros protocolos foram feitos com animais em regime *ad libitum* de ração e água. Os procedimentos detalhados se encontram descritos abaixo.

3.5.1 Modelagem

A modelagem do comportamento ocorreu por meio da privação hídrica durante 15h a 24h antes de cada sessão. Para a primeira sessão, utilizou-se o intervalo de 20h a 24h de privação de água. Para as demais sessões, esse intervalo foi reduzido para 15h a 20h. A redução do tempo em privação visou diminuir o mal-estar animal durante o protocolo. O maior valor na primeira sessão foi para contornar o conflito entre o aspecto motivacional da privação de água e o comportamento de evitação causado pela novidade do ambiente (a caixa de Skinner). Como nas demais sessões o animal já estava habituado ao espaço, reduziu-se o tempo de privação. Não houve dois dias consecutivos de modelagem. Procedimentos envolvendo privação hídrica de até 24h são tradicionais nos experimentos que envolvem modelagem⁷⁶.

Em resumo, as sessões de modelagem buscaram selecionar o comportamento de pressão à barra. Para isso, aproximações sucessivas foram realizadas, sequencialmente, de modo a selecionar as seguintes respostas: achar o bebedouro → associar som do bebedouro e liberação de água → levantar a cabeça → interagir com a barra (cheirar, encostar pata, morder, etc) → ficar apoiado nas patas traseiras em frente à barra → apoiar patas dianteiras na barra → apertar a barra → pressionar completamente a barra. Mesmo que o animal pulasse uma etapa da modelagem (por exemplo, da interação com a barra direto para a pressão à barra), o procedimento continuou. Após apresentar a úl-

tima resposta da modelagem, o animal recebeu acesso à água, em razão fixa = 1, por pelo menos 30 respostas consecutivas a fim de aumentar a probabilidade de manutenção dessa resposta e extinguir eventuais outras respostas. O processo de modelagem levou, ao todo, de 2 a 4 semanas para ser completado em cada bloco experimental.

3.5.2 Protocolo de sucrose fading

O protocolo de sucrose fading é utilizado há décadas para estimular o consumo de álcool em animais com naturalmente baixa preferência ao uso dessa droga, como no caso da espécie de ratos Wistar. Nesse procedimento, os roedores são treinados a pressionar a barra por uma solução contendo sacarose e álcool inicialmente. Com o decorrer das sessões, a concentração de açúcar é reduzida, mantendo-se o nível de etanol, que tradicionalmente é de 10% v/v⁷⁷.

Para o experimento do presente estudo, foi padronizado um protocolo de sucrose fading, o qual consistiu de 10 sessões, de segunda-feira à sexta-feira, de 30 minutos cada. Nas primeiras 5 sessões, manteve-se o nível de 6% m/v de açúcar em água potável, enquanto aumentou-se a concentração de álcool em 2% a cada sessão, totalizando 10% ao final. Nas outras 5 sessões, manteve-se o nível de 10% de álcool e reduziu-se a concentração de açúcar de 6% para 4% → 3% → 2% → 1% e 0. O número de pressões à barra foi anotado em todas as sessões, com exceção da primeira. Isso decorre do motivo de que nem todos os animais generalizaram o comportamento de pressão à barra nas novas caixas de Skinner.

3.5.3 Fase de testes

A fase de testes consistiu em 5 sessões consecutivas, de segunda-feira à sexta-feira, de 30 minutos cada. Ela ocorreu na semana seguinte ao término do protocolo de sucrose fading descrito acima. Para cada sessão, os animais eram expostos ao álcool (10% v/v em água potável) ou à água potável a depender da coorte experimental. A quantidade de pressões à barra ao final de cada sessão foi registrada. O resultado final das pressões foi corrigido pelo peso corporal dos animais ao final do protocolo e pela estimativa de 0,1 ml de solução por reforço liberado.

3.5.4 Efeitos comportamentais da privação ao etanol

A abstinência forçada ao etanol em animais que apresentam comportamento tipo-dependente à droga causa alterações comportamentais e fisiológicas. Estudos anteriores^{78,79} demonstraram que essas mudanças são perceptíveis após dias e até semanas de privação em roedores e podem levar ao maior engajamento de respostas dos sujeitos na reexposição a protocolos de autoadministração ao etanol. Somado a isso, outros sinto-

mas comportamentais da abstinência ao álcool estão relacionados a comportamentos tipo-ansiosos em roedores expostos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (EPM)⁸⁰.

Considerando os aspectos comportamentais presentes na abstinência de álcool supracitados, os animais foram submetidos a 10 a 12 dias de privação ao etanol após o término do protocolo de autoadministração. Depois desse período, os animais foram submetidos ao teste no Labirinto em Cruz Elevado e ao reteste no protocolo de autoadministração de álcool.

3.5.5 Labirinto em Cruz Elevado (EPM)

O labirinto em cruz elevado permite a análise de múltiplos comportamentos tipo-ansiosos. Essa análise é feita por meio da contabilização do tempo de permanência e número de cruzamentos no centro, braços abertos ou fechados, comportamentos de postura esticada (*Strend attach posture*), autolimpeza (*autogrooming*), investidas com a cabeça (*head dips*) e levantar-se, apoiado (*climbing*) ou não (*rear*)⁸¹. Assim, o rato foi posicionado no centro do aparato com sua face voltada a um braço fechado do Labirinto em Cruz Elevado, o que o permitiu explorar o ambiente durante 5 minutos⁸¹. Os animais foram gravados com uma *webcam* Logitech c920 posicionada sobre o labirinto e ligada a um computador. A utilização do software OBS Studio permitiu o registro do vídeo. Os comportamentos mencionados acima foram analisados conforme as referências citadas.

3.5.6 Reteste autoadministração

A fissura pelo álcool, segundo o DSM-5-TR²⁸, é indicada pelo forte desejo de consumo da droga, o que pode levar ao engajamento na ingestão da substância. Essa fissura normalmente é acentuada quando na presença de estímulos discriminativos contingentes ao consumo operante de álcool e durante os episódios de abstinência. Ela também está ligada a casos de recaída em humanos⁷⁹.

A fim de avaliarmos a fissura pelo etanol após duas semanas, reaplicamos o protocolo de autoadministração diretamente na fase de teste para avaliar se há diferença na eficácia do álcool enquanto estímulo reforçador após aproximadamente duas semanas de abstinência forçada. Ou seja, se houve mudança na magnitude do álcool enquanto estímulo reforçador, um possível indicador da motivação para o consumo da droga. Uma possível mudança na magnitude do álcool enquanto estímulo reforçador pode ser inferida a partir do maior engajamento no comportamento de pressão à barra, apesar do custo da resposta, em comparação com a fase de testes anterior.

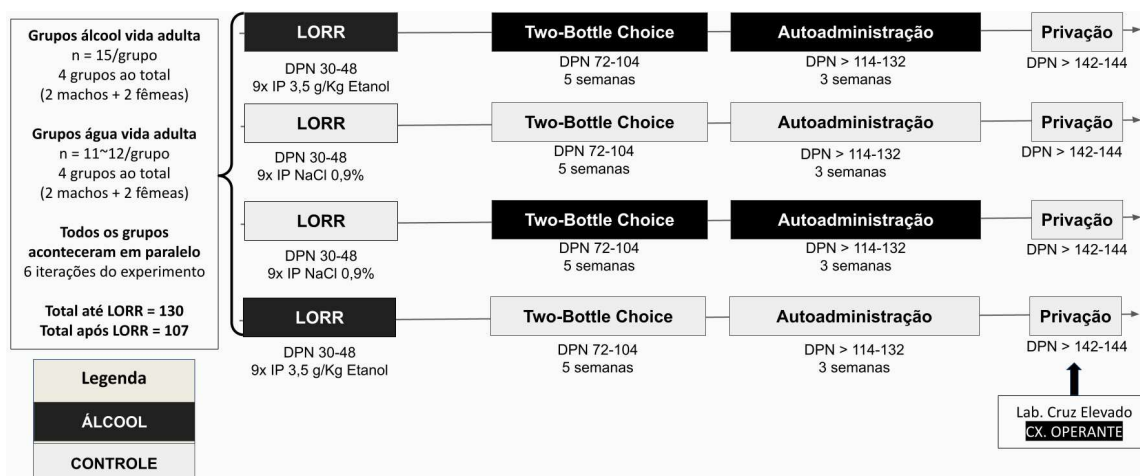


Figura 6 – Delineamento experimental simplificado (sem considerar a variável sexo).

3.5.7 Eutanásia

A eutanásia dos animais ocorreu ao final dos protocolos comportamentais. O método escolhido foi o de sobredosagem da associação de anestésicos dissociativos (Cetamina, dose: 300 mg/Kg) com agonistas de adrenorreceptores alfa-2 (Xilazina, dose: 30 mg/Kg) administrada pela via intraperitoneal conforme Resolução Normativa CONCEA nº 37 de 15 de fevereiro de 2018⁸².

3.5.8 Análise Estatística

Todos os dados foram anotados manualmente durante os experimentos e depois transferidos para planilhas criadas no Google Sheets para armazenamento em nuvem (Google Drive). *Backup* local também foi realizado periodicamente. Para as filmagens, utilizou-se apenas *backup* local feito em três diferentes equipamentos. Todos os testes de hipóteses foram bilaterais e tiveram nível de significância de 5%.

Todas as análises ocorreram com o uso do ambiente e linguagem de programação R⁸³ (v. 4.4.1). A programação ocorreu no ambiente RStudio. Optou-se pelo uso do R pela sua flexibilidade e pelo caráter gratuito, fato que aumenta a replicabilidade e acessibilidade às análises. Além das funções básicas do R, diversos pacotes foram utilizados, dentre eles:

- readxl⁸⁴: leitura de dados .xlsx e .csv;
- ggplot2⁸⁵: geração de gráficos.;
- plotly⁸⁶: criação de gráficos exploratórios 3D para medidas repetidas;
- grid⁸³, gridExtra⁸⁷ e ggExtra⁸⁸: criação de gráficos e painéis;
- dplyr⁸⁹ e tidyr⁹⁰: manipulação e filtragem de dados;

- MASS⁹¹: transformação Box-Cox;
- car⁹²: análise de Fator de Inflação de Variância (VIF e GVIF);
- ggpubr⁹³: criação de QQ-plot com envelope simulado (95% I.C.);
- StMoSim⁹⁴: criação de simulações para confecção de QQ-plot;
- lme4⁹⁵: criação de modelos lineares generalizados mistos;
- lmerTest⁹⁶: cálculo do p-valor para modelos mistos feitos com lme4;
- performance⁹⁷: cálculo do coeficiente de correlação intraclasse (ICC);
- influence.ME⁹⁸: cálculo da distância de Cook para modelo misto (1 efeito aleatório);
- emmeans⁹⁹: cálculo das médias marginais estimadas e teste *post hoc*.
- glmmTMB¹⁰⁰: criação de modelos lineares generalizados mistos com distribuições não suportadas pelo lme4 (ex.: Tweedie);
- DHARMa¹⁰¹: análise de resíduos quantílicos dos modelos criados com glmmTMB;
- gamlss¹⁰², gamlss.dist¹⁰³, gamlss.inf¹⁰⁴: ajuste de Modelos Aditivos Generalizados de Localização, Escala e Forma (GAMLSS);
- ppclust¹⁰⁵: realização de *Fuzzy C-Means clustering*.

3.5.8.1 Pré-tratamento dos dados

Não foram removidas observações discrepantes (*outliers*), exceto nos casos em que havia evidências de que elas foram resultado de erros experimentais ou de registro. Considerou-se que tais observações refletem a variabilidade inerente à variável aleatória, não havendo justificativa científica para sua exclusão.

3.5.8.2 Definição dos grupos

Os animais foram divididos em 8 grupos em função das variáveis independentes: (1) sexo (níveis: machos e fêmeas), (2) intoxicação alcoólica na adolescência (níveis: sim ou não) e (3) exposição ao álcool na vida adulta (níveis: sim ou não). Os 4 grupos expostos ao álcool na vida adulta tinham tamanho de $n=15$ (total = 60), enquanto os 4 grupos expostos à água na vida adulta tinham tamanho de $n=11-12$ (total = 47). O maior grupo entre os animais que consumiram álcool na vida adulta decorre da maior variabilidade na resposta de consumo em ratos¹⁰⁶. Junto a isso, os tamanhos de cada coorte também foram escolhidos a partir de experimentos já realizados em

nosso laboratório^{81,107} e em experimentos prévios de nosso laboratório (dados ainda não publicados). Os animais foram aleatoriamente alocados em cada coorte experimental.

3.5.8.3 Análise Exploratória

A análise exploratória aconteceu com o uso de alguns meios, sendo os principais: boxplots, histogramas, medidas descritivas (média, mediana, desvio padrão e quantis) e gráficos 3D com densidades de Kernel. Referências teóricas quanto à natureza da variável de interesse também foram utilizadas. Por exemplo, informações quanto às propriedades da distribuição da variável resposta “tempo de duração”, a qual é esperado que haja caráter contínuo, estritamente positivo, distribuição assimétrica e afins. Essas informações foram utilizadas para a melhor escolha do modelo estatístico.

3.5.8.4 Testes de normalidade

A verificação de normalidade é parte de diversos procedimentos na modelagem estatística. Pode-se verificar a distribuição de variáveis resposta de interesse e também realizar a checagem de pressupostos de certos modelos, como é o caso de regressões que assumem normalidade. Para isso, diversos métodos são aceitáveis, sendo eles divididos em testes formais de hipóteses e análises visuais com o uso de recursos gráficos.

No presente trabalho, recorreu-se a ambos os recursos, priorizando os métodos visuais. Isso decorre de limitações dos testes de hipóteses, os quais apresentam baixo poder estatístico em amostras pequenas¹⁰⁸ e alta sensibilidade para detectar até pequenos desvios em amostras grandes ($n > 30-40$). Esses pequenos desvios, com base no Teorema do Limite Central, não devem resultar em viés importante nas estimativas¹⁰⁹. Como teste de normalidade no estudo, optou-se pelo uso do teste de Shapiro-Wilk.

Para as análises gráficas, utilizou-se histogramas e boxplots com limites de Tukey para verificação de características das variáveis respostas e dos resíduos dos modelos¹¹⁰. Somado a isso, recorreu-se também ao uso de gráficos quantil-quantil (Q-Q plot) para inspeção do ajuste dos modelos. Para melhorar a interpretação do Q-Q plot, também foram gerados envelopes simulados com bandas de 95% de intervalo de confiança¹¹¹, bem como simulações com ao menos 19 repetições dos resultados dos modelos¹¹².

3.5.8.5 Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM)

Dentre os diferentes métodos de análise de estudos longitudinais, tradicionalmente há o emprego da Análise de Variância (ANOVA) ou Análise Multivariada da Variância (MANOVA) para medidas repetidas. Para que isso ocorra, existem diversos pressupostos que muitas vezes acabam limitando a aplicabilidade da ANOVA em contextos experimentais. Isso, por vezes, acaba levando ao uso de métodos não paramétricos de análise, o que gera perda de poder estatístico, ou transformação de dados da variável

resposta, fato que pode dificultar a interpretabilidade das estimativas. Como alternativa eficiente ao uso desses métodos tradicionais, pode-se utilizar modelos lineares generalizados mistos (GLMM) ou equações de estimativas generalizadas (GEE)¹¹³.

Apesar de tanto os GLMM quanto as GEE serem alternativas viáveis para análise de dados longitudinais, suas aplicação pode ser um pouco diferentes especialmente quanto aos delineamentos experimentais e interesses da pergunta. De modo geral, as GEE são modelos com pressupostos mais flexíveis, por vezes chamados de semi-paramétricos, pois assumem uma família exponencial e uma função de ligação para a variável resposta, mas não para a estrutura de correlação entre observações. Mesmo com a seleção da estrutura errada da matriz de correlação, as estimativas tendem a ser robustas¹¹³. O processo de estimação dos coeficientes foca somente nas médias populacionais, levando em conta a estrutura de correlação não explicitada entre as observações. Em conjunto de dados com número pequeno de grupos de observações, as GEE podem resultar em viés nas estimativas dos erros padrão¹¹⁴.

Por outro lado, as GLMM, apesar de também serem utilizadas na análise de medidas repetidas, têm um funcionamento um pouco diferente. Enquanto as GEE geram estimativas a partir da população, levando em consideração a estrutura dos dados e o “ruído” que as estruturas de correlação podem causar, a GLMM tem uma abordagem “individual”, condicionada aos fatores de agrupamento definidos explicitamente pelos efeitos aleatórios¹¹⁴. Por conta dessa característica, bem como a existência de pressupostos menos flexíveis que, por exemplo, a GEE, seu uso pode ser complexo na prática¹¹⁵.

Tanto as GEE quanto os GLMM podem ser entendidos como extensões dos Modelos Lineares Generalizados (GLM) propostos por Nelder e Wedderburn em 1972¹¹³. Brevemente, um GLM envolve uma (1) variável resposta univariada, que caracteriza o componente aleatório do modelo, (2) um componente sistemático com estrutura linear e que descreve a variável resposta e (3) uma função de ligação adequada, que une o descritor linear ao vetor de médias da variável resposta. Além disso, os GLM assumem, entre outros pontos, a independência entre as observações¹¹².

Para a seleção de um GLMM para medidas repetidas, utiliza-se os três pontos mencionados acima e uma estrutura de efeito aleatório que modela e agrupa a relação de dependência entre as observações de um mesmo sujeito. Essa estrutura hierarquizada (observações dentro do nível de cada sujeito), ou multinível (quando também há sujeitos agrupados em blocos), dos GLMM é entendida por um conjunto organizado de observações pertencentes a um nível de agrupamento¹¹⁶. Essa característica permite modelar não somente um conjunto de medidas repetidas de um mesmo indivíduo, mas também a estrutura de um delineamento de bloco casualizado¹¹⁷.

Quando há estruturas mais complexas de delineamento, por exemplo, com mais de um nível de agrupamento, os GLMM se apresentaram mais eficientes quando com-

parados às GEE¹¹⁸. Por fim, pode-se também entender que os Modelos Lineares Mistos (LMM) são um caso particular dos GLMM no qual a família exponencial assumida é a Gaussiana com função de ligação identidade¹¹⁹.

Considerando os três tipos de análises de medidas repetidas discutidas anteriormente (ANOVA/MANOVA, GEE e GLMM), o presente estudo optou pelo uso dos GLMM para avaliação dos dados, especialmente os longitudinais. A escolha decorre do caráter não balanceado dos dados, o que inviabiliza o uso de ANOVA, e a estrutura hierarquizada nos multiníveis (1) observações por sujeito e (2) sujeitos por blocos, além da baixa quantidade de blocos. Portanto, em todas as análises de medidas repetidas, os fatores aleatórios (interceptos) “observações de um mesmo sujeito” (id) e “sujeitos por bloco” (bloco/grupo) foram incluídos. Para análises de medidas únicas por sujeito, utilizou-se apenas o efeito aleatório (intercepto) “grupo”.

Na presença de indícios significativos de mal ajuste dos GLMM, o que gera viés significativo nas estimativas, utilizou-se as GEE por serem mais flexíveis. Isso permite avaliar ao menos os efeitos populacionais das variáveis explicativas, mesmo perdendo a modelagem ao nível dos sujeitos. Apesar disso, nota-se uma violação teórica dos pressupostos da GEE, dado que as observações são temporalmente dependentes dos blocos, além de dependentes dos sujeitos. Normalmente, postula-se que as observações devem ser dependentes ao nível sujeito e independentes entre sujeitos. Como sugere-se que os blocos sejam homogêneos entre si, assumiu-se que o viés gerado por essa violação possa ser negligenciado. Entretanto, ressalta-se a importância do cuidado na interpretação desses resultados.

O uso de dois fatores aleatórios aumenta a complexidade do modelo. Mesmo assim, optou-se por não excluir nenhum deles mesmo quando não havia indícios de melhora significativa do ajuste do modelo aos dados. A principal explicação para essa postura é a possível violação do pressuposto de independência entre as observações, que serve de base para os GLM¹²⁰. Na estrutura do delineamento experimental do presente estudo, a probabilidade da ocorrência de uma observação fica condicionada ao fator do bloco e, caso haja medidas repetidas, ao indivíduo. Isto é, a probabilidade de uma observação depende da ocorrência de um ou dois eventos a priori. Portanto, os eventos não têm a mesma chance de ocorrência. Além disso, também houve interesse em avaliar a concordância das medidas entre os sujeitos.

Essa estrutura condicional pode ser útil em delineamentos não balanceados, como o caso da presente pesquisa, visto que as estimativas dos erros devem ser influenciadas pelos tamanhos amostrais diferentes de cada bloco. Assim, a estrutura condicional, mediada pelos fatores aleatórios, permite (1) capturar possíveis correlações entre observações de um mesmo sujeito e de um mesmo grupo e (2) assimilar diferenças nos erros de cada bloco em decorrência do tamanho amostral. Já foi descrito que a retirada

do fator aleatório pode ter implicações importantes para estudos com DBC. Dentre elas, há o viés na estimativa do erro tipo I e a violação do pressuposto de independência das observações de um sujeito pertencente a um bloco¹¹⁷, como mencionado acima.

As hipóteses dos modelos contavam com a interação entre os fatores fixos. Todavia, na presença de problemas significativos, como multicolinearidade, discutiu-se somente os efeitos simples, sem interação. Abaixo, encontram-se tabelas que resumem os modelos utilizados para a análise dos resultados dos diferentes protocolos. O asterisco entre os fatores fixos indica interação entre as variáveis explicativas, enquanto o sinal de adição representa um modelo com efeitos simples, sem interação.

3.5.8.6 Modelos Aditivos Generalizados de Localização, Escala e Forma (GAMLSS)

Apesar da maior flexibilidade nas aplicações dos GLMM, dados complexos podem continuar sendo de difícil análise. Dentre os problemas, há destaque para ao menos três aspectos: (1) relações não lineares entre variáveis explicativas e resposta; (2) heterogeneidade excessiva dos dados que pode, por sua vez, variar em função de um preditor; (3) assimetria na distribuição da variável resposta. De maneira a contornar essas limitações impostas aos GLMM, houve a proposição dos Modelos Aditivos Generalizados de Localização, Escala e Forma (GAMLSS). Esse tipo de modelo abrange uma expansão de seus predecessores, os Modelos Lineares Generalizados (GLM), com o uso de famílias exponenciais, e os Modelos Aditivos Generalizados (GAM), com a adoção de termos aditivos¹²¹.

Tradicionalmente, os modelos de regressão buscam descrever a relação entre a média de uma variável resposta a partir de preditores. Entretanto, por volta das décadas de 70 e 80, também foram propostos modelos que, junto à média, eram capazes de modelar a variância da distribuição da variável resposta. Apesar de um avanço na aplicabilidade dessas análises, modelos de dois parâmetros ainda apresentavam limitações consideráveis: a fixação da curtose e assimetria da distribuição dada a média e variância¹²¹.

Com base nesses aspectos, em 2005, os GAMLSS foram introduzidos à comunidade científica¹⁰². Esses modelos se apresentaram ainda mais flexíveis que seus antecessores supracitados. Dentre suas vantagens, destacam-se: (1) a capacidade de modelar até quatro parâmetros da distribuição $Y \sim D(\mu, \sigma, \nu, \tau)$, onde μ e σ são, respectivamente, a localização (média) e a escala (variância), enquanto ν (assimetria) e τ (curtose), a forma¹²¹. (2) Também é possível gerar distribuições ajustadas à presença de zeros com a adição de mais um parâmetro, como é o caso, por exemplo, da distribuição Gamma ajustada para zeros (ZAGA, do inglês *Zero adjusted Gamma*). Considerando a modelagem via GAMLSS, ao invés da distribuição tradicional de dois parâmetros, onde $Y \sim \text{Gamma}(\mu, \sigma)$, há a atribuição de mais um parâmetro, ν , para modelar a probabi-

lidade de $P(X = 0)$, gerando a distribuição $Y \sim \text{ZAGA}(\mu, \sigma, \nu)$ ¹²¹. (3) Por fim, outro ponto a ser destacado é a possibilidade de uso de termos aditivos para modelar relações não lineares entre variáveis explicativas e respostas¹²¹.

3.5.8.7 Fuzzy C-Means clustering

Estudos¹²²⁻¹²⁴ já indicaram a existência de possíveis subpopulações de roedores inerentemente heterogêneos quanto ao padrão de consumo de álcool. Por inerente, entende-se, aqui, que há um componente da variância que independe da história de exposição a essa droga, apresentando uma predisposição especialmente genética. Para investigar esse aspecto, foi utilizado o algoritmo de clusterização Fuzz C-Means (FCM) com parâmetro $m=1,5$ e $k=4$. Após isso, foi realizada comparação entre os quatro clusters obtidos, com testagem *post hoc* quando modelo GAMLSS resultou em diferenças significativas. Houve ajuste de Holm-Bonferroni.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Heavy adolescent alcohol exposure in Wistar rats: long-term adult outcomes and sex-specific effects in an Alcohol Use Disorder model

MARINUS V. LEEUWEN¹  | RODRIGO R. PESCI²  | ERNANE T. UCHÔA³  | CELIO R. ESTANISLAU¹ 

Affiliations

¹Department of General Psychology and Behavior Analysis, State University of Londrina, Londrina, Brazil

²Department of Statistics, State University of Londrina, Londrina, Brazil

³Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil

Correspondence

Célio Roberto Estanislau, Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Campus Universitário Cx. Postal 10.011, CEP 86.057-970, Londrina (PR), Brazil
Email: estanislau@uel.br

Funding information

Fundação Araucária (FA)
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - PROAP

Abstract

Background: Heavy alcohol exposure in early to mid adolescence has been associated with long-term negative outcomes in adulthood, including as augmented risk of Alcohol Use Disorder (AUD). Although preclinical research has improved the understanding of these consequences, many studies have not incorporated key features of AUD in their models, such as sex differences, voluntary protocols, and highly replicable experimental designs. The present study aimed to address these gaps by evaluating the long-term effects of adolescent alcohol intoxication on AUD-like behaviors in adult female and male Wistar rats. **Methods:** 110 Wistar rats (55 males and 55 females) were divided into eight groups according to the variables (1) sex (male or female), (2) adolescent alcohol intoxication (exposed or unexposed), and (3) adult alcohol exposure (exposed or unexposed). The first protocol occurred between PND 30 and 48. Rats received 3.5g/Kg alcohol solution intraperitoneally (I.P.). The latency and duration of the Loss of Righting Reflex (LORR) were further assessed. At the end of the protocol, rats were subjected to roughly 3 weeks of alcohol deprivation. At PND 72, voluntary alcohol and water consumption were evaluated with a Two-bottle choice protocol for around 5 weeks (total of 14 sessions). Rats were placed in individual cages for 24h with one bottle of tap water and one bottle of 20% v/v alcohol solution. After the end of TBC, bar press response was modeled for alcohol operant self-administration. When the aimed response was acquired, rats undergo 10 sessions of sucrose fading protocol. Subsequently, the test phase occurred for a total of five alcohol operant self-administration sessions. Rats were deprived to determine the abstinence-like effects in the elevated plus maze (EPM) and in a single alcohol self-administration session. Fuzzy C-Means clustering was applied to evaluate possible subgroups. **Results:** Rats exhibited increasing sensitivity to alcohol effects in the LORR protocol. TBC results indicated adolescent alcohol exposure may increase alcohol preference and consumption. A significant sex difference was observed in operant self-administration of alcohol. Adolescent alcohol exposure was also linked to impaired risk assessment in the EPM. Clustering analyses suggested the existence of subgroups with heightened motivation for operant alcohol consumption. LORR treatment altered body weight in the alcohol-administered group. Male rats exhibited a catch-up growth, regaining typical weight in adulthood, whereas females did not. **Conclusion:** Heavy alcohol exposure during early adolescence may produce lasting consequences in adulthood, enhancing AUD-like behaviors, particularly in a subgroup of animals.

KEYWORDS

Alcohol Use Disorder, adolescent exposure, catch-up, long-term effects, sex differences.

INTRODUCTION

Adolescence is a core developmental phase characterized by pronounced neurobehavioral changes driven by phylogenetic mechanisms and environmental influences (Zeiss 2021). This complex relationship makes adolescence a critical and sensitive window of vulnerability to pharmacological insults to the organism, which may lead to persistent deleterious effects in adulthood (Salmanzadeh et al. 2020). Early life exposure to alcohol can augment the probability of developing Alcohol Use Disorder (AUD) symptoms in adulthood in an age at drinking onset- and dose-dependent way (Yuen et al. 2020). Standard AUD diagnostic criteria include: (1) high amounts of consumed alcohol, (2) consistent use of alcohol despite contingent aversive consequences, (3) development of tolerance to alcohol effects, (4) intense desire or motivation to consume alcohol, and (5) withdrawal symptoms when deprived, such as anxiety and craving (American Psychiatric Association 2022).

Among described alcohol use patterns in humans, high-intensity drinking (HID) has been linked to worse deleterious outcomes and long-term effects compared to other consumption patterns (Greenfield et al. 2023). HID can be defined as the ingestion of more than two to three times the binge-drinking (BD) threshold, which corresponds to 4 drinks (around 14g of pure alcohol) for females and 5 drinks for males within a 2h interval (Hingson, Zha, and White 2017). Previous studies have found higher HID and BD prevalence among adolescents and young adults than among older adults (Patrick et al. 2025; Miech et al. 2025). Alongside the long-lasting consequences of HID, recurring manifestations of acute alcohol intoxication episodes include motor control impairment, transient sedation, and blackouts (American Psychiatric Association 2022; Mirijello et al. 2023).

Rodent models have been largely employed to evaluate the consequences of adolescent alcohol exposure. Evidence suggests that alcohol can impair risk assess-

ment and increase voluntary alcohol ingestion in adulthood (Spear 2018), while also undermining physical development (Zou et al. 2009) during adolescence. These consequences can be persistent even after long periods of alcohol abstinence (Spear 2018) and may vary according to individual predisposition in outbred rat strains (Domi et al. 2021). Despite the growing evidence encompassing adolescent HID persistent outcomes in adulthood, such as AUD, rodent models fail to incorporate important features of alcohol consumption (Smith 2020).

First, most experiments have relied only on male rats to model AUD-like outcomes despite known sex differences. The intricate interplay between genetics, physiology, environmental influences, and life history remains insufficiently understood, particularly among females (Flores-Bonilla and Richardson 2020). Hormones of the estrous cycle may influence alcohol consumption and effects, albeit scientific data on this phenomenon remain inconsistent (Maddern et al. 2024). Lastly, and of particular relevance, tolerance to the effects of alcohol plays a major role in the etiology of AUD. However, this trait has been neglected in recent years, particularly in female rats (Elvig et al. 2021).

Second, voluntary alcohol consumption protocols often do not comprise distinct characteristics of motivation and response cost contingent to alcohol use. These two properties can enhance the translational value of the findings (Smith 2020). In order to improve the reliability of the results from rodent models, experiments could also incorporate protocols that assess different phases of AUD to enhance understanding of the disorder's etiology and progression (Venniro et al. 2020).

The aim of the present study is to investigate the long-term outcomes of heavy alcohol exposure during adolescence, analogous to a chronic HID pattern in humans, using an adult AUD model. We sought to incorporate characteristics that are critical for AUD models, including sex differences, voluntary alcohol consumption protocols, and analyses of subgroup predisposition to

compulsive alcohol use.

MATERIALS AND METHODS

All protocols were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the State University of Londrina (protocol nº 021.2023) prior to the experiments. To enhance reproducibility, this study employed an unbalanced and complete randomized block design (RCBD) (Voelkl et al. 2021). Hence, all treatments were applied in each of the six experimental iterations (blocks), although the block sample sizes differed.

Animals were obtained from the Central *Vivarium* of the State University of Londrina. They arrived at postnatal day (PND) 25 ± 1 and were housed in the departmental experimental *vivarium*. The environment was maintained at $22 \pm 3^\circ\text{C}$ under a 12 h/12 h light–dark cycle (lights on at 7:30 a.m.). In total, 55 male and 55 female Wistar rats were used in this study. They were housed in cages containing 3 or 4 animals separated by sex, with *ad libitum* access to tap water and commercial chow for laboratory rats (Quimtia, Brazil). The cages measured $28 \times 23 \times 13$ cm and were slightly enriched with a tunnel (17 ± 2.5 cm in length, 50 mm^2 in cross-section) and bedding material (shredded paper tissue). The animals were housed for at least five days prior to the experiments to allow habituation to the *vivarium* environment and to the researcher's handling.

The experiments started at the 30 ± 1 PND, which corresponds to early adolescence in rats (Spear and Swartzwelder 2014). The animals were assigned to eight groups based on three factors: (1) sex (levels: male and female), (2) heavy alcohol exposure during adolescence (levels: exposed and unexposed), and (3) voluntary alcohol consumption in adulthood (levels: exposed and unexposed) (Fig. 1). Because exposure to high doses of alcohol can cause inflammation and pain, the present study implemented humane endpoints (Nunamaker et al. 2021) to interrupt significant animal suffering. The Rat Grimace

Scale (Sotocina et al. 2011) was used to assess signs of animal pain. Rats exhibiting at least one behavior scored 2 ("obviously present") or experiencing weight loss greater than 15% were euthanized.

DRUG

Alcohol 95% was acquired from Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Indaiatuba, São Paulo, Brazil). Solutions were prepared at a concentration of 3.5 g/kg (20% v/v in injectable saline) for the LORR protocol, or within a range of 2–20% v/v in tap water for voluntary consumption protocols. Commercial sugar (sucrose) was added within a range of 2–6% w/v in solutions based on a sucrose-fading procedure for operant consumption acquisition.

Sterile injectable saline (0.9% w/v NaCl) solutions were purchased from Equiplex Indústria Farmacêutica Ltda (Goiânia, Goiás, Brazil). The 10 mL ampoules were opened immediately before each alcohol dilution to avoid contamination.

LOSS OF RIGHTING REFLEX (LORR)

The loss of righting reflex is a well-established behavioral protocol used to assess the sedative effects of a drug, including alcohol. This method consists of the inability of an animal to regain its upright posture following the administration of a drug. In this study, LORR was used to evaluate the development of tolerance to alcohol following chronic heavy alcohol exposure in adolescence (Jeanblanc et al. 2019).

Between PND 30 ± 1 and 48 ± 1 , which encompass early to the beginning of late adolescence (Spear and Swartzwelder 2014), rats received 9 intraperitoneal injections (i.p.) every other day over a period of three weeks. Each i.p. injection consisted of a dose of 3.5 g/kg in a 20% v/v alcohol solution prepared in injectable saline (0.9% w/v NaCl). Rats received the i.p. injection, with either alcohol solution or sterile saline, and were placed on their backs (supine position) on the edge of a small sloped cage

set at approximately a 50° angle from the horizontal table. The duration and the latency to the loss of righting reflex were recorded for the alcohol group. To assess the latency to LORR, animals were repeatedly flipped to the supine position until they failed twice to right themselves (prone position) within 30 seconds. Attempts started only 50 seconds after the i.p. injection to avoid fatigue from exertion. The time between the i.p. injection and the failure was considered the latency to LORR. Rats that did not lose the righting reflex within 4 minutes after the i.p. injection were censored from analysis for that day. Subsequently, the time until recovery of the prone position was recorded. LORR ended when the animal successfully regained the prone position three times within one minute. Partial regaining of the prone position (i.e., righting only the upper body or lying sideways) was not considered for the purpose of this analysis. Censored observations were not included in the analysis of LORR duration.

TWO-BOTTLE CHOICE (TBC)

The two-bottle choice paradigm is a traditional and reliable method for assessing voluntary alcohol consumption and preference over water. TBC provides results with considerable translational value (Nieto et al. 2021). In this study, we employed the standard intermittent access two-bottle paradigm, with one bottle containing tap water and the other a 20% v/v alcohol solution in tap water. Between PND 72 and PND 104, comprising approximately 5 weeks, rats were single-housed in individual cages for 14 TBC sessions, each lasting 24 hours. The cages were placed side by side to minimize social isolation stress. The two bottles, the chow, and the rat from each individual cage were weighed before and after each 24-hour session. Bottle leakage was individually corrected using estimates from a Linear Mixed Model. Bottle leakage was dependent on the solution content and initial volume. To investigate alcohol preference, the estimated mass of ethanol was divided by the total consumed water mass, calculated as the sum of water from the water bottle and the water content of the

20% v/v alcohol solution bottle.

OPERANT SELF-ADMINISTRATION OF ALCOHOL

Among alcohol consumption procedures, operant self-administration yields a preeminent translational value for preclinical models of Substance Use Disorders, such as AUD. These procedures are frequently employed to investigate an individual's sensitivity to the response cost contingent on drug intake. This motivational facet of operant self-administration enables the evaluation of compulsive-like alcohol consumption in rats (Smith 2020). Up to 8 Eltronex ELT-02 operant conditioning chambers (Joinville, Santa Catarina, Brazil) were used for alcohol self-administration. Essentially, these chambers had a fixed lever and a liquid disposal. The protocol comprised four different stages: (1) response modeling (1-5 sessions), (2) sucrose fading (10 sessions), (3) test phase (5 sessions), and (4) consumption under abstinence (1 session). The animals were water-deprived only for the response modeling. All the other stages occurred under *ad libitum* access to water and chow. The Continuous Reinforcement (FR=1) was applied as the reinforcement schedule throughout all stages. All sessions lasted for 30 minutes without any exclusion criteria.

In stage 1, for the first modeling session, they were water-deprived for 20h-24h. For the following sessions, up to a total of five, restriction lasted 15h-20h. This adjustment aimed to overcome novelty aversion in the operant chamber by enhancing motivation for water while reducing animal suffering. No modeling sessions occurred on consecutive days. The goal of each stage 1 session was to sequentially shape responses toward the final target behavior, the lever press. In stage 2, the sucrose fading was applied. For the first five sessions, sucrose concentration was held at 6% v/w in both water and alcohol solutions. Simultaneously, the alcohol dilution was increased from 2% to 10% v/v in tap water. During the subsequent four sessions, sucrose was gradually reduced to zero. In the 10th session, rats pressed the bar for alcohol 10% v/v or

only tap water, according to their assigned groups.

The aim of stage 3 was to assess motivation for alcohol consumption under a fixed response cost. To this end, rats underwent five sessions of 10% v/v alcohol or water self-administration over five consecutive days. In stage 4, animals underwent a single additional stage 3 session after 10–12 days of alcohol deprivation. The goal was to evaluate craving-like behavior during abstinence.

ELEVATED PLUS MAZE (EPM)

The EPM protocol allows for the evaluation of anxiety-like behavior in rodents. For this purpose, the following behaviors were analyzed according to Filgueiras, Carvalho-Netto, and Estanislau (2014): time spent and number of entries in the center, opened, and closed arms regions. An entry into the center or arm was scored after all four paws had entered it. Exploratory and risk-assessment behaviors were also recorded, including: stretch-attend posture (SAP), head dipping, rearing (no touching on the wall) and climbing (front limb paws touching the wall). Lastly, autogrooming was recorded in terms of both duration and frequency, covering total, rostral, and body grooming. The apparatus consisted of a conventional EPM for rats (Insight Equipamentos Ltda - Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) with two opaque closed arms, one central region, and two opened arms. The dimensions of the arms were 50 cm in length, 12 cm in width, and the maze apparatus was 50 cm in height. Sessions lasted 5 minutes and were recorded with a Logitech C920s webcam using OBS Studio software.

DATA ANALYSIS

PREPROCESSING

All analyses were made in R language (v.4.5.1). Data were evaluated, and outliers were excluded only when there was evidence they arose from experimental error or manual recording mistakes. Otherwise, outlying values were retained for statistical analysis, considering the removal could lead to unreliable results (Altman and Krzy-

winski 2016). The data were also screened for missing values. Besides censored data, missingness was considered missing at random (MAR) when all values from an entire block session were lost owing to experimental error, and deemed missing completely at random (MCAR) in all other cases. Data imputation was only performed for the fuzzy clustering analysis for missing two-bottle choice protocol consumption values. To accomplish this, missing data (around 3% of the observations) were imputed using the predicted values from a two-bottle choice model. Alcohol ingestion values were corrected for solution dilution and liquid density (alcohol $\rho = 0.8$ g/ml). Alcohol and food consumption results were normalized to body weight in all protocols. Lastly, bar presses in the operant self-administration stage 3 protocol were evaluated as the total number of responses across the five sessions.

STATISTICAL ANALYSIS

Results were initially explored visually using boxplots and density plots to identify data characteristics and plausible distributions. Moreover, results were analyzed using generalized additive models for location, scale, and shape (GAMLSS) to account for the complexity and skewness of the data (Rigby and Stasinopoulos 2005). Only simple effects were included in the models due to multicollinearity, which was defined as Variance Inflation Factor (VIF) ≥ 5 or Generalized VIF $\geq \sqrt{5}$. A block random effect was included in all models, besides clustered group analysis, as its omission could potentially inflate standard errors in RCBD (Frey et al. 2024). For repeated measures data, an additional random effect was added to account for dependence between observations. A right-censored GAMLSS approach was employed to model latency to LORR results. Zero-adjusted GAMLSS models were implemented for two-bottle choice consumption and preference results. Model fit and diagnostics were visually assessed through plots of normalized and randomized quantile residuals. Non-linearity effects were evaluated using term plots. The significance threshold was defined

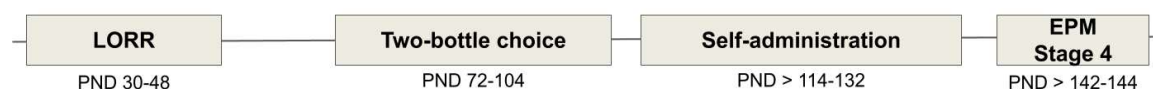


Figure 1: Overview of experimental timeline. There are three independent variables: Sex (levels: male and female), LORR (levels: exposed and unexposed), and alcohol exposure in adulthood (Two-bottle choice and self-administration protocol - levels: exposed and unexposed).

at $\alpha < 0.05$. Results were organized and presented in tables, with intercepts for the sigma, nu, and tau parameters omitted for overview. The notation $\text{pb}(\text{variable})$ indicates the use of P-spline smoothing functions for non-linear effects.

Fuzzy C-Means (FCM) clustering was applied to identify potential subgroups with inherently higher levels of alcohol consumption. Five variables were used for this purpose: (1) Sex, (2) LORR treatment, total consumption in (3) TBC and in self-administration, (4) stages 3 and (5) 4. The number of clusters ($k=4$) was defined on the within-cluster sum of squares (elbow method) and previously described subgroup features. The fuzziness parameter ($m=1.5$) was set to account for uncertainty but without generating overly sparse results. Euclidean distance was used for FCM analysis. Individuals were further assigned to the cluster with the highest membership degree. Additionally, the variables used in FCM were compared across clusters using GAMLSS to explore differences between subgroups. Because of a complete separation case between LORR clusters, this variable was analyzed using Firth's bias-reduced logistic regression, and the model fit was assessed via deviance residuals. Post-hoc pairwise comparisons (t-test based) were performed on estimated marginal means and only applied for the cluster comparison analysis. P-values from post-hoc tests were adjusted using the Holm-Bonferroni correction.

RESULTS

LOSS OF RIGHTING REFLEX

The LORR protocol was applied to evaluate the development of tolerance to the hypnotic and sedative effects of alcohol following repeated acute alcohol administration

in adolescence. To analyze latency to LORR, a GAMLSS was fitted to account for right-censored observations using a 4-parameter Sinh-Arcsinh distribution (SHASH). Of the 567 observations, 27 were lost, and 55 were right-censored. A total of 63 animals (32 males and 31 females) were included in the model. In concordance with our initial hypothesis, the model identified sex and session (or alcohol i.p. injection) as significant predictors for the mu parameter. Male rats exhibited increased tolerance compared to female rats to the acute effects of alcohol. Session, representing the repeated alcohol administrations, was also associated with lower sensitivity to ethanol (Fig. 2 A and C).

Contrary to our initial hypothesis, the duration of the hypnotic and sedative effects of alcohol increased between exposures. Among the 485 resting observations after latency analysis, 450 observations proceeded to the LORR duration model with a 3-parameter Box-Cox Cole and Green distribution (BCCG) model. No sex differences were identified in duration. However, there was a linear increase in LORR duration following repeated exposures to alcohol (Fig. 2 B and D).

TWO-BOTTLE CHOICE

Two-bottle choice protocol was applied to assess alcohol consumption escalation and preference over water following several sessions. The GAMLSS analyses were complex due to the necessity of zero-adjustment, increasing dispersion across sessions, and the existence of outliers. For the zero-adjusted alcohol ingestion model, a 4-parameter original Box-Cox t distribution (BCTo) was employed. Out of 840, 781 observations from 60 animals (30 males and 30 females) were included. Among mu predictors, rats exposed to alcohol in adolescence (LORR) exhibited higher voluntary alcohol consumption than the con-

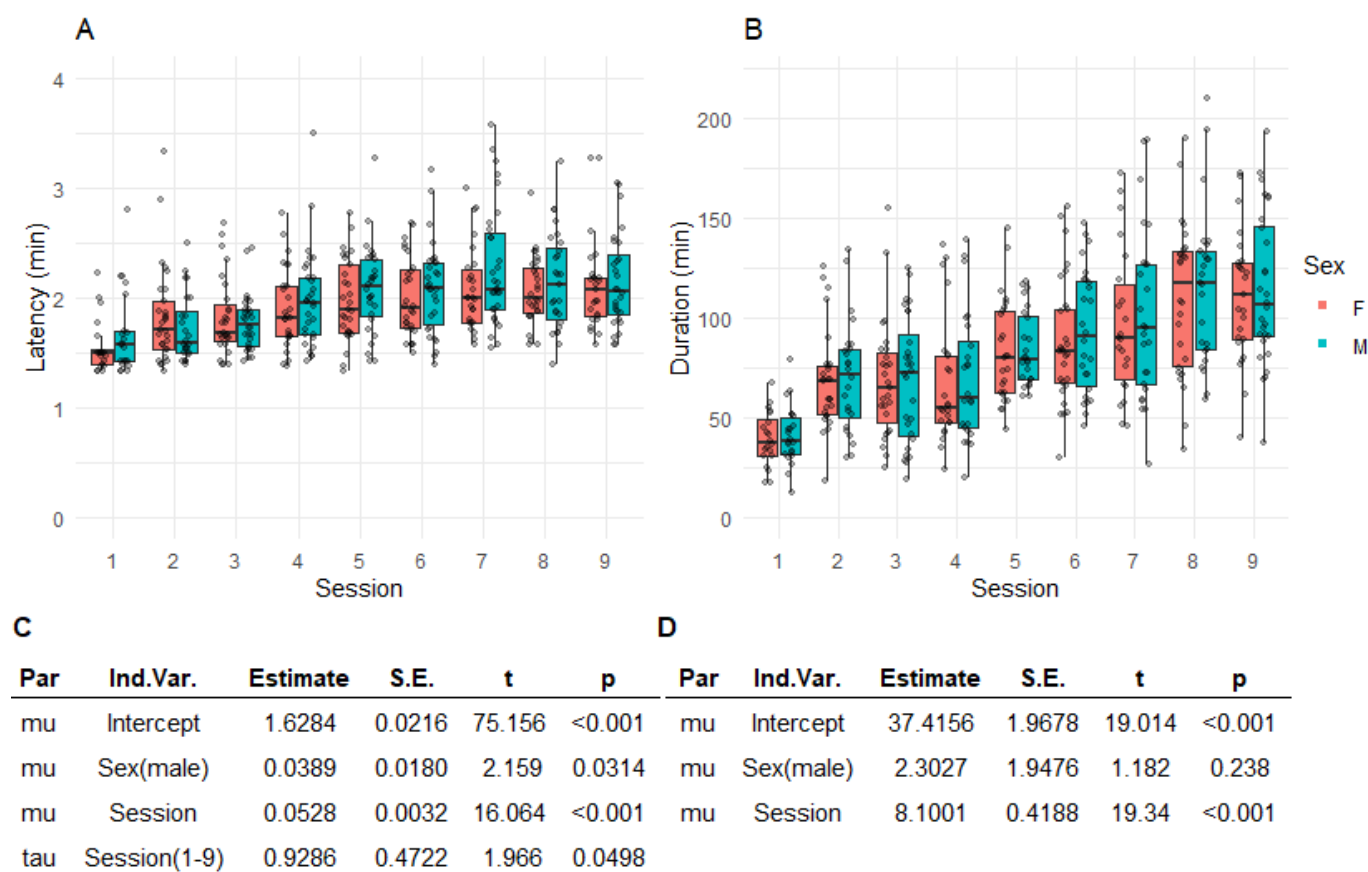


Figure 2: Exploratory boxplot and statistical results of the loss of righting reflex protocol. **A, C:** Latency to LORR results. **B, D:** LORR duration results. **Par:** parameter; **Ind.Var.:** independent variable; **S.E.:** standard error; **t:** t-value; **p:** p-value.

tol group. A significant sex effect was also observed, with males consuming less alcohol than females. Increased alcohol consumption was associated with reduced food intake across sessions. Finally, there was a significant linear escalation over repeated sessions. Briefly, regarding scale and shape parameters, the model identified growing variance (sigma) across sessions and sexes, with females expressing higher dispersion than males. There was higher asymmetry (nu) in LORR alcohol group. Male rats showed higher kurtosis (tau) than females, while there was an overall decrease in kurtosis across sessions. The additional zero-adjusted parameter (xi0) also showed a lower probability of zero alcohol consumption in females and over sessions (Fig. 3 A and B).

Concerning alcohol preference over water in TBC, data also exhibited a skewed distribution with zero values. A 3-parameter Zero-Adjusted Gamma distribution (ZAGA)

with log mu link function was employed to evaluate 809 observations (out of 840) from 60 animals (30 males and 30 females). Among mu covariates, rats that were not exposed to alcohol in adolescence (LORR) showed lower preference for alcohol solution over water. In addition, a significant sex difference was observed, with females having a higher preference for alcohol solution than males. Repeated exposures to the TBC protocol (session) also increased overall preference for alcohol. Although not significant for the sigma parameter, session exhibited a non-linear U-shaped effect that improved the model residuals. Male rats showed higher variance than females, while LORR control had reduced variance. Male rats and those in the LORR control group showed an increased probability of zeros for alcohol solution preference, whereas this probability decreased across sessions (Fig. 3 C and D).

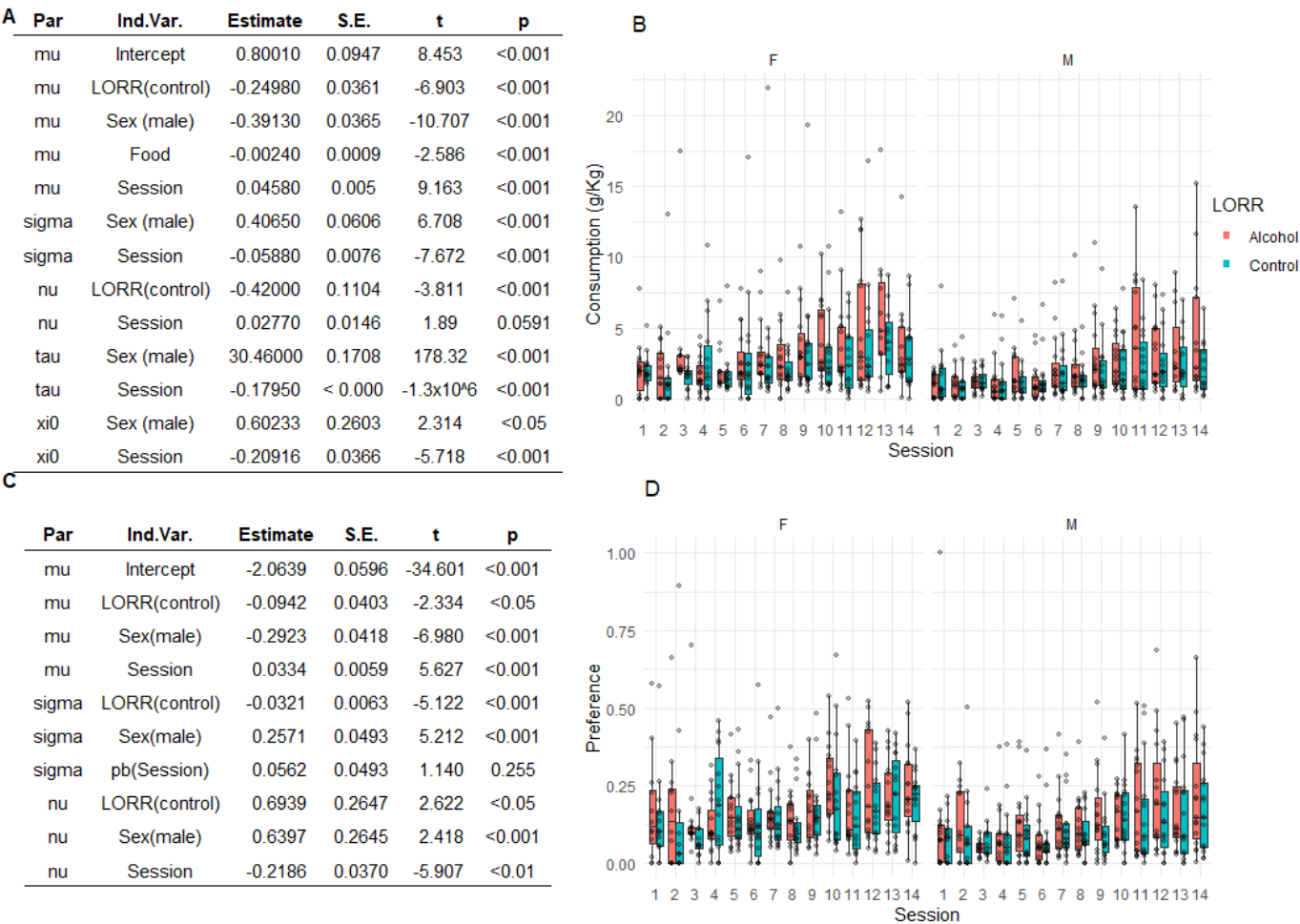


Figure 3: Exploratory boxplot and statistical results of the two-bottle choice protocol. **A, B:** Alcohol consumption. **C, D:** Alcohol preference. **Par:** parameter; **Ind.Var.:** independent variable; **S.E.:** standard error; **t:** t-value; **p:** p-value.

OPERANT SELF-ADMINISTRATION

Operant self-administration protocol was applied to explore motivational and compulsive aspects of alcohol consumption. A 3-parameter t family distribution (TF) was fit to assess total alcohol consumption over the five sessions from stage 3 self-administration protocol. There was no data loss, and all observations from 59 animals (30 females and 29 males) were used. Among the mu predictors, male rats exhibited decreased operant self-administration of alcohol solution compared to females, while also showing reduced variance (sigma) and heavier tails (nu). No adolescence treatment (LORR) difference was found in operant alcohol consumption (Fig. 4 A and B).

Regarding the alcohol self-administration in abstinence (stage 4), a 4-parameter Sinh-Arcsinh distribution

(SHASH) was used to evaluate 59 singular observations from 59 animals (30 females and 29 males). No significant differences were detected among predictors, although the effect of sex was close ($p=0.0643$) to the threshold for significance (Fig. 4 C and D).

ELEVATED PLUS MAZE

For EPM protocol, 104 animals (53 females and 51 males) were used in every model. A singular GAMLSS was fitted separately for behavioral response, with the inclusion of a random variable for the block structure. For the time in each EPM compartment, animals exposed to alcohol in adulthood (TBC and operant self-administration protocols) spent more time in the center compared to the control group. About the frequency of entries, female rats exhibited a higher number of compartment crossings than

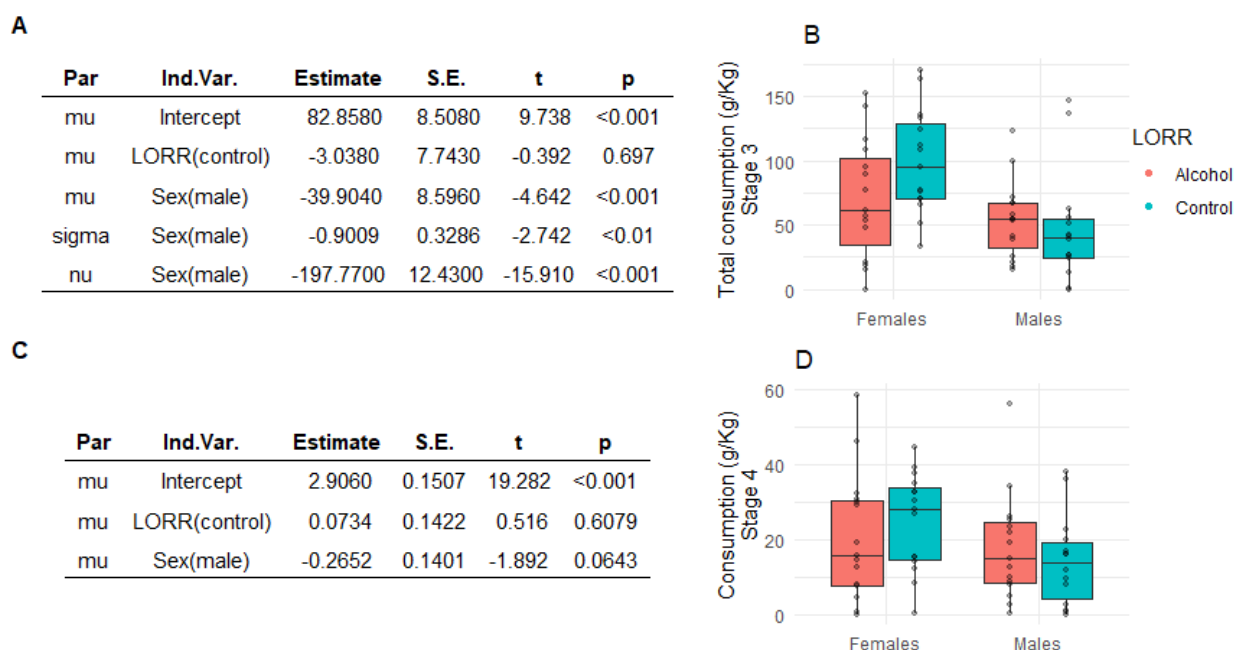


Figure 4: Exploratory boxplot and statistical results of the alcohol self-administration protocol. **A, B:** Total alcohol consumption across the five sessions in stage 3. **C, D:** Alcohol consumption in stage 4. **Par:** parameter; **Ind.Var.:** independent variable; **S.E.:** standard error; **t:** t-value; **p:** p-value.

males. Also, there were sex differences in the time spent in total grooming and climbing frequency. Finally, animals exposed to alcohol in adolescence showed a reduction in SAP frequency (Table 1).

FUZZY C-MEANS CLUSTERING

The data from 59 animals (30 females and 29 males) that consumed alcohol in adulthood were used. The elbow method suggested two possible optimal cluster numbers (k), with inflection points at $k = 4$ and $k = 6$, for the Fuzzy C-Means clustering. $k = 4$ was preferred for its interpretability and simplicity, while preserving important features about alcohol consumption in the data. Visual inspection of clusters (Fig. 5 B) indicated the possibility of different characteristics in the subpopulations. A 1-parameter Binomial distribution (BI) was employed to evaluate the sex prevalence between clusters. Significant differences were found between cluster 1-3 ($\beta = -4.0943$, S.E. = 1.2974, $p < 0.01$) and 1-4 ($\beta = -3.0910$, S.E. = 1.0038, $p < 0.01$). Post hoc tests revealed a higher prevalence of males in cluster 1, no sex difference in cluster 2, and a greater prevalence of females in clusters 3 and 4 (Fig. 5 A). For the LORR treatment prevalence, the Firth's bias-

reduced logistic regression identified differences between clusters (Likelihood ratio test = 50.20653, $df = 3$, $p < 0.001$). Moreover, cluster 1 and 2 exhibited complete separation cases, while cluster 3 had a higher prevalence of the alcohol group. No difference was found in cluster 4, probably due to the small occurrence of alcohol group animals (Fig. 5 C).

For the alcohol consumption in TBC, a 2-parameter Gaussian distribution (NO) showed differences between clusters 1-3 ($\beta = 84.278$, S.E. = 13.734, $p < 0.001$) and clusters 1-4 ($\beta = 101.835$, S.E. = 12.388, $p < 0.001$). Post hoc tests identified that clusters 1 and 2 were similar, as were clusters 3 and 4, but the two groups of clusters differed significantly from each other (Fig. 5 D). For the operant alcohol consumption in stage 3, a 2-parameter Inverse Gaussian distribution (IG) showed a difference in μ ($\beta = 1.1735$, S.E. = 0.2289, $p < 0.001$) and σ ($\beta = -1.6384$, S.E. = 0.2849, $p < 0.001$) between clusters 1 and 3. Further post hoc analysis revealed cluster 3 different from the others (Fig. 5 E). Lastly, a 2-parameter Gaussian distribution (NO) model identified differences between cluster 1-3 ($\beta = 16.190$, S.E. = 4.278, $p < 0.001$), and 1-4 ($\beta = 23.182$, S.E. = 4.072, $p < 0.001$). Post hoc showed that clusters 1 and

Table 1: Behavior analysis of the Elevated Plus Maze protocol. **Par:** parameter; **Ind.Var.:** independent variable; **S.E.:** standard error; **t:** t-value; **p:** p-value.

Behavior	Par	Ind.Var.	Estimate	S.E.	t	p
Time Open Arm	mu	Intercept	78.944	7.679	10.280	<0.001
	mu	Sex(male)	-9.049	7.593	-1.192	0.236
	mu	LORR(control)	2.954	7.566	0.390	0.697
	mu	Adulthood(control)	11.106	7.988	1.390	0.168
Freq. Open Arm	mu	Intercept	5.4023	0.4562	11.842	<0.001
	mu	Sex(male)	-1.2457	0.4701	-2.650	<0.01
	mu	LORR(control)	0.3471	0.4705	0.738	0.4625
	mu	Adulthood(control)	0.6347	0.4743	1.338	0.1841
Time Center	mu	Intercept	44.732	4.475	9.996	<0.001
	mu	Sex(male)	1.427	3.357	0.425	0.6718
	mu	LORR(control)	-1.050	3.278	-0.320	0.7494
	mu	Adulthood(control)	-6.903	3.396	-2.032	<0.05
Freq. Center	mu	Intercept	12.6229	0.6699	18.843	<0.001
	mu	Sex(male)	-2.1306	0.6853	-3.109	<0.01
	mu	LORR(control)	0.2621	0.6938	0.378	0.7065
	mu	Adulthood(control)	0.8751	0.6897	1.269	0.2077
Time Closed Arm	mu	Intercept	164.214	7.979	20.580	<0.001
	mu	Sex(male)	14.316	8.451	1.694	0.0935
	mu	LORR(control)	3.801	8.420	0.451	0.6527
	mu	Adulthood(control)	-9.733	8.441	-1.153	0.2518
Freq. Closed Arm	mu	Intercept	6.9097	0.3473	19.896	<0.001
	mu	Sex(male)	-1.4191	0.3357	-4.228	<0.001
	mu	LORR(control)	0.2628	0.3192	0.823	0.412
	mu	Adulthood(control)	0.4355	0.3211	1.356	0.178
Rearing	mu	Intercept	0.4591	1.9107	0.240	0.811
	mu	Sex(male)	-0.0663	0.1910	-0.347	0.729
	mu	LORR(control)	0.12917	0.2023	0.638	0.525
	mu	Adulthood(control)	-0.0770	1.8548	-0.041	0.967
	sigma	Adulthood(control)	-4.5723	18.2411	-0.251	0.803
Climbing	mu	Intercept	13.3328	0.9111	14.633	<0.001
	mu	Sex(male)	-2.2917	0.8633	-2.655	<0.01
	mu	LORR(control)	-0.0716	0.8452	-0.085	0.9326
	mu	Adulthood(control)	2.1704	0.8923	2.432	<0.05
Head dips	mu	Intercept	2.4051	0.0817	29.434	<0.001
	mu	Sex(male)	0.0628	0.0845	0.743	0.459
	mu	LORR(control)	0.0517	0.0846	0.611	0.543
	mu	Adulthood(control)	0.1308	0.0850	1.539	0.127
SAP	mu	Intercept	1.9639	0.0822	23.876	<0.001
	mu	Sex(male)	-0.0802	0.0806	-0.994	0.322
	mu	LORR(control)	0.5569	0.0822	6.775	<0.001
	mu	Adulthood(control)	-0.0064	0.0811	-0.079	0.937
Total groom.	mu	Intercept	2.6121	0.1539	16.968	<0.001
	mu	Sex(male)	0.4956	0.1649	3.006	<0.01
	mu	LORR(control)	-0.2079	0.1648	-1.261	0.2102
	mu	Adulthood(control)	-0.2019	0.1656	-1.219	0.2256

2 were similar, as were 3 and 4, but both pairs of clusters differed from each other (Fig. 5 F).

FOOD INGESTION IN TBC

Two different GAMLSS were fitted to evaluate food intake for male and female rats separately. First, the model for

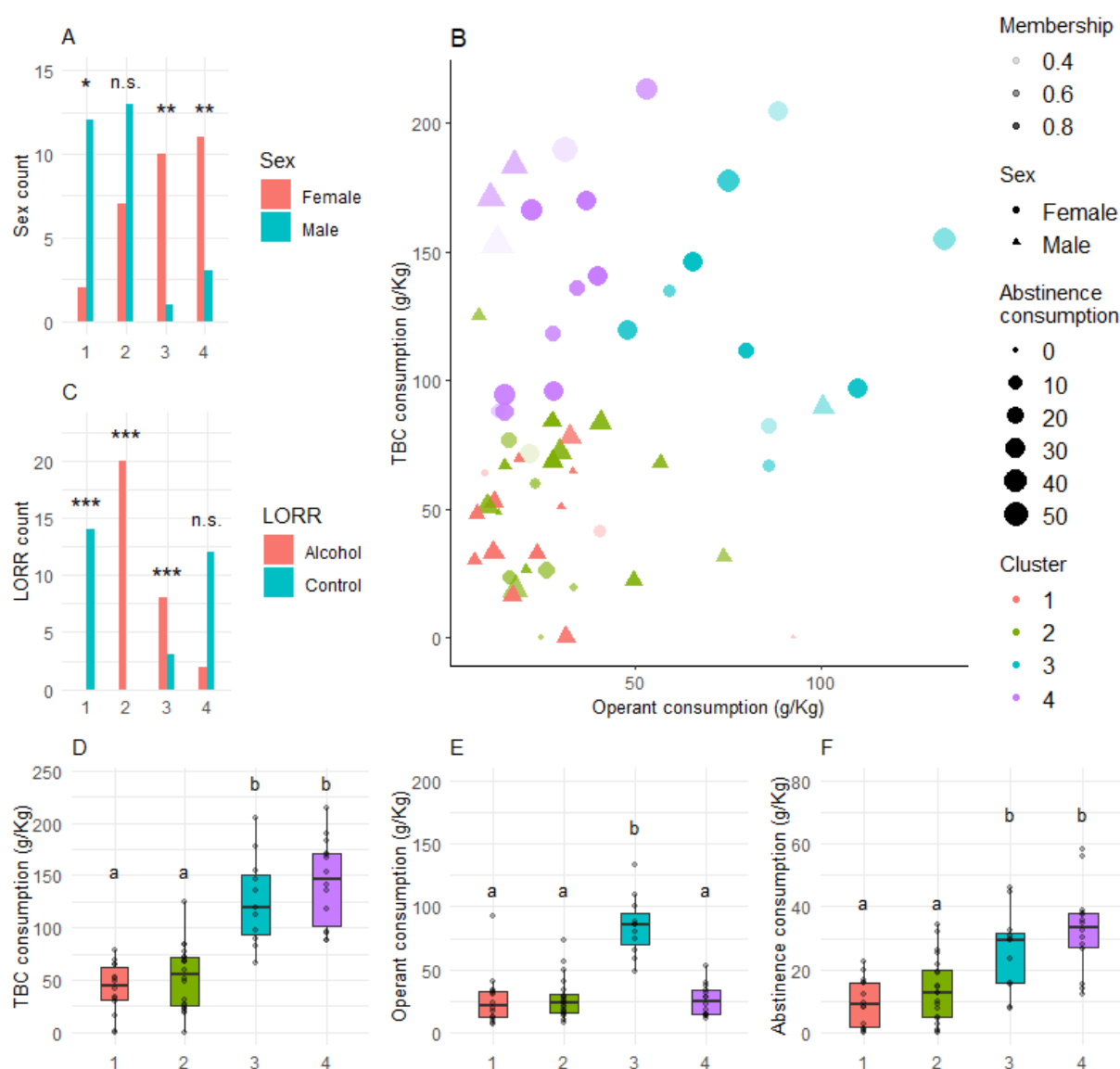
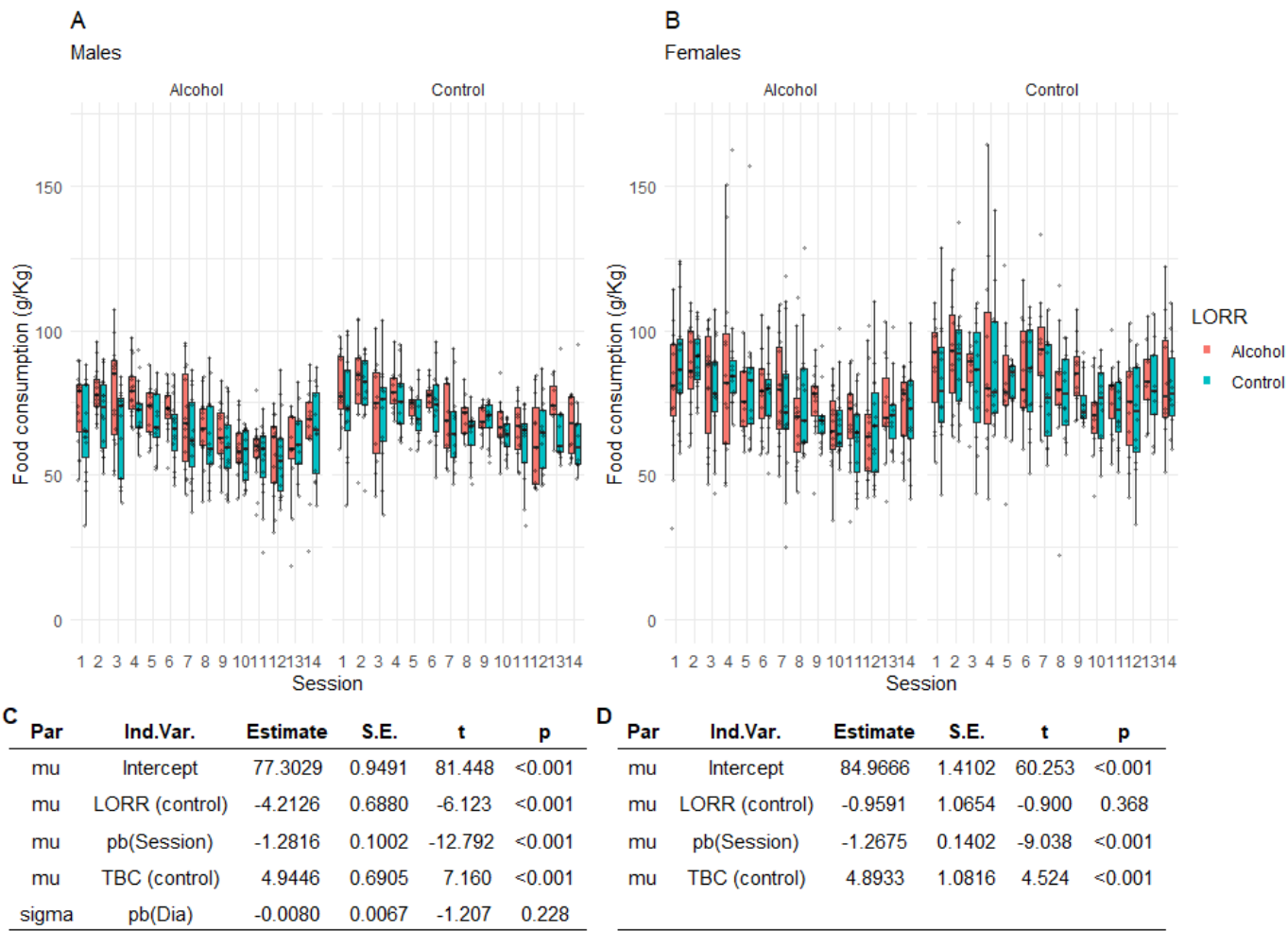


Figure 5: Fuzzy C-Means (FCM) cluster analysis. **A:** sex and **C:** LORR count in each cluster; **B:** FCM clusters (k=4) according to voluntary consumption protocols; **D:** alcohol consumption in two-bottle choice, **E:** self-administration stage 3, and **F:** self-administration stage 4 (abstinence). n.s., non-significant; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

male rats used a 2-parameter Gaussian distribution (NO). Out of 756 observations, 724 were included from 54 male rats. Regarding the mu parameter, animals in the alcohol LORR group exhibited greater food intake compared to control rats. A P-spline was applied to the session covariate, revealing a significant cubic polynomial-like pattern. Regarding TBC treatment, alcohol voluntary consumption was associated with lower food intake. Although not significant, modeling the session sigma covariate with a P-spline improved residuals, producing a meandering non-linear effect (Fig 6 A and C).

Furthermore, a 4-parameter Box-Cox t distribution

(BCT) was fit to evaluate food intake in female rats. Out of 742 observations, 710 values from 53 females were included in the model. In contrast to male rats, alcohol exposure during adolescence (LORR) did not affect food intake (mu) in female rats during TBC protocol. The P-spline applied to the session mu parameter also revealed a significant cubic polynomial-like pattern. Lastly, females exposed to alcohol exhibited reduced food intake compared to the control group (Fig 6 B and D).



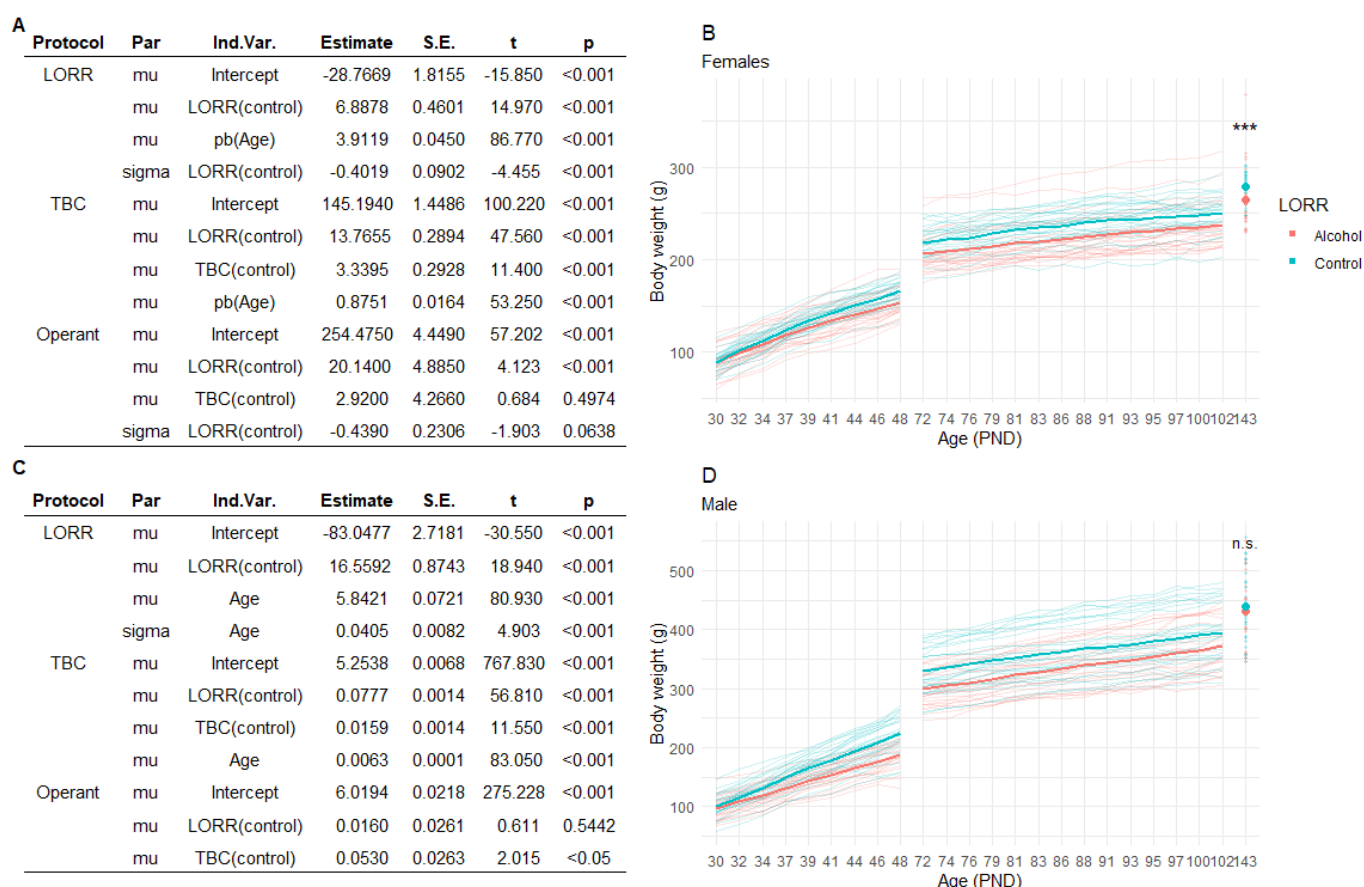


Figure 7: Exploratory line chart and statistical results for all body weight measures across protocols. **A, B:** Female rats **C, D:** Male rats. **Par:** parameter; **Ind.Var.:** independent variable; **S.E.:** standard error; **t:** t-value; **p:** p-value.

and D).

DISCUSSION

As previously noted, adolescence is critical for neurodevelopment, and heavy alcohol exposure during this period can have lasting effects on behavior (Spear 2018). The LORR protocol results show an increasing latency to the acute effects of alcohol after the i.p. injection. Repeated exposures to alcohol may lead to the development of both rapid and chronic tolerance to its sedative and hypnotic effects (Elvig et al. 2021). Although significant, the magnitude of the tolerance-like effect, as measured by latency to LORR, may be small according to the present results. Therefore, the underlying mechanism of this effect could involve either pharmacodynamic or pharmacokinetic factors. In spite of the development of tolerance to alcohol

effects being commonly observed with repeated administrations, a subtle change in body composition occurs in adolescence. The water content of the rat brain has been shown to inversely correlate with body weight, with an acute reduction during early adolescence (Gottschalk, Scafidi, and Toung 2021). Because alcohol is hydrophilic and its distribution and delivery rate highly rely on tissue water content (Jones 2019), the speed and amount of alcohol reaching the brain in the LORR protocol may have decreased over sessions. This may have produced pharmacodynamic (rapid) tolerance-like effects, or even changes resembling alterations in metabolic rate (chronic tolerance), although the underlying mechanism may actually be related to alcohol distribution.

Moreover, increasing duration of LORR following high doses of alcohol has been previously described in other studies exploring the age-dependent alcohol-induced locomotor effects (Broadwater, Varlinskaya, and Spear

2011). However, this sensitization process is not consensual in the field (Matthews et al. 2008). The present findings further support the hypothesis that early adolescence is a period of heightened tolerance to the sedative and hypnotic effects of alcohol, along with an age-dependent increase in sensitivity to alcohol. Taken together, the naturally reduced risk assessment and increased tolerance observed during adolescence, compared to adulthood, may represent an important risk factor for alcohol use and exposure (Spear 2000).

As shown in the present results, rats escalated alcohol consumption across sessions in the TBC protocol, accompanied by a rising preference for the alcohol solution over water. This progressive trend has been previously described in the two-bottle choice paradigm (Peregud, Stepanichev, and Gulyaeva 2021). Different hypotheses have been proposed to explain the phenomenon, encompassing altered alcohol metabolism (chronic tolerance) (Okuda et al. 2018), lower aversion to alcohol palatability, and positive reinforcing effects of alcohol (Wukitsch and Cain 2021; Blizard et al. 2008). Additionally, food intake reduced alcohol consumption in the TBC protocol. This effect likely stems from the significant caloric value of alcohol, around 7 kcal/g, contributing to the maintenance of energy balance (Lands 1998).

Lastly, and of particular interest in the present study, alcohol exposure and sex were also associated with alcohol consumption and preference in the TBC protocol. Previous studies have shown heavy alcohol exposure in adolescence can augment later-life voluntary consumption (see Towner and Varlinskaya (2020) for review). This effect may be age-dependent, with alcohol administration during early to mid-adolescence affecting adult alcohol consumption differently than exposure during mid- to late adolescence. This divergent age effect may arise from differences in neurodevelopmental timeframes, involving differences in neuronal signaling and connectivity, and sexual dimorphism in puberty (Spear 2015). Other studies using different mouse and rat strains have identified

sex differences in alcohol consumption and preference in the TBC protocol, with different possible mechanisms. Among these, ovarian hormones may be linked to the heightened alcohol consumption in females. Experiments with ovariectomized rodents showed that removal of ovarian hormones may abolish sex differences in TBC alcohol consumption (Hilderbrand and Lasek 2017).

Contrasting with the TBC protocol results, adolescent alcohol exposure (LORR) did not influence alcohol operant self-administration. This fact suggests that the long-term effects of early-life alcohol exposure may vary when alcohol consumption is contingent on operant reinforcement schedules involving a response cost. Despite the fact that adolescent alcohol exposure did not alter total alcohol intake in operant self-administration, it has been proposed that such exposure may impair distinct features of alcohol operant consumption. The lasting consequences of adolescent exposure to alcohol may involve behavioral inflexibility to changes in the reinforcement schedule rather than alterations in the motivational properties of alcohol (Gass et al. 2014). Furthermore, female rats also exhibited greater alcohol intake under operant conditioning than males, while concurrently showing higher response variance. As aforementioned, this difference may ensue from distinct hormonal mechanisms. Although not significant, a trend related to sex was observed in operant consumption under abstinence condition (stage 4).

Alcohol use in adolescence has already been linked with increased prevalence of anxiety in adulthood (Towner and Varlinskaya 2020). The present findings did not broadly replicate this aspect. In fact, adolescent alcohol exposure was only associated with impaired risk assessment in adulthood, considering the reduction in stretch-attend posture. The main results suggest differences between sexes, with males showing reduced exploratory behaviors (frequency of entries in all compartments) and increased anxiety-like behavior (total grooming) than females. Additionally, rats in abstinence manifested dif-

ferences in exploration, spending more time in the central area and engaging in less climbing. Although not meaningful per se, these differences may reflect anxiety- and compulsive-like behaviors observed during periods of abstinence (Filgueiras, Carvalho-Netto, and Estanislau 2014).

Not all drinkers are going to develop alcohol use disorder. Previous studies have found distinct subgroups in outbred rats (Patwell et al. 2021; Domi et al. 2021). This aspect of alcohol consumption should be incorporated into AUD models to deepen the understanding of the disorder's etiology. The results obtained after clustering likely reveal the existence of distinct subgroups within outbred rats regardless of the administered treatments. Notably, only one of the four clusters exhibited enhanced motivational properties for operant alcohol self-administration. An important diagnostic criterion for AUD is the compulsive alcohol intake despite the aversive stimuli contingent upon consumption. The operant self-administration protocol may be able to mimic this core criterion, providing valuable insights into AUD-like behaviors in rats. The higher prevalence of females among drinkers further reiterates the necessity of incorporating both sexes in AUD models. Finally, the cluster with higher alcohol intake across the three voluntary consumption protocols also showed a greater prevalence of rats exposed to alcohol during adolescence. This finding suggests that alcohol exposure in early to mid-adolescence may enhance the motivational properties of alcohol in some individuals, thereby increasing the probability of compulsive-like intake in adulthood.

Heavy exposure to alcohol impairs body weight gain in adolescent rats (Broadwater, Varlinskaya, and Spear 2011), but the long-term consequences of this exposure are not well known. The present study shows that alcohol may have lasting consequences on body weight in a sex-specific manner. Notably, only male rats exposed to alcohol in adolescence recovered the typical body weight in adulthood, around three months after the LORR protocol. The alcohol exposure effect remained significant in fe-

males in adulthood. On top of that, only male rats exposed to alcohol in the LORR protocol showed increased food intake in the TBC protocol, whereas females did not exhibit differences due to the treatment in adolescence. These inconsistencies may reflect sex differences in catch-up growth after heavy alcohol exposure. Future research should investigate the long-term outcomes of adolescent alcohol exposure and the potential of sex-specific catch-up growth.

In brief, the present study investigated the consequences of heavy adolescent alcohol exposure on AUD-like behaviors in adulthood, while also addressing key factors such as sex differences, voluntary alcohol intake protocols, and a highly replicable experimental design. Our results suggest that alcohol exposure in adolescence may increase both alcohol preference and consumption in adulthood, while also undermining normal body weight gain in a sex-dependent manner. Moreover, although these factors can commonly affect outbred rats, distinct sensitive subgroups may exist with heightened motivation for alcohol consumption despite the contingent response cost.

REFERENCES

- Altman, N. and M. Krzywinski (2016). "Analyzing outliers: influential or nuisance?" In: *Nature Methods* 13.4, pp. 281–283.
- American Psychiatric Association (2022). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed., text rev. Washington, DC: American Psychiatric Publishing.
- Blizard, D. A. et al. (2008). "Learning in the 2-bottle alcohol preference test". In: *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 32.12, pp. 2041–2046.
- Broadwater, M., E. I. Varlinskaya, and L. P. Spear (2011). "Chronic intermittent ethanol exposure in early adolescent and adult male rats: effects on tolerance, social behavior, and ethanol intake". In: *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 35.8, pp. 1392–1403.
- Domi, E. et al. (2021). "A neural substrate of compulsive alcohol use". In: *Science advances* 7.34, eabg9045.
- Elvig, S. K. et al. (2021). "Tolerance to alcohol: A critical yet understudied factor in alcohol addiction". In: *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 204, p. 173155.

- Filgueiras, G. B., E. F. Carvalho-Netto, and C. Estanislau (2014). "Aversion in the elevated plus-maze: role of visual and tactile cues". In: *Behavioural processes* 107, pp. 106–111.
- Flores-Bonilla, A. and H. N. Richardson (2020). "Sex differences in the neurobiology of alcohol use disorder". In: *Alcohol research: current reviews* 40.2, p. 04.
- Frey, J. et al. (2024). "Analyze as randomized—why dropping block effects in designed experiments is a bad idea". In: *Agronomy Journal* 116.3, pp. 1371–1381.
- Gass, J. T. et al. (2014). "Adolescent alcohol exposure reduces behavioral flexibility, promotes disinhibition, and increases resistance to extinction of ethanol self-administration in adulthood". In: *Neuropsychopharmacology* 39.11, pp. 2570–2583.
- Gottschalk, A., S. Scafidi, and T. J. Toung (2021). "Brain water as a function of age and weight in normal rats". In: *PLoS One* 16.9, e0249384.
- Greenfield, T. K. et al. (2023). "High intensity drinking (HID) assessed by maximum quantity consumed is an important pattern measure adding predictive value in higher and lower income societies for modeling alcohol-related problems". In: *International journal of environmental research and public health* 20.4, p. 3748.
- Hilderbrand, E. R. and A. W. Lasek (2017). "Studying sex differences in animal models of addiction: an emphasis on alcohol-related behaviors". In: *ACS chemical neuroscience* 9.8, pp. 1907–1916.
- Hingson, R. W., W. Zha, and A. M. White (2017). "Drinking beyond the binge threshold: predictors, consequences, and changes in the US". In: *American journal of preventive medicine* 52.6, pp. 717–727.
- Jeanblanc, J. et al. (2019). "Animal models of binge drinking: behavior and clinical relevance". In: *Neuroscience of Alcohol*. Elsevier, pp. 57–66.
- Jones, A. W. (2019). "Alcohol, its absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body and pharmacokinetic calculations". In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science* 1.5, e1340.
- Lands, W. E. (1998). "Alcohol, calories, and appetite". In: *Vitamins & Hormones* 54, pp. 31–49.
- Maddern, X. J. et al. (2024). "Sex differences in alcohol use: is it all about hormones?" In: *Endocrinology* 165.9, bqae088.
- Matthews, D. B. et al. (2008). "Chronic intermittent exposure to ethanol during adolescence produces tolerance to the hypnotic effects of ethanol in male rats: a dose-dependent analysis". In: *Alcohol* 42.8, pp. 617–621.
- Miech, R. A. et al. (2025). *Monitoring the Future National Survey Results on Drug Use, 1975–2024: Overview and Detailed Results for Secondary School Students*. Ann Arbor: Institute for Social Research, University of Michigan.
- Mirijello, A. et al. (2023). "Identification and management of acute alcohol intoxication". In: *European journal of internal medicine* 108, pp. 1–8.
- Nieto, S. J. et al. (2021). "Translational opportunities in animal and human models to study alcohol use disorder". In: *Translational psychiatry* 11.1, p. 496.
- Nunamaker, E. A. et al. (2021). "Developing recommendations for cumulative endpoints and lifetime use for research animals". In: *Animals* 11.7, p. 2031.
- Okuda, T. et al. (2018). "Metabolic pharmacokinetics of early chronic alcohol consumption mediated by liver alcohol dehydrogenases 1 and 3 in mice". In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 33.11, pp. 1912–1919.
- Patrick, M. E. et al. (2025). *Monitoring the Future Panel Study Annual Report: National Data on Substance Use Among Adults Ages 19 to 65, 1976–2024*. Ann Arbor: Institute for Social Research, University of Michigan.
- Patwell, R. et al. (2021). "An operant ethanol self-administration paradigm that discriminates between appetitive and consummatory behaviors reveals distinct behavioral phenotypes in commonly used rat strains". In: *Neuropharmacology* 201, p. 108836.
- Peregud, D., M. Stepanichev, and N. Gulyaeva (2021). "Drinking pattern in intermittent access two-bottle-choice paradigm in male Wistar rats is associated with exon-specific BDNF expression in the hippocampus during early abstinence". In: *Journal of molecular neuroscience* 71.2, pp. 262–275.
- Rigby, R. A. and D. M. Stasinopoulos (2005). "Generalized additive models for location, scale and shape". In: *Journal of the Royal Statistical Society Series C: Applied Statistics* 54.3, pp. 507–554.
- Salmanzadeh, H. et al. (2020). "Adolescent drug exposure: A review of evidence for the development of persistent changes in brain function". In: *Brain research bulletin* 156, pp. 105–117.
- Smith, M. A. (2020). "Nonhuman animal models of substance use disorders: Translational value and utility to basic science". In: *Drug and alcohol dependence* 206, p. 107733.
- Sotocina, S. G. et al. (2011). "The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions". In: *Molecular pain* 7, pp. 1744–8069.
- Spear, L. P. and H. S. Swartzwelder (2014). "Adolescent alcohol exposure and persistence of adolescent-typical phenotypes into adulthood: a mini-review". In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 45, pp. 1–8.
- Spear, L. (2000). "Modeling adolescent development and alcohol use in animals". In: *Alcohol Research & Health* 24.2, p. 115.
- Spear, L. P. (2018). "Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour". In: *Nature Reviews Neuroscience* 19.4, pp. 197–214.
- Spear, L. P. (2015). "Adolescent alcohol exposure: Are there separable vulnerable periods within adolescence?" In: *Physiology & behavior* 148, pp. 122–130.
- Towner, T. T. and E. I. Varlinskaya (2020). "Adolescent ethanol exposure: anxiety-like behavioral alterations, ethanol intake, and sensitivity". In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 14, p. 45.

- Venniro, M. et al. (2020). "Improving translation of animal models of addiction and relapse by reverse translation". In: *Nature Reviews Neuroscience* 21.11, pp. 625–643.
- Voelkl, B. et al. (2021). "The standardization fallacy". In: *Nat Methods* 18.1, pp. 5–7.
- Wukitsch, T. J. and M. E. Cain (2021). "The effects of voluntary adolescent alcohol consumption on alcohol taste reactivity in Long Evans rats". In: *Psychopharmacology* 238.6, pp. 1713–1728.
- Yuen, W. S. et al. (2020). "Adolescent alcohol use trajectories: risk factors and adult outcomes". In: *Pediatrics* 146.4.
- Zeiss, C. J. (2021). "Comparative milestones in rodent and human post-natal central nervous system development". In: *Toxicologic Pathology* 49.8, pp. 1368–1373.
- Zou, H. et al. (2009). "Chronic alcohol consumption from adolescence-to-adulthood in mice—effect on growth and social behavior". In: *Drug and alcohol dependence* 104.1-2, pp. 119–125.

REFERÊNCIAS

- BAKALINSKY, A. T.; PENNER, M. H. ALCOHOL | Properties and Determination. In: *ENCYCLOPEDIA of Food Sciences and Nutrition*. [S.l.]: Elsevier, 2003. P. 107–111.
- DUDLEY, R. On the Inebriation of Elephants. In: DUDLEY, R. (Ed.). **The Drunken Monkey: Why We Drink and Abuse Alcohol**. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press, 2014. cap. 4, p. 34–50.
- VALLÉE, B. L. Alcohol in Human History. In: *TOWARD a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse*. S.l.: Birkhäuser Basel, 1994. P. 1–8.
- LOPES, A. C. A. et al. New alcoholic fermented beverages—potentials and challenges. **Fermented beverages**, Elsevier, p. 577–603, 2019.
- BAKALINSKY, A.; PENNER, M. ALCOHOL | Properties and Determination. In: *ENCYCLOPEDIA of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. [S.l.]: Elsevier, 2003.
- BERRY, D. Alcoholic beverage fermentations. In: *FERMENTED beverage production*. [S.l.]: Springer, 1995. P. 32–44.
- ZINTZARAS, E. et al. Do alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms increase the risk of alcoholism and alcoholic liver disease? **Hepatology**, Wiley Online Library, v. 43, n. 2, p. 352–361, 2006.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 702, Ethanol**. PubChem. National Library of Medicine (US). 2025. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>>.
- KALANT, H. Absorption, diffusion, distribution, and elimination of ethanol: Effects on biological membranes. In: *THE Biology of Alcoholism: Volume 1: Biochemistry*. [S.l.]: Springer, 1971. P. 1–62.
- BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Farmacocinética. In: GOLAN, D. E. et al. (Ed.). **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. P. 71–131.
- CEDERBAUM, A. I. Alcohol metabolism. **Clinics in liver disease**, Elsevier, v. 16, n. 4, p. 667–685, 2012.
- LEE, S.-L. et al. Functional assessment of human alcohol dehydrogenase family in ethanol metabolism: significance of first-pass metabolism. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Wiley Online Library, v. 30, n. 7, p. 1132–1142, 2006.
- ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? **Alcohol research & health**, v. 29, n. 4, p. 245, 2006.

HERNÁNDEZ, J. A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, R. C.; RENDÓN-RAMÍREZ, A. Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. **Oxidative medicine and cellular longevity**, Wiley Online Library, v. 2016, n. 1, p. 1543809, 2016.

JONES, A. W. Alcohol, its absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body and pharmacokinetic calculations. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science**, Wiley Online Library, v. 1, n. 5, e1340, 2019.

EGERVARI, G. et al. Alcohol and the brain: from genes to circuits. **Trends in neurosciences**, Elsevier, v. 44, n. 12, p. 1004–1015, 2021.

HARRISON, N. L. et al. Effects of acute alcohol on excitability in the CNS. **Neuropharmacology**, Elsevier, v. 122, p. 36–45, 2017.

GRILLNER, S.; ROBERTSON, B. The basal ganglia over 500 million years. **Current Biology**, Elsevier, v. 26, n. 20, r1088–r1100, 2016.

GRILLNER, S.; ROBERTSON, B.; STEPHENSON-JONES, M. The evolutionary origin of the vertebrate basal ganglia and its role in action selection. **The Journal of physiology**, Wiley Online Library, v. 591, n. 22, p. 5425–5431, 2013.

PARK, J.; CODDINGTON, L. T.; DUDMAN, J. T. Basal ganglia circuits for action specification. **Annual Review of Neuroscience**, Annual Reviews, v. 43, n. 1, p. 485–507, 2020.

ROCHA, G. S. et al. Basal ganglia for beginners: the basic concepts you need to know and their role in movement control. **Frontiers in systems neuroscience**, Frontiers Media SA, v. 17, p. 1242929, 2023.

CHEN, W. et al. Prefrontal-subthalamic hyperdirect pathway modulates movement inhibition in humans. **Neuron**, Elsevier, v. 106, n. 4, p. 579–588, 2020.

LOVINGER, D. M.; ALVAREZ, V. A. Alcohol and basal ganglia circuitry: Animal models. **Neuropharmacology**, Elsevier, v. 122, p. 46–55, 2017.

CHENG, Y. et al. Distinct synaptic strengthening of the striatal direct and indirect pathways drives alcohol consumption. **Biological psychiatry**, Elsevier, v. 81, n. 11, p. 918–929, 2017.

ORGANIZATION, W. H. **Global status report on alcohol and health 2018**. [S.l.]: World Health Organization, 2018.

_____. **Global status report on alcohol and health and treatment of substance use disorders**. [S.l.]: World Health Organization, 2024.

BASTOS, F. et al. III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. **Rio de Janeiro: Fiocruz/ICICT**, v. 528, p. 2017, 2017.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5-TR**. Texto revisado. Porto Alegre: Artmed, 2023. Tradução da 5ª edição do original em inglês: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM-5-TR.

BARBERÍA-LATASA, M.; GEA, A.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A. Alcohol, drinking pattern, and chronic disease. **Nutrients**, MDPI, v. 14, n. 9, p. 1954, 2022.

ROLLAND, B. et al. Comparison between the WHO and NIAAA criteria for binge drinking on drinking features and alcohol-related aftermaths: Results from a cross-sectional study among eight emergency wards in France. **Drug and alcohol dependence**, Elsevier, v. 175, p. 92–98, 2017.

KUNTSCHE, E. et al. Binge drinking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. **Psychology & health**, Taylor & Francis, v. 32, n. 8, p. 976–1017, 2017.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM. NIAAA Council Approves Definition of Binge Drinking. **NIAAA Newsletter**, National Institute on Alcohol Abuse e Alcoholism, n. 3, 2004.

ESSER, M. B. et al. Estimated deaths attributable to excessive alcohol use among US adults aged 20 to 64 years, 2015 to 2019. **JAMA network open**, American Medical Association, v. 5, n. 11, e2239485–e2239485, 2022.

PLENS, J. A. et al. Patterns of alcohol consumption in Brazilian adults. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group UK London, v. 12, n. 1, p. 8603, 2022.

HINGSON, R. W.; ZHA, W.; WHITE, A. M. Drinking beyond the binge threshold: predictors, consequences, and changes in the US. **American journal of preventive medicine**, Elsevier, v. 52, n. 6, p. 717–727, 2017.

PATRICK, M. E.; AZAR, B. High-intensity drinking. **Alcohol research: current reviews**, v. 39, n. 1, p. 49, 2018.

PATRICK, M. E. A call for research on high-intensity alcohol use. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 40, n. 2, p. 256, 2016.

PATRICK, M. E.; PARKS, M. J.; PETERSON, S. J. High-intensity drinking and hours spent drinking. **Alcohol: Clinical and Experimental Research**, Wiley Online Library, v. 47, n. 11, p. 2081–2089, 2023.

CHUNG, T. et al. Adolescent binge drinking: Developmental context and opportunities for prevention. **Alcohol research: current reviews**, v. 39, n. 1, p. 5, 2018.

PATRICK, M. E. et al. Monitoring the Future Panel Study Annual Report: National Data on Substance Use among Adults Ages 19 to 65, 1976-2023. **Institute for Social Research**, ERIC, 2024.

GREENFIELD, T. K. et al. High intensity drinking (HID) assessed by maximum quantity consumed is an important pattern measure adding predictive value in higher and lower income societies for modeling alcohol-related problems. **International journal of environmental research and public health**, MDPI, v. 20, n. 4, p. 3748, 2023.

PATRICK, M. E. et al. Initiation of and escalation to high-intensity drinking in young adults. **JAMA pediatrics**, American Medical Association, v. 177, n. 3, p. 286–293, 2023.

BONAR, E. E. et al. High-intensity drinking among adolescent and emerging adult risky drinkers. **Substance abuse**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 43, n. 1, p. 713–721, 2022.

AMODEO, L. R. et al. Alcohol drinking during adolescence increases consumptive responses to alcohol in adulthood in Wistar rats. **Alcohol**, Elsevier, v. 59, p. 43–51, 2017.

SAWYER, S. M. et al. The age of adolescence. **The lancet child & adolescent health**, Elsevier, v. 2, n. 3, p. 223–228, 2018.

VETTER-O'HAGEN, C. S.; SPEAR, L. P. Hormonal and physical markers of puberty and their relationship to adolescent-typical novelty-directed behavior. **Developmental psychobiology**, Wiley Online Library, v. 54, n. 5, p. 523–535, 2012.

SPEAR, L. P.; SWARTZWELDER, H. S. Adolescent alcohol exposure and persistence of adolescent-typical phenotypes into adulthood: a mini-review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Elsevier, v. 45, p. 1–8, 2014.

ZEISS, C. J. Comparative milestones in rodent and human postnatal central nervous system development. **Toxicologic Pathology**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 49, n. 8, p. 1368–1373, 2021.

CABALLERO, A.; OROZCO, A.; TSENG, K. Y. Developmental regulation of excitatory-inhibitory synaptic balance in the prefrontal cortex during adolescence. In: ELSEVIER. **SEMINARS in Cell & Developmental Biology**. [S.l.: s.n.], 2021. v. 118, p. 60–63.

SALLING, M. C. et al. Alcohol consumption during adolescence in a mouse model of binge drinking alters the intrinsic excitability and function of the prefrontal cortex through a reduction in the hyperpolarization-activated cation current. **Journal of Neuroscience**, Society for Neuroscience, v. 38, n. 27, p. 6207–6222, 2018.

SPEAR, L. P. Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, Nature Publishing Group UK London, v. 19, n. 4, p. 197–214, 2018.

SALMANZADEH, H. et al. Adolescent drug exposure: A review of evidence for the development of persistent changes in brain function. **Brain research bulletin**, Elsevier, v. 156, p. 105–117, 2020.

POCHAPSKI, J. A. et al. Adolescent alcohol exposure persistently alters orbitofrontal cortical encoding of Pavlovian conditional stimulus components in female rats.

Scientific Reports, Nature Publishing Group UK London, v. 14, n. 1, p. 13775, 2024.

ELVIG, S. K. et al. Tolerance to alcohol: A critical yet understudied factor in alcohol addiction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Elsevier, v. 204, p. 173155, 2021.

GOLTSEKER, K.; HOPF, F. W.; BARAK, S. Advances in behavioral animal models of alcohol use disorder. **Alcohol**, Elsevier, v. 74, p. 73–82, 2019.

SMITH, M. A. Nonhuman animal models of substance use disorders: Translational value and utility to basic science. **Drug and alcohol dependence**, Elsevier, v. 206, p. 107733, 2020.

FROMMLET, F. Improving reproducibility in animal research. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group UK London, v. 10, n. 1, p. 19239, 2020.

RICHTER, S. H. Systematic heterogenization for better reproducibility in animal experimentation. **Lab animal**, Nature Publishing Group US New York, v. 46, n. 9, p. 343–349, 2017.

VOELKL, B. et al. Reproducibility of animal research in light of biological variation. **Nature Reviews Neuroscience**, Nature Publishing Group UK London, v. 21, n. 7, p. 384–393, 2020.

FESTING, M. F. The “completely randomised” and the “randomised block” are the only experimental designs suitable for widespread use in pre-clinical research. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group UK London, v. 10, n. 1, p. 17577, 2020.

VON KORTZFLEISCH, V. T. et al. Improving reproducibility in animal research by splitting the study population into several ‘mini-experiments’. **Scientific reports**, Nature Publishing Group UK London, v. 10, n. 1, p. 16579, 2020.

MATTHEWS, D. B. et al. Chronic intermittent exposure to ethanol during adolescence produces tolerance to the hypnotic effects of ethanol in male rats: a dose-dependent analysis. **Alcohol**, Elsevier, v. 42, n. 8, p. 617–621, 2008.

NAASSILA, M. **Biological Research on Addiction: Chapter 3. Alcohol and Rats**. [S.l.]: Elsevier Inc. Chapters, 2013.

MAJCHROWICZ, E. Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. **Psychopharmacologia**, Springer, v. 43, n. 3, p. 245–254, 1975.

- SOTOCINA, S. G. et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Molecular pain**, Sage Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 7, p. 1744–8069, 2011.
- WESSELMANN, U. et al. Uterine inflammation as a noxious visceral stimulus: behavioral characterization in the rat. **Neuroscience Letters**, Elsevier, v. 246, n. 2, p. 73–76, 1998.
- ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P. A. Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. **Pain**, Elsevier, v. 90, n. 1-2, p. 65–74, 2001.
- _____. Evaluation of a short duration behaviour-based post-operative pain scoring system in rats. **European Journal of Pain**, Elsevier, v. 7, n. 5, p. 397–406, 2003.
- NUNAMAKER, E. A. et al. Developing recommendations for cumulative endpoints and lifetime use for research animals. **Animals**, MDPI, v. 11, n. 7, p. 2031, 2021.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals**. Washington, DC: The National Academies Press, 2009.
- SOMKUWAR, S. S. et al. Abstinence from prolonged ethanol exposure affects plasma corticosterone, glucocorticoid receptor signaling and stress-related behaviors. **Psychoneuroendocrinology**, Elsevier, v. 84, p. 17–31, 2017.
- NIETO, S. J. et al. Translational opportunities in animal and human models to study alcohol use disorder. **Translational psychiatry**, Nature Publishing Group UK London, v. 11, n. 1, p. 496, 2021.
- PEARTREE, N. A. et al. Limited physical contact through a mesh barrier is sufficient for social reward-conditioned place preference in adolescent male rats. **Physiology & behavior**, Elsevier, v. 105, n. 3, p. 749–756, 2012.
- CARNICELLA, S.; RON, D.; BARAK, S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. **Alcohol**, Elsevier, v. 48, n. 3, p. 243–252, 2014.
- DOMI, E. et al. Neurobiology of alcohol seeking behavior. **Journal of Neurochemistry**, Wiley Online Library, v. 157, n. 5, p. 1585–1614, 2021.
- REINAGEL, P. Training rats using water rewards without water restriction. **Frontiers in behavioral neuroscience**, Frontiers Media SA, v. 12, p. 84, 2018.
- SIMMS, J. A. et al. Long-Evans rats acquire operant self-administration of 20% ethanol without sucrose fading. **Neuropsychopharmacology**, Nature Publishing Group, v. 35, n. 7, p. 1453–1463, 2010.
- VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; SPANAGEL, R. The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice. **Alcohol**, Elsevier, v. 48, n. 3, p. 313–320, 2014.

KOSKELA, M. et al. Female C57BL/6J mice show alcohol-seeking behaviour after withdrawal from prolonged alcohol consumption in the social environment. **Alcohol and Alcoholism**, Oxford University Press, v. 57, n. 4, p. 405–412, 2022.

QUIJANO CARDÉ, N. A.; DE BIASI, M. Behavioral characterization of withdrawal following chronic voluntary ethanol consumption via intermittent two-bottle choice points to different susceptibility categories. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Wiley Online Library, v. 46, n. 4, p. 614–627, 2022.

FILGUEIRAS, G. B.; CARVALHO-NETTO, E. F.; ESTANISLAU, C. Aversion in the elevated plus-maze: role of visual and tactile cues. **Behavioural processes**, Elsevier, v. 107, p. 106–111, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES. **Resolução CONCEA nº 37, de 15 de fevereiro de 2018: Dispõe sobre a prática de eutanásia em animais**. Brasília, DF: MCTIC, 2018.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2024. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

WICKHAM, H.; BRYAN, J. **readxl: Read Excel Files**. [S.l.], 2023. R package version 1.4.3. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=readxl>>.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. [S.l.]: Springer-Verlag New York, 2016. ISBN 978-3-319-24277-4. Disponível em: <<https://ggplot2.tidyverse.org>>.

SIEVERT, C. **Interactive Web-Based Data Visualization with R, plotly, and shiny**. [S.l.]: Chapman e Hall/CRC, 2020. ISBN 9781138331457. Disponível em: <<https://plotly-r.com>>.

AUGUIE, B. **gridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid"Graphics**. [S.l.], 2017. R package version 2.3. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=gridExtra>>.

ATTALI, D.; BAKER, C. **ggExtra: Add Marginal Histograms to 'ggplot2', and More 'ggplot2' Enhancements**. [S.l.], 2023. R package version 0.10.1. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=ggExtra>>.

WICKHAM, H. et al. **dplyr: A Grammar of Data Manipulation**. [S.l.], 2023. R package version 1.1.4. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>>.

WICKHAM, H.; VAUGHAN, D.; GIRLICH, M. **tidyr: Tidy Messy Data**. [S.l.], 2024. R package version 1.3.1. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=tidyr>>.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern Applied Statistics with S**. Fourth. New York: Springer, 2002. ISBN 0-387-95457-0. Disponível em: <<https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>>.

FOX, J.; WEISBERG, S. **An R Companion to Applied Regression**. Third. Thousand Oaks CA: Sage, 2019. Disponível em: <<https://www.john-fox.ca/Companion/>>.

KASSAMBARA, A. **ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots**. [S.l.], 2023. R package version 0.6.0. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>>.

SALVISBERG, M. **StMoSim: Quantile-Quantile Plot with Several Gaussian Simulations**. [S.l.], 2018. R package version 3.1.1. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=StMoSim>>.

BATES, D. et al. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, n. 1, p. 1–48, 2015. DOI: 10.18637/jss.v067.i01.

KUZNETSOVA, A.; BROCKHOFF, P. B.; CHRISTENSEN, R. H. B. lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. **Journal of Statistical Software**, v. 82, n. 13, p. 1–26, 2017. DOI: 10.18637/jss.v082.i13.

LÜDECKE, D. et al. performance: An R Package for Assessment, Comparison and Testing of Statistical Models. **Journal of Open Source Software**, v. 6, n. 60, p. 3139, 2021. DOI: 10.21105/joss.03139.

NIEUWENHUIS, R.; TE GROTENHUIS, M.; PELZER, B. influence.ME: Tools for Detecting Influential Data in Mixed Effects Models. **R Journal**, v. 4, n. 2, p. 38–47, 2012.

LENTH, R. V. **emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means**. [S.l.], 2024. R package version 1.10.5. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>>.

BROOKS, M. E. et al. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. **The R Journal**, v. 9, n. 2, p. 378–400, 2017. DOI: 10.32614/RJ-2017-066.

HARTIG, F. **DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models**. [S.l.], 2024. R package version 0.4.7. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>>.

RIGBY, R. A.; STASINOPOULOS, D. M. Generalized additive models for location, scale and shape. **Journal of the Royal Statistical Society Series C: Applied Statistics**, Oxford University Press, v. 54, n. 3, p. 507–554, 2005.

STASINOPOULOS, M.; RIGBY, R. **gamlss.dist: Distributions for Generalized Additive Models for Location Scale and Shape**. [S.l.], 2023. R package version 6.1-1. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=gamlss.dist>>.

ENEA, M. et al. **gamlss.inf: Fitting Mixed (Inflated and Adjusted) Distributions**. [S.l.], 2025. R package version 1.0-2. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=gamlss.inf>>.

- CEBECI, Z. Comparison of Internal Validity Indices for Fuzzy Clustering. **Journal of Agricultural Informatics**, n. 2, p. 1–14, 2019. DOI: 10.17700/jai.2019.10.2.537.
- SPOELDER, M. et al. Individual differences in voluntary alcohol intake in rats: relationship with impulsivity, decision making and Pavlovian conditioned approach. **Psychopharmacology**, Springer, v. 234, n. 14, p. 2177–2196, 2017.
- ESTANISLAU, C. Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. **Psychology & Neuroscience**, SciELO Brasil, v. 5, p. 105–112, 2012.
- RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. et al. Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. **Journal of statistical modeling and analytics**, v. 2, n. 1, p. 21–33, 2011.
- GHASEMI, A.; ZAHEDIASL, S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. **International journal of endocrinology and metabolism**, v. 10, n. 2, p. 486, 2012.
- MORETTIN, P.; BUSSAB, W. O. Estatística Básica. 6 «ed. **São Paulo: Editora Saraiva**, v. 210, p. 2, 2010.
- WARTON, D. I. Global simulation envelopes for diagnostic plots in regression models. **The American Statistician**, Taylor & Francis, v. 77, n. 4, p. 425–431, 2023.
- CORDEIRO, G. M.; DEMÉTRIO, C. G. B.; MORAL, R. d. A. Modelos lineares generalizados e aplicações. **São Paulo: Blucher**, 2024.
- MELO, M. B. de et al. Beyond ANOVA and MANOVA for repeated measures: Advantages of generalized estimated equations and generalized linear mixed models and its use in neuroscience research. **European Journal of Neuroscience**, Wiley Online Library, v. 56, n. 12, p. 6089–6098, 2022.
- HUBBARD, A. E. et al. To GEE or not to GEE: comparing population average and mixed models for estimating the associations between neighborhood risk factors and health. **Epidemiology**, LWW, v. 21, n. 4, p. 467–474, 2010.
- BOLKER, B. M. et al. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. **Trends in ecology & evolution**, Elsevier, v. 24, n. 3, p. 127–135, 2009.
- SCHIELZETH, H.; NAKAGAWA, S. Nested by design: model fitting and interpretation in a mixed model era. **Methods in Ecology and Evolution**, Wiley Online Library, v. 4, n. 1, p. 14–24, 2013.
- FREY, J. et al. Analyze as randomized—why dropping block effects in designed experiments is a bad idea. **Agronomy Journal**, Wiley Online Library, v. 116, n. 3, p. 1371–1381, 2024.

- PEKÁR, S.; BRABEC, M. Generalized estimating equations: A pragmatic and flexible approach to the marginal GLM modelling of correlated data in the behavioural sciences. **Ethology**, Wiley Online Library, v. 124, n. 2, p. 86–93, 2018.
- MADDEN, L. V.; OJIAMBO, P. S. The value of generalized linear mixed models for data analysis in the plant sciences. **Frontiers in Horticulture**, Frontiers Media SA, v. 3, p. 1423462, 2024.
- BOLKER, B. M. Linear and generalized linear mixed models. **Ecological statistics: contemporary theory and application**, Oxford University Press Oxford, v. 2015, p. 309–333, 2015.
- STASINOPOULOS, M. et al. **Flexible Regression and Smoothing: The GAMLSS Packages in R**. [S.l.], jul. 2015.
- DOMI, E. et al. A neural substrate of compulsive alcohol use. **Science advances**, American Association for the Advancement of Science, v. 7, n. 34, eabg9045, 2021.
- PATWELL, R. et al. An operant ethanol self-administration paradigm that discriminates between appetitive and consummatory behaviors reveals distinct behavioral phenotypes in commonly used rat strains. **Neuropharmacology**, Elsevier, v. 201, p. 108836, 2021.
- GIULIANO, C. et al. Evidence for a long-lasting compulsive alcohol seeking phenotype in rats. **Neuropsychopharmacology**, Nature Publishing Group, v. 43, n. 4, p. 728–738, 2018.

Anexos

ANEXO A – OF. CIRC. CEUA Nº 042/2023



OF. CIRC. CEUA Nº 042/2023

Londrina, 27 de abril de 2023.

Prezado(a) professor(a),

Certificamos que o projeto intitulado: **“Efeitos longitudinais da intoxicação alcoólica na adolescência sobre consumo voluntário, breakpoint e autoadministração do etanol na vida adulta em modelo de Transtorno por Uso de Álcool em ratos Wistar machos e fêmeas”** protocolo CEUA nº 021.2023 sob a responsabilidade de **Celio Roberto Estanislau** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em **26/04/2023**.

Este projeto tem por objetivo investigar efeitos da intoxicação alcoólica na adolescência em comportamentos característicos do Transtorno por Uso de Álcool na vida adulta em ratos Wistar machos e fêmeas. **Grau de invasividade: G2.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	27/04/2023 a 27/04/2026
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	138, sendo: Machos – 69 Fêmeas – 69
Peso/ Idade	40-60g/25 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue e fígado

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Profª Drª **Patrícia Chumil Perandini**
Coordenadora da CEUA/UEL

Imo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a). Celio Roberto Estanislau

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento/CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/CCB

C/C para o Biotério Central/CCB