



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**ALTERAÇÕES NO COMPORTAMENTO MOTOR  
E NA BIOQUÍMICA OXIDATIVA DE RATAS INTOXICADAS  
AGUDAMENTE COM ETANOL NO PERÍODO INICIAL DA  
ADOLESCÊNCIA**

**Antonio José Cerasi Junior**

BELÉM – PA

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

**ALTERAÇÕES NO COMPORTAMENTO MOTOR E NA**  
**BIOQUÍMICA OXIDATIVA DE RATAS INTOXICADAS**  
**AGUDAMENTE COM ETANOL NO PERÍODO INICIAL DA**  
**ADOLESCÊNCIA**

Autor: Antonio José Cerasi Junior

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Maia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, área de concentração: Avaliação Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA

2015

**Antonio José Cerasi Junior**

**ALTERAÇÕES NO COMPORTAMENTO MOTOR E NA  
BIOQUÍMICA OXIDATIVA DE RATAS INTOXICADAS  
AGUDAMENTE COM ETANOL NO PERÍODO INICIAL DA  
ADOLESCÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, área de concentração: Avaliação Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane do Socorro Ferraz Maia  
Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro  
Instituição: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará.  
Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carolina Heitmann Mares Azevedo  
Instituição: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará.  
Assinatura: \_\_\_\_\_

BELÉM – PA

2015

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio Cerasi e Suely Cerasi (in memoriam) que serão sempre a razão da minha vida.

.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pela Sua graça e misericórdia que me permitiu sentir suas mãos me sustentando nos momentos em que pensei que não teria forças para concluir este trabalho.

À minha mãe Suely Cerasi (*in memorian*) pelo incentivo constante e pelo investimento emocional, seus ensinamentos serão levados comigo por todos os dias.

Ao meu pai Antonio Cerasi (*in memorian*) pelo apoio e incentivo em todas as escolhas que fiz e pelo apoio financeiro dedicado aos meus estudos.

À minha esposa Carolina Cerasi, grande amor da minha vida, por estar sempre ao meu lado durante as horas mais difíceis, sua presença no decorrer da realização deste trabalho foi minha fonte de energia.

Aos meus filhos que sempre me alegraram com suas conversas divertidas em momentos de muito cansaço e que me motivaram para a conclusão deste trabalho.

À minha irmã Jane Cerasi por se orgulhar e torcer pelo meu sucesso. À minha irmã Lucy Cerasi pelo amor, carinho e solicitude em todas as horas que pedi ajuda.

Aos meus sogros Emir e Leda El-Husny, pelas palavras de incentivo e apoio que foram essenciais nessa difícil caminhada.

Aos amigos e familiares de perto e de longe, que tornaram meus dias mais felizes em alguns momentos de descontração durante esta jornada.

À minha orientadora a professora Dr.<sup>a</sup> Cristiane Maia, meu especial agradecimento pelo apoio, rigidez e exemplo de competência e dedicação. Sua orientação possibilitou meu crescimento científico e o retorno para uma vida acadêmica que havia me deixado saudade.

Ao professor Enéas Fontes pela paciência e ensinamentos para realização dos experimentos. Aos colegas do LAFICO que sempre estiveram me apoiando, em especial a Luanna Fernandes que me incentivou e orientou nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal do Pará pela oportunidade e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho. Enfim, a todos que contribuíram o meu muito obrigado!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

## RESUMO

### ALTERAÇÕES NO COMPORTAMENTO MOTOR E NA BIOQUÍMICA OXIDATIVA DE RATAS INTOXICADAS AGUDAMENTE COM ETANOL NO PERÍODO INICIAL DA ADOLESCÊNCIA.

O etanol é uma das substâncias psicoativas mais consumidas pelos jovens e geralmente este consumo ocorre em episódios de *binge*, uma forma eventual e intensa de beber seguida por um período de abstinência. No Brasil os índices de abuso de álcool por adolescentes do sexo feminino têm aumentado nos últimos anos. Esta população é mais sensível aos efeitos neurotóxicos desta substância uma vez que o completo desenvolvimento de estruturas como o cerebelo ocorre nesta etapa da vida. O consumo agudo e crônico do etanol e o seu catabolismo estão associados com alterações neurocomportamentais e na geração de espécies reativas ao oxigênio e outros metabólitos. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos em ratas no início da adolescência após exposição ao EtOH no padrão *binge* agudo. Ratas adolescentes (n= 20, n=10 animais por grupo) receberam, por gavagem, água destilada ou EtOH (3 g/kg/dia, 20 p/v) por 3 dias consecutivos. Sete horas e meia após o último dia de administração foram realizados os testes comportamentais da atividade locomotora espontânea e rotarod, posteriormente os animais foram sacrificados para retirada do cerebelo e realização dos testes da bioquímica oxidativa no tecido cerebelar. Os ensaios comportamentais demonstraram que o *binge* agudo em ratas no início da adolescência não produziu alterações na atividade locomotora espontânea, porém foi identificada alteração no aprendizado motor. Nos testes da bioquímica oxidativa os resultados demonstraram uma elevada atividade da catalase, o que demonstra que houve uma compensação do organismo para reverter a produção de ERO's em cerebelos de ratas adolescentes expostas agudamente ao EtOH por um curto período de tempo seguido de abstinência (*binge*).

**Palavras-chave:** adolescente; *binge*; bioquímica oxidativa; cerebelo, ensaios comportamentais; etanol.

## ABSTRACT

### MOTOR BEHAVIOR AND OXIDATIVE BIOCHEMISTRY ALTERATIONS IN RATS SUBJECTED TO ACUTE INTOXICATION WITH ETHANOL DURING THE INITIAL ADOLESCENCE PERIOD

Ethanol (EtOH) is one of the most commonly psychoactive substances consumed by young people, usually occurring in episodes of binge consumption, which is an intense form of drinking followed by a period of abstinence. In Brazil, the rates of alcohol abuse by female adolescents have increased in the past few years. This population is more sensitive to the neurotoxic effects of this substance since the complete development of structures such as the cerebellum occurs in this stage of life. Acute and chronic consumption of ethanol and its catabolism are associated with motor behavior alterations so as the generation of reactive oxygen species (ROS) and other metabolites. The purpose of this study was to investigate the effects of EtOH exposure following an acute binge pattern in female rats on their early adolescence (n = 20, n = 10 animals per group) received distilled water or EtOH (3 g / kg / day, 20 w / v) by gavage, for 3 consecutive days. Seven and a half hours after the last day of administration, the behavioral tests of spontaneous locomotor activity and rotarod were performed. Subsequently, the animals were sacrificed for cerebellum removal and the oxidative biochemical tests in cerebellar tissue were carried out. Behavioral tests showed that acute binge in rats on early adolescence did not alter spontaneous locomotor activity, but elicited alterations in motor learning. Oxidative biochemical results showed a high activity of catalase, which demonstrates that there was an offset of the body to reverse the ROS production in the cerebellum of adolescent rats acutely exposed to EtOH followed by a withdrawal period (*binge*).

**Keywords:** adolescent; binge; oxidative biochemistry; cerebellum; behavioral assays; ethanol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 –  | Espectro do consumo de EtOH total per capita.....  | 15 |
| Figura 2 –  | Distribuição por doença dos óbitos atribuídos ao consumo de EtOH em 2012.....  | 18 |
| Figura 3 –  | Registro do consumo de EtOH em binge.....  | 19 |
| Figura 4 –  | Vista inferior do cerebelo.....  | 22 |
| Figura 5 –  | Sistema motor – vias aferentes e eferentes.....  | 23 |
| Figura 6 –  | Representação das células do córtex cerebelar.....   | 24 |
| Figura 7 –  | Delineamento experimental do estudo.....   | 31 |
| Figura 8 –  | Efeito do etanol (EtOH) em forma de <i>binge</i> agudo na atividade locomotora/ exploratória de ratas na fase de adolescência através da distância total percorrida.....                             | 37 |
| Figura 9 –  | Efeito do etanol (EtOH) na forma de <i>binge</i> agudo na coordenação motora de ratas adolescentes avaliadas no teste do rotarod.....  | 38 |
| Figura 10 – | Efeito da intoxicação aguda com EtOH em forma de binge sobre a concentração de nitrito em tecido cerebelar de ratas adolescentes.....  | 39 |
| Figura 11 – | Efeito da intoxicação aguda com EtOH em forma de binge sobre a concentração de peroxidação lipídica em tecido cerebelar de ratas adolescentes.....   | 40 |
| Figura 12 - | Efeito da intoxicação aguda com etanol em forma de <i>binge</i> sobre a atividade da catalase em tecido cerebelar de ratas adolescentes.....   | 41 |
| Tabela 1 –  | Consumo de EtOH total per capita e prevalência de episódio de beber pesado (%) no total da população com 15 anos ou mais de idade e entre os bebedores (15 anos +) por região da OMS e do mundo..... | 16 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |  |
|---------------|--|
| <b>ATP</b>    | Adenosina trifosfato   |
| <b>AUDs</b>   | Transtornos por uso de álcool  |
| <b>CAS</b>    | Concentração de álcool no sangue   |
| <b>CAT</b>    | Catalase   |
| <b>CEPAE</b>  | Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação                                    |
| <b>CID</b>    | Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde          |
| <b>DNA</b>    | Ácido desoxiribonucleico   |
| <b>EO</b>     | Estresse oxidativo   |
| <b>E.P.M</b>  | Erro padrão da média   |
| <b>Erp29</b>  | Proteína do Retículo Endoplasmático 29   |
| <b>Erp60</b>  | Proteína do Retículo Endoplasmático 60   |
| <b>EtOH</b>   | Etanol   |
| <b>FAS</b>    | Síndrome alcoólica fetal   |
| <b>GSH-Px</b> | Glutathiona peroxidase selênio dependente  |
| <b>HA</b>     | Hidroxicarbonos  |
| <b>INPAD</b>  | Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas em Álcool e outras Drogas |
| <b>LAFICO</b> | Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento                                 |
| <b>LENAD</b>  | Levantamento Nacional de Álcool e Drogas   |
| <b>MDA</b>    | Molonaldeído   |
| <b>NMFI</b>   | N-metil-2-fenilindol   |
| <b>OMS</b>    | Organização Mundial de Saúde   |
| <b>RE</b>     | Retículo Endoplasmático  |
| <b>RNA</b>    | Ácido ribonucleico   |
| <b>ROS</b>    | <i>Reactive Oxygen Species</i>   |
| <b>rpm</b>    | Rotações por minuto  |
| <b>SOD1</b>   | Superóxido dismutase 1   |
| <b>SPA</b>    | Substâncias psicoativas  |
| <b>SNC</b>    | Sistema Nervoso Central  |

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

|                                  |                        |
|----------------------------------|------------------------|
| l                                | Litros                 |
| g                                | Gramas                 |
| mg                               | Miligramas             |
| kg                               | Quilogramas            |
| O <sup>2-</sup>                  | radical superóxido     |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>    | Peróxido de hidrogênio |
| μm                               | Micrômetros            |
| nm                               | Nanômetros             |
| μl                               | Microlitros            |
| λ                                | Lâmbida                |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | água destilada         |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>I INTRODUÇÃO</b> .....  | 13 |
| 1.1 Álcool e epidemiologia.....  | 14 |
| 1.2 Álcool e seus efeitos.....   | 20 |
| 1.3 Cerebelo e função motora.....  | 22 |
| 1.4 Estresse Oxidativo e álcool.....   | 25 |
| <b>II OBJETIVOS</b> .....  | 27 |
| 2.1 Objetivo geral.....  | 28 |
| 2.2 Objetivos específicos.....   | 28 |
| <b>III METODOLOGIA</b> .....   | 29 |
| 3.1 Animais e tratamento.....  | 30 |
| 3.2 Ensaios comportamentais.....   | 31 |
| 3.2.1 Teste do campo aberto.....   | 32 |
| 3.2.2 Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (teste do rotarod)... | 32 |
| 3.3 Estresse oxidativo.....  | 33 |
| 3.3.1 Preparação das amostras.....   | 33 |
| 3.3.2 Determinação dos níveis de nitrito.....                                | 33 |
| 3.3.3 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica.....                   | 34 |
| 3.3.4 Atividade da catalase.....   | 34 |
| 3.3.5 Determinação dos níveis de proteína.....                               | 35 |
| 3.4 Análise Estatística.....   | 35 |
| <b>IV RESULTADOS</b> .....   | 36 |
| 4.1 Atividade locomotora espontânea.....                                     | 37 |
| 4.2 Teste do rotarod.....  | 38 |
| 4.3 Níveis de Nitrito.....   | 39 |
| 4.4 Níveis de Peroxidação Lipídica.....                                      | 40 |
| 4.5 Atividade da Catalase  | 41 |
| <b>V DISCUSSÃO</b> .....   | 42 |
| <b>VI CONCLUSÃO</b> .....  | 48 |
| <b>VII REFERÊNCIAS</b> .....   | 50 |
| <b>VIII ANEXOS</b> .....   | 61 |

---

# I INTRODUÇÃO

---

## 1.1 ÁLCOOL E EPIDEMIOLOGIA

A ingestão de bebidas alcoólicas é comum em muitos países, afetando pessoas de uma grande variedade de raças, cultura e perfis sócioepidemiológicos. Este consumo está associado a muitos aspectos da vida social e cultural, como parte dos rituais de celebração festiva e de socialização. Muitas vezes o hábito de consumir bebidas alcoólicas é visto como uma atividade prazerosa por gerar efeitos de curto prazo que são valorizados positivamente, como alegria, euforia, relaxamento, desinibição e melhora de humor. Estudos comprovam que o EtOH é uma substância tóxica, que pode produzir dependência e é um dos principais fatores de morbidade e mortalidade na população mundial (ROERECKE e REHM, 2012).

O etanol (EtOH) é uma das substâncias psicoativas mais consumidas pelos jovens, ainda que a venda de bebidas alcoólicas para menores de 18 anos seja proibida legalmente no Brasil (BRASIL, 1990). O uso desta droga entre os adolescentes é um tema bastante discutido no meio social e acadêmico.

A definição do conceito de consumo normal pelos sistemas classificatórios ainda apresenta discordâncias, porém a *American Academy of Pediatrics* classifica o envolvimento de adolescentes com substâncias psicoativas (SPA) em seis estágios: i) Abstinência, ii) uso experimental/recreacional, iii) abuso inicial, iv) abuso, v) dependência, vi) e recuperação (PECHANSKY et al. 2004).

O consumo de EtOH é mensurado por meio de indicadores como: i) consumo de álcool puro per capita em litros por ano, ii) e consumo de álcool puro per capita em gramas por dia, sendo que este segundo pode ser obtido a partir do primeiro e está entre os mais utilizados. . A Organização Mundial de Saúde (OMS) se refere em seus relatórios de indicadores relacionados ao EtOH, à população entre 15 e 19 anos como população de adolescentes. Avaliar os indicadores sem levar em consideração a proporção de jovens e adultos para o conjunto de pessoas que bebem, significaria subestimar a população adulta nos países em desenvolvimento (OMS, 2014).

Os últimos dados da OMS demonstram em nível global, que indivíduos acima de 15 anos de idade ingerem em média 6,2 litros de álcool puro por ano ou 13,5

gramas de álcool etílico puro por dia, porém os altos níveis de consumo são encontrados em países desenvolvidos, principalmente na Europa e América (OMS, 2014) (Figura 1).

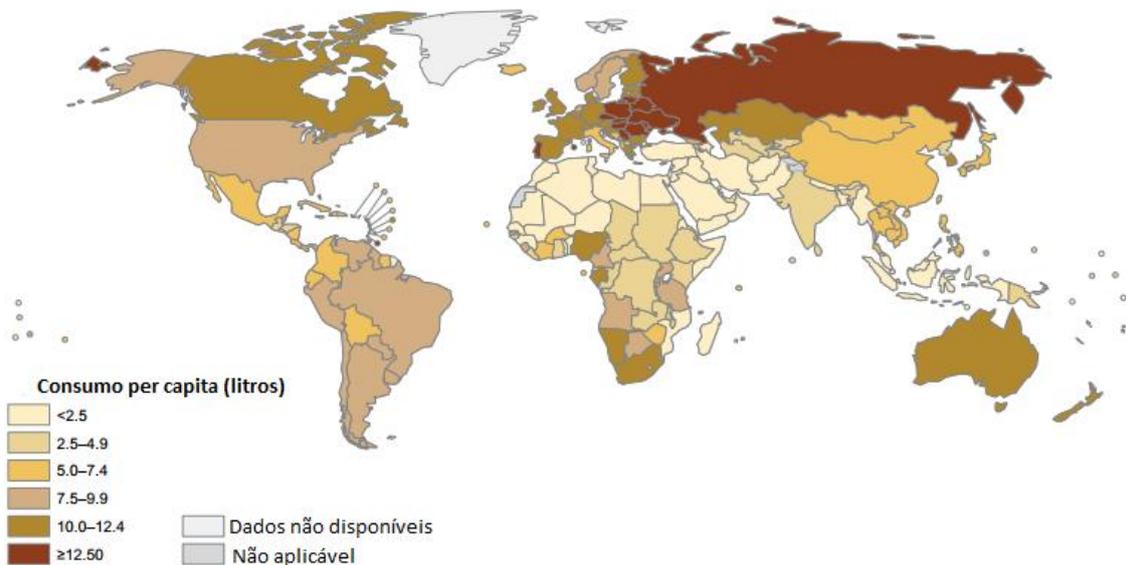


Figura 1 – Consumo de álcool total per capita (15 anos ou mais; em litros de álcool puro), 2010.

Fonte – Adaptado da OMS, 2014.

Medir padrões de consumo de EtOH e contabilizar com precisão o impacto que esta substância provoca na saúde das pessoas é mais complexo que simplesmente determinar a quantidade de EtOH ingerida (REHM et al. 2009). O uso nocivo do EtOH é um dos fatores de risco para morbidade, mortalidade e incapacidade em todo o mundo, porém existem alguns poucos países com os menores padrões de risco no consumo de EtOH, estes países estão na Europa meridional e ocidental. Os hábitos de beber que representam maior risco foram encontrados na Rússia e na Ucrânia (OMS, 2014).

Crianças, adolescentes e idosos são geralmente mais vulneráveis a danos associados ao consumo de um determinado volume de EtOH do que outros grupos etários (HILTON, 1987; MIDANIK e CLARK, 1995; MAKELA e MUSTONEN, 2000). Além disso, o início precoce do uso de EtOH (antes dos 14 anos de idade) é um indicador que está associado ao aumento do risco para a dependência de EtOH e

abuso em idades posteriores (GRANT e DAWSON, 1997; GOMES-LEAL et al. 1998; DEWIT et al. 2000; KRAUS et al. 2000, SARTOR et al. 2007).

Uma proporção maior de ingestão de EtOH pelos jovens ocorre em episódios de consumo pesado (US SURGEON GERAL, 2007) que também pode ser definido como consumo em *binge*, uma forma de beber eventual e intensa em um curto período de tempo, seguido por um período de abstinência (CREGO et al. 2010; PETIT et al. 2013, JACOBUS e TAPERT, 2013). De acordo com o Instituto Nacional sobre Abuso de Álcool e Alcoolismo dos EUA, encontrar uma concentração de 0,08g de EtOH no sangue após o consumo de álcool, caracteriza a forma de beber em *binge*, o equivalente a cinco ou mais doses para pessoas do sexo masculino em um período de duas horas ou quatro doses ou mais para pessoas do sexo feminino em um mesmo período (NIAAA, 2004).

É importante notar que houve uma diminuição no consumo de EtOH por adolescentes em vários países da região europeia e no Oeste da Região do Pacífico, possibilitando uma diminuição na prevalência estimada de consumidores da droga atuais, apesar de um ligeiro aumento em todas as outras regiões pesquisadas pela OMS (tabela 1).

| REGIÕES DO MUNDO      | Entre todos (15+ anos) |                             | Entre os que bebem (15+ anos) |                             |
|-----------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
|                       | TOTAL PER CAPITA       | % beber pesado <i>binge</i> | TOTAL PER CAPITA              | % beber pesado <i>binge</i> |
| REGIÃO AFRICANA       | 6.0                    | 5.7                         | 19.5                          | 16.4                        |
| REGIÃO DAS AMÉRICAS   | 8.4                    | 13.7                        | 13.6                          | 22.0                        |
| MEDITERRÂNEO ORIENTAL | 0.7                    | 0.1                         | 11.3                          | 1.6                         |
| EUROPA                | 10.9                   | 16.5                        | 16.8                          | 22.9                        |
| SUDESTE DA ÁSIA       | 3.4                    | 1.6                         | 23.1                          | 12.4                        |
| PACÍFICO OCIDENTAL    | 6.8                    | 7.7                         | 15.0                          | 16.4                        |
| MUNDO                 | 6.2                    | 7.5                         | 17.2                          | 16.0                        |

Tabela 1 – consumo de álcool total per capita (em litros de álcool puro) e prevalência de episódico de beber pesado (%) no total da população com 15 anos ou mais de idade (15 + anos) e entre os bebedores (15 + anos) por região da OMS e do mundo, 2010.

Fonte – Adaptado da OMS, 2014.

Monitorar custos é importante, pois fornece informações essenciais relativas às consequências sociais do consumo de EtOH. Há uma crescente conscientização

sobre o impacto significativo deste consumo nos indivíduos e na saúde pública global. Os dados econômicos dos custos diretos são derivados dos registros das principais instituições de resposta à sociedade para os problemas, como hospitais, sistemas de saúde, sistema policial e justiça penal, além dos sistemas de segurança social (ANDERSON e BAUMBERG, 2006; THAVORNCHAROENSAP et al. 2009; BOUCHERY et al. 2011). Estes dados representam apenas 9-24% de todos os custos sociais atribuídos ao EtOH (VAN GILS et al. 2010). A segunda grande categoria são os custos indiretos, resultado da perda de produtividade devido ao absenteísmo, desemprego, diminuição da produção, redução de ganhos potenciais e anos de trabalho perdidos devido à pensão ou morte prematura (ANDERSON et al. 2006; THAVORNCHAROENSAP et al. 2009) são normalmente suportados pela sociedade em geral. A perda na produtividade da força de trabalho pode afetar a viabilidade econômica de uma sociedade inteira (SALA et al. 2002).

Uma terceira categoria é a de custos intangíveis, atribuídos à dor e sofrimento e mais geralmente a uma diminuição na qualidade de vida. Custos estes que são suportados pelos consumidores, bem como pelas suas famílias e por outros indivíduos ligados ao mesmo (ANDERSON e BAUMBERG, 2006; THAVORNCHAROENSAP et al. 2009).

Em relação ao gênero, a vulnerabilidade das mulheres para os efeitos nocivos do EtOH é um importante problema de saúde pública. Seu consumo tem aumentado progressivamente neste grupo de acordo com o desenvolvimento econômico e mudanças nos papéis de gênero (GRUCZA et al. 2008; WILSNACK, 2013). Em países de baixa e alta renda essas diferenças são geralmente menores comparados a países de renda média (OMS, 2014).

Um percentual de 5,9% de todas as mortes globais em 2012 foi atribuído ao EtOH, maior do que a proporção de mortes por HIV / AIDS (2,8%), violência (0,9%) ou tuberculose (1,7%). O percentual de mortes entre os homens (7,6%) foi maior do que entre as mulheres (4,0%). Esta diferença no percentual de morte entre os gêneros é um indicador da diferença que existe no padrão de consumo tanto em volume de EtOH ingerido como no hábito de beber pesado. Para as mulheres as mortes por doenças cardiovasculares são as mais prevalentes enquanto que para os

homens, lesões são a causa mais comum de danos provocados pelo EtOH (OMS, 2014).

O uso nocivo do EtOH é responsável pela causa de mais de 200 doenças e condições de agravamento de saúde no mundo, tal como descrito na Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID) Revisão 10 (OMS, 2014) (Figura 2).

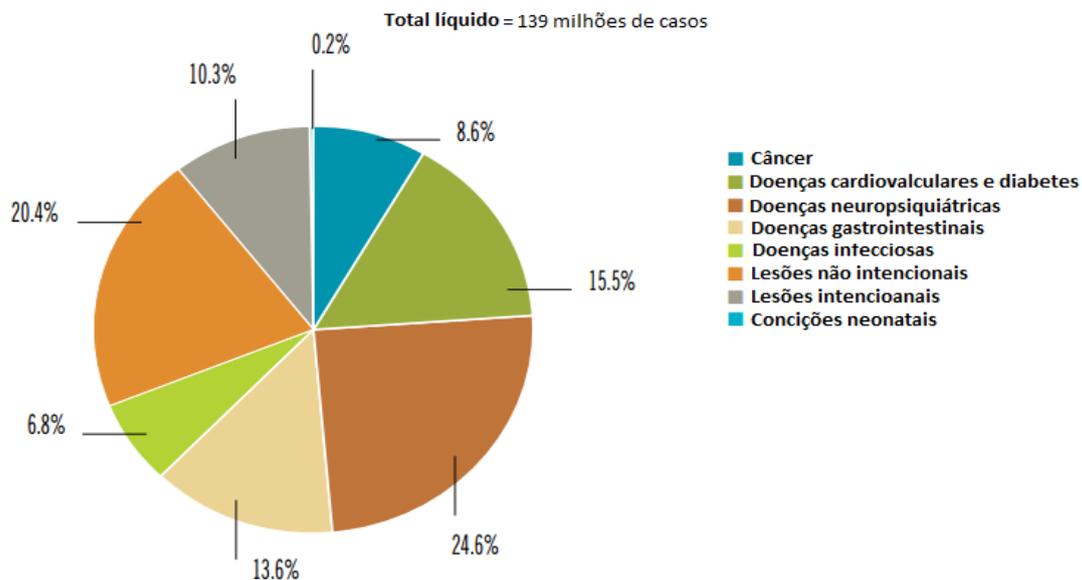


Figura 2 – Distribuição por doença dos óbitos atribuídos ao consumo de álcool em 2012.

Fonte – Adaptado da OMS, 2014.

Além de transtornos por uso de álcool (AUDs) e síndrome alcoólica fetal (FAS), que são definidos como sendo totalmente atribuíveis ao consumo de EtOH, as patologias hepáticas constituem o terceiro maior percentual de prevalência de doença atribuível ao EtOH (50%), na qual é um percentual importante, uma vez que estas doenças encontram-se entre as 20 maiores causas de morte no mundo (REHM e SHILD, 2013).

Para a maioria das mortes ou doenças que ocorrem em decorrência do uso do EtOH, menos de 20% do total são de fato atribuídas ao consumo desta substância, o que implica em uma percepção equivocada do público em relação aos fatores de risco envolvidos no etilismo. Como exemplo, pode-se citar que do total de 25% dos casos de câncer, 4% são atribuíveis ao EtOH em todo o mundo. O EtOH contribui também para a prevalência de cerca de 10% de doenças como

tuberculose, epilepsia, acidente vascular cerebral e doenças cardíacas no mundo (OMS, 2014).

Em países em desenvolvimento e de baixa renda per capita como Brasil e China, o consumo de EtOH representa um grande problema para a saúde (HARRISON e GARDINER, 1999).

No Brasil, o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas em Álcool e Outras Drogas (INPAD), realizou o segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (II LENAD), divulgando resultados sobre as tendências do consumo de EtOH entre 2006 e 2012 em 149 municípios sorteados, onde 4.607 participantes de 14 anos ou mais foram entrevistados. Os resultados destes levantamentos demonstraram que embora não tenha aumentado a quantidade de pessoas etilistas, aqueles que já bebiam passaram a beber mais e com maior frequência e entre adultos, 32% (21,8 milhões de pessoas) referiram não serem capazes de parar depois de começar a beber. As mulheres, especialmente as mais jovens, são a população em maior risco, apresentando aumento nos índices na forma mais nociva do consumo (Figura 3).

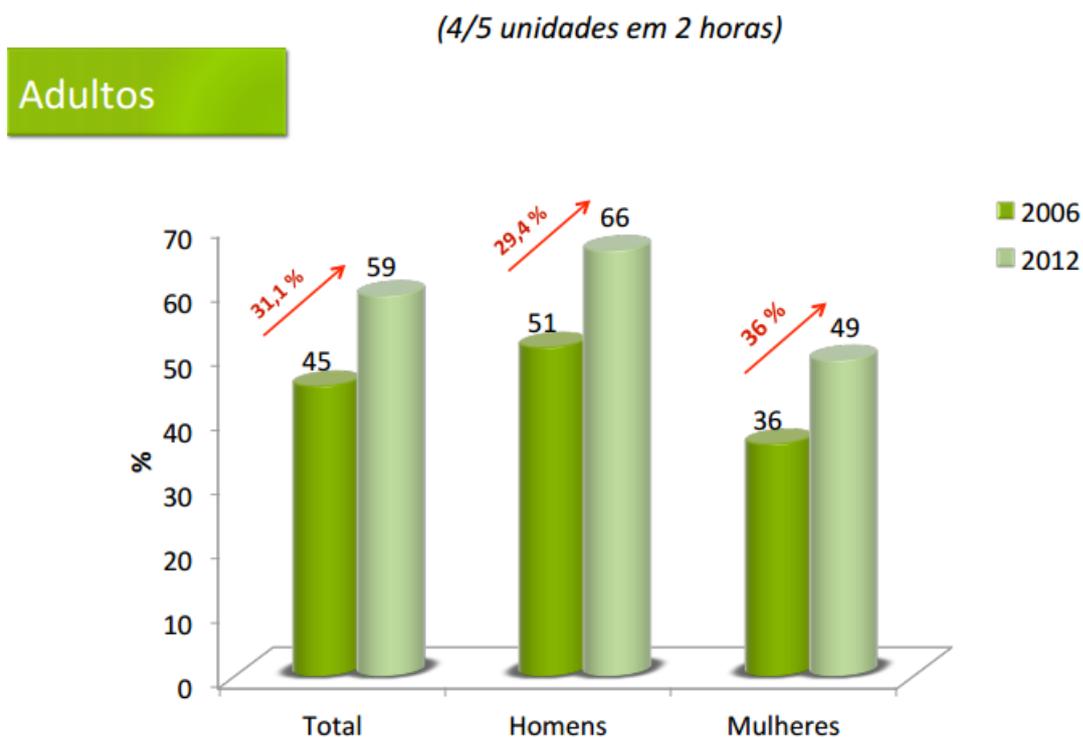


Figura 3 – Registro do Consumo do EtOH em *binge* (4 a 5 unidades em duas horas).

Fonte – Adaptado do II LENAD, 2013.

Mulheres, principalmente as adolescentes, são consideradas um grupo de risco por apresentarem um padrão mais nocivo de consumo de EtOH devido às altas doses e frequência de ingestão (LARANJEIRA et al. 2013). O abuso de EtOH na adolescência contribui para um aumento na incidência neste padrão de consumo entre mulheres na fase adulta (STRONG et al. 2010). Diferenças fisiológicas entre os gêneros reforçam a preocupação com as mulheres, que pode ocorrer tanto pela menor quantidade da enzima álcool-desidrogenase e baixo volume de água no organismo, levando a um aumento nas concentrações de EtOH no sangue (WOLLE et al. 2011; OSHIMA et al. 2013), como pela presença de hormônios femininos que podem influenciar no aumento do consumo desta droga na fase adulta quando este consumo é iniciado na adolescência (STRONG et al. 2010; MELON, 2013). Quando o abuso etílico se inicia na adolescência ocorrem prejuízos mais evidentes e devastadores, especialmente no SNC, podendo resultar em alterações estruturais, fisiológicas e funcionais (CHAMBERS et al. 2003; DOREMUS et al. 2004).

## 1.2 ÁLCOOL E SEUS EFEITOS

O EtOH é uma molécula apolar, representado pela fórmula química  $C_2H_5OH$ , com uma coloração que varia de transparente a escuro quase opaco, sendo a sua via de administração mais comum a oral (LIEBER e ABITTAN, 1999). Depois de ingerido, 20% desta substância são absorvidas no estômago e 80% no intestino delgado. Fatores como alimentos podem diminuir ou retardar a absorção e conseqüentemente a concentração de álcool no sangue (CAS), uma vez que diminui a superfície de absorção do estômago, o que leva a uma diminuição dos efeitos da exposição aguda a esta droga (SARASA-RENEDO et al. 2014).

A distribuição alcoólica nos tecidos ocorre proporcionalmente ao volume de água encontrado no organismo, o que justifica o motivo de que depois de ingerido, ocorre uma maior concentração no tecido de mulheres que possui menor volume de água do que de homens. O EtOH atravessa a barreira hematoencefálica e a placenta, pode ser excretado no leite materno, além de atingir os pulmões. Aproximadamente 95-98% da substância ingerida é metabolizada e o restante é eliminado através da urina, fezes, suor e com o ar exalado (SARASA-RENEDO et al., 2014).

Dentre os fatores que interferem na metabolização do EtOH estão o tamanho do fígado, peso e composição de massa corporal, tolerância ao EtOH e variações na expressão dos genes que codificam as enzimas metabólicas. Existem fatores tais como a açúcares, que podem acelerar a remoção alcoólica e outros, tais como contraceptivos orais, que podem retardar a metabolização desta substância (EDENBERG, 2007). Embora o EtOH seja considerado um depressor do SNC que leva a um déficit psicomotor, cognitivo e ansiolítico, esta substância também gera efeitos desinibitórios como aumento da frequência cardíaca e comportamento agressivo (HERMENS et al. 2013).

Os efeitos imediatos mais evidentes são a sensação de relaxamento, bem-estar e desinibição. No entanto, com a continuação do consumo, esses efeitos são compensados por outros desagradáveis, tais como a redução das habilidades cognitivas (raciocínio), sensorial (audição, visão) e motora (da fala, da coordenação motora fina, reação lenta, fraqueza muscular), além de vertigem, desequilíbrio, náuseas e vômitos, podendo chegar à inconsciência e coma (CLIMENT et al. 2012; ESPERT e GADEA, 2012).

O EtOH pode induzir e aumentar o risco de outros transtornos mentais como depressão, ansiedade e esquizofrenia podendo comprometer os tratamentos para estes tipos de transtornos através de interações medicamentosas ou das alterações funcionais e estruturais provocadas por esta droga no cérebro desde a fase embrionária até a adulta (SULLIVAN et al. 2005.; KOSKINEN et al. 2009; DI FLIORO et al. 2014).

Estudos apontam para a capacidade que o EtOH possui em alterar a estrutura das membranas lipídicas, aumentando a sua fluidez, dada sua propriedade lipofílica. As consequências neurofisiológicas desta ação ainda não estão bem definidas (WONG et al. 2008). O consumo agudo e crônico e o catabolismo do EtOH, estão associados com a geração de espécies reativas de oxigênio e outros produtos metabólicos, que pode conduzir ao dano oxidativo em estruturas e moléculas celulares, incluindo fosfolipídios e DNA (BROOKES, 2004).

Mudanças estruturais em tecidos do SNC provocadas pelo consumo de EtOH podem ser observadas. Dentre estas há a atrofia cerebelar, que ocorre com maior

frequência na porção superior anterior do cerebelo, sendo a morte e/ou atrofia das células de Purkinje a principal característica neuropatológica encontrada em alcoólicos humanos. Estas células são ricas em canais de cálcio e torna o cerebelo o principal alvo da degeneração induzida pelo EtOH, apesar de outros estudos demonstrarem que outras áreas centrais tem apresentado perda de volume (JAATINEN e RINTALA, 2008).

### 1.3 CEREBELO E FUNÇÃO MOTORA

O cerebelo, também conhecido como pequeno cérebro, sobrepõe-se à face posterior da ponte e do bulbo, ocupando a maior parte da fossa posterior do crânio. Embora represente aproximadamente 10% do volume cerebral, contém cerca de 50% de todos os neurônios do cérebro (MARGOLIS, 2001). Esta estrutura cerebral é dividida nos lobos (Figura 4): anterior, posterior e floculonodular e pode ser dividido em hemisférios: Vermis, hemisfério intermediário (paravermal) e hemisfério lateral (SCHMAHMANN et al. 1999).

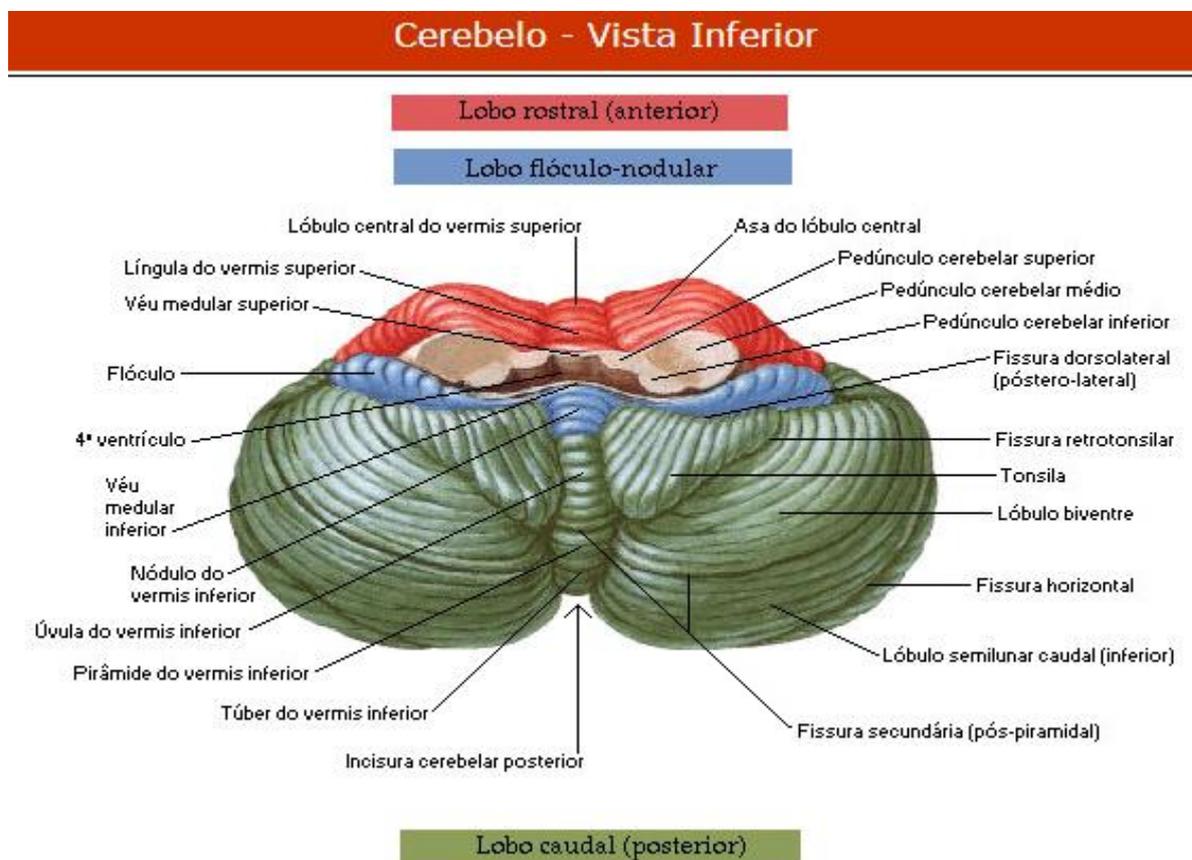


Figura 4 – Cerebelo: Vista Inferior do cerebelo  
Fonte: Adaptado de NETTER, 2000.

O cerebelo é ligado à haste do cérebro se comunicando através de três pares de grandes feixes de fibras de nervos, os pendúnculos cerebelares superior, médio e inferior. A partir do córtex cerebelar, as informações eferentes convergem para três pares de núcleos profundos do cerebelo, o denteado, o interpósito e o fastigial, responsáveis pelo planejamento do movimento, controle dos membros e equilíbrio motor de onde são projetados feixes para os núcleos vestibulares e reticulares (VOOGD e RUIGROK, 2004).

Todos os núcleos cerebelares profundos recebem sinais de duas fontes que são o córtex cerebelar e os tratos sensoriais profundos aferentes para o cerebelo. As vias aferentes que transmitem sinais para o cerebelo podem se originar de partes periféricas do corpo (Figura 5). Uma via aferente importante e extensa é a via corticopontocerebelar que se origina nos córtices motor e pré-motor cerebrais e no córtex somatossensorial cerebral (FITZPATRICK et al. 2008).

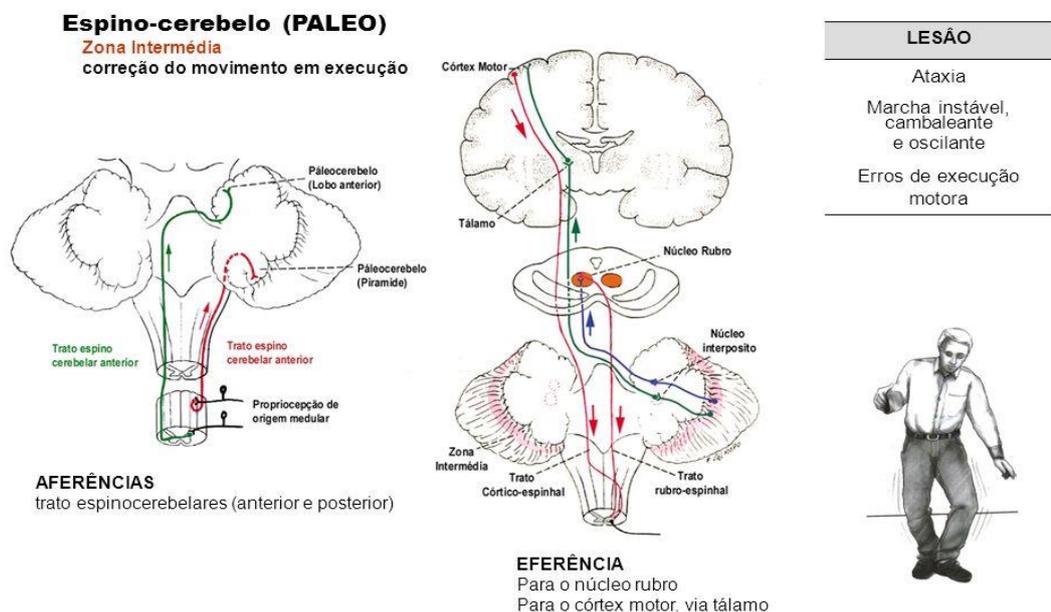


Figura 5 – Sistema motor – vias aferentes e eferentes.  
Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/363280>

Histologicamente, o córtex cerebelar se divide em três camadas distintas: a camada molecular que é mais externa composta basicamente por células estreladas e células em cesto, assim como por fibras paralelas e dendritos de células de Purkinje (BOTTA et al. 2007); a camada intermediária que é a camada de neurônios ou células de Purkinje, que constitui os maiores neurônios do SNC (VOOGD e GLICKSTEIN, 1998; O'HEARN e MOLIVER, 2001; VOOGD e RUIGROK, 2004); e a camada granular que é a camada mais interna e é constituída por uma grande quantidade de células pequenas (granulares ou granulosas) que dão origem às fibras paralelas através das suas ramificações, por células maiores (células de Golgi) e pelas fibras musgosas. Abaixo das camadas corticais estão os núcleos cerebelares profundos que enviam sinais de saída para outras partes do sistema nervoso. (FITZPATRICK et al. 2008; GLICKSTEIN, 1988; O'HEARN e MOLLIVER, 2001). Toda essa complexa estrutura cerebelar (figura 6) é susceptível aos efeitos do EtOH.

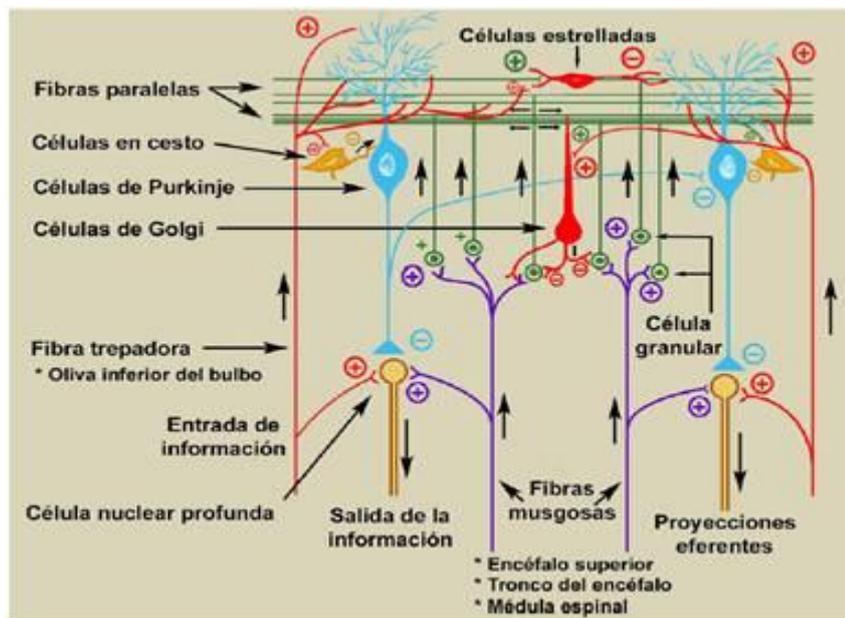


Figura 6 – Representação das células do córtex cerebelar

Fonte: [http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/7\\_cerebelo\\_archivos/Page417.htm](http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/7_cerebelo_archivos/Page417.htm)

## 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ÁLCOOL

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção exacerbada de radicais livres que são espécies químicas que contém um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos, se tornando altamente reativas e o sistema de defesa antioxidante (STOCKER e KEANEY, 2004). Entre os radicais livres mais importantes estão as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (ILHAN et al. 2005). As principais ERO's são o radical ânion superóxido ( $O^{2-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), e as principais ERNs são o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (APRIOKU, 2013).

Toxicidade de substâncias e algumas doenças podem desencadear a produção de ERO's e de ERN's. As células produzem radicais livres através da cadeia respiratória mitocondrial, porém mecanismos enzimáticos e não enzimáticos conhecidos como agentes antioxidantes auxiliam no combate e reparação dos danos ocasionados pelos processos oxidantes, removendo intermediários gerados através das espécies reativas anteriormente citadas ou inibindo outras reações de oxidação (D'AUTRAUX e TOLEDANO, 2007).

Modificação de lipídios de membranas, oxidação de aminoácidos e ácidos nucléicos, apoptose e necrose são os danos mais comuns provocados pela ação das EROs (BOMFIM et al. 2014). Os radicais livres reagem irreversivelmente com vários constituintes celulares, tais como proteínas, ligações duplas de fosfolípidos, DNA nuclear, induzindo a alterações na homeostase de íons, na sinalização celular e na expressão gênica (DURUKAN e TATLISUMAK, 2007). No DNA, o ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA (DURUKAN e TATLISUMAK, 2007).

Água, moléculas lipossolúveis antioxidantes e enzimas de reparação são componentes endógenos antioxidantes (RYTER e CHOI, 2005). A produção de EROs pode ser regulada através do sistema enzimático que inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD) 1, enzimas glutatona peroxidase selênio dependente (GSH-Px) e a catalase. A enzima SOD age sobre radical superóxido ( $O^{2-}$ ) que é transformado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que por sua vez é convertido em

água pelas duas últimas enzimas (GSH-Px e catalase) (MOREIRA et al., 2010). Um cofator da GSH-Px é o selênio que estimula a ação de enzimas antioxidantes por ser um carreador temporário de oxigênio (CHEN et al., 2009).

O sistema antioxidante de moléculas é outro mecanismo de proteção fisiológico contra a ação dos radicais livres. Vitaminas A, E e C que são moléculas de baixo peso molecular, além do beta caroteno e ácido úrico, são capazes de reagir diretamente com os radicais livres diminuindo sua reatividade (MOREIRA et al. 2010). Este sistema de defesa se torna um excelente protetor contra a lipoperoxidação em ambas as fases da bicamada de lipídios das biomembranas (BARCLAY et al. 1995).

Diante do exposto e em decorrência do aumento nos índices na forma mais nociva de consumo de EtOH por mulheres, em maior escala as mais jovens, é importante investigar as alterações que o etilismo precoce e agudo pode provocar no comportamento motor e na bioquímica oxidativa no tecido cerebelar de ratas fêmeas simulando um padrão de ingestão socialmente adotado por pessoas do sexo feminino nessa faixa etária.

---

---

## **II OBJETIVOS**

---

---

## 2.1 Objetivo Geral

Investigar as alterações bioquímicas e no comportamento motor cerebelares de ratas submetidas à intoxicação com EtOH na adolescência.

## 2.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar o efeito da exposição ao EtOH na forma de *binge* agudo na atividade locomotora espontânea de ratas adolescentes;

b) Avaliar o efeito da exposição ao EtOH no modelo de intoxicação aguda na coordenação motora e equilíbrio de ratas adolescentes;

c) Avaliar os níveis de nitrito e malondialdeído no cerebelo de ratas adolescentes intoxicadas agudamente com EtOH;

d) Avaliar a atividade da catalase no cerebelo de ratas adolescentes intoxicadas agudamente com EtOH.

---

## **III METODOLOGIA**

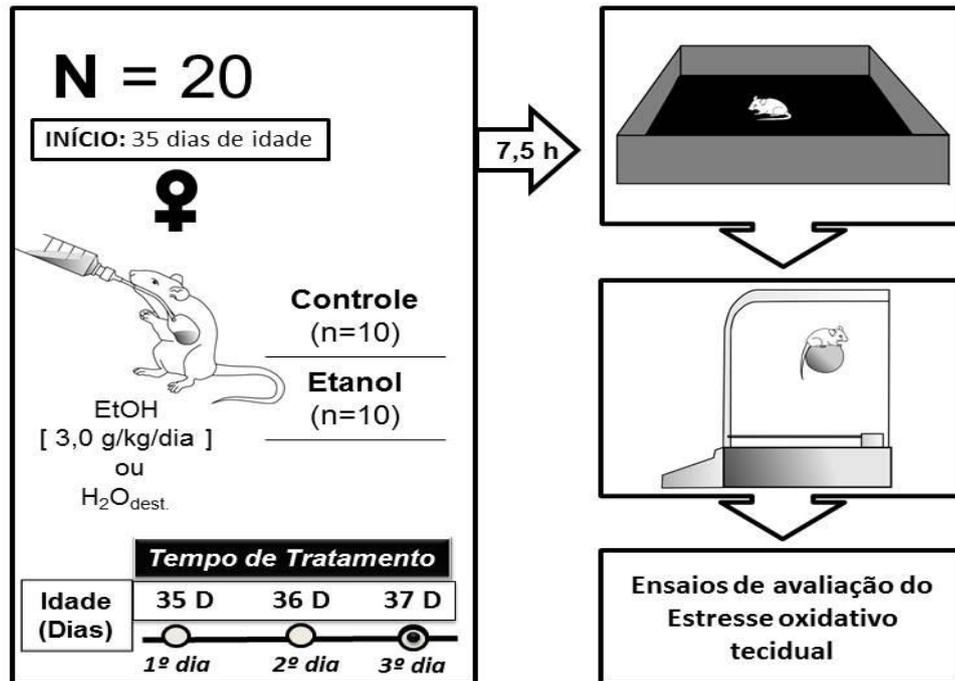
---

### 3.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Ratas Wistar, fêmeas (n= 20), 1 mês, peso de  $\pm$  60 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará (UFPA), foram mantidas em condições padronizadas de temperatura (25°C), exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum*. Os animais utilizados nos experimentos receberam tratamento por gavagem através de cânula orogástrica (Insight, Brasil) com EtOH (Nuclear, Brasil) na dose de 3,0 g/Kg/dia por três dias consecutivos em 1 episódio de *binge*/dia (35º ao 37º dia), o que corresponde ao início da adolescência neste modelo animal (SPEAR, 2000; 2004). Os animais controle receberam água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) administrada também por gavagem. As doses utilizadas foram adaptadas de protocolos utilizados por Lauing et al. 2008 e Lindtner et al. 2013.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE), obedecendo aos critérios, de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais, recebendo a aprovação através do parecer CEPAE-UFPA: BIO 196-14. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (LAFICO) da Faculdade de Farmácia e em parceria com o Laboratório de Farmacologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, todos na UFPA.

O desenho experimental está descrito na figura 7.



**Figura 5:** Delineamento experimental do estudo. Inicialmente as ratas adolescentes (35 dias de vida) receberam por gavagem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ou etanol (EtOH) durante 3 dias consecutivos. Sete horas e meia (7,5 h) após o terceiro dia de administração, os animais foram submetidos aos ensaios comportamentais do campo aberto e rotarod. Em seguida, os cerebelos foram coletados e submetidos aos ensaios da avaliação dos níveis de nitrito, peroxidação lipídica, proteína e atividade de catalase.

### 3.2 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Antes do início dos experimentos, os animais foram conduzidos à sala de teste por um período de, no mínimo, uma hora para aclimatação e habituação ao ambiente do teste. Todos os experimentos comportamentais foram realizados em sala própria, com atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação (12 lx).

A concentração sanguínea de EtOH em ratos, administrado por gavagem, possui um declínio gradual e dura em torno de 450 minutos para ser eliminado do organismo (LIVY et al. 2003), dessa forma, os testes foram realizados 7,5 horas (sete horas e trinta minutos) após a última administração de EtOH/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, não excedendo o horário de 18 horas a fim de não interferir no ciclo circadiano do animal.

### 3.2.1 Teste do campo aberto

Este teste desenvolvido por Hall (1934) é utilizado para analisar padrões de atividade exploratória e locomotora, no qual é capaz de qualificar a deambulação, avaliando componentes de ansiedade do animal, por meio de variáveis como o aumento na ambulação e maior permanência do mesmo na região central do aparato que seria indicativo de uma redução da ansiedade (LISTER, 1990, CHOLERIS et al., 2001).

Normalmente o procedimento consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como locomoção (número de linhas cruzadas), frequência de *rearings*, tempo de autolimpeza (*grooming*), defecação, tempo utilizado para deixar a área central.

Para este estudo, foi utilizada uma arena quadrada em madeira (100 x 100 cm) e paredes (40 cm de altura), internamente em fórmica impermeável preta. O chão do aparato foi dividido em 25 quadrantes iguais (20 x 20 cm) separados em duas zonas: central (36%) e periférica (64%).

Inicialmente os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto sendo permitido o livre deslocamento dentro do aparato por 5 minutos, seus movimentos ao longo da sessão foram registrados através de filmadora posicionada acima da arena. De acordo com o protocolo de Brenes et al. (2009), foi mensurada a locomoção total através da mensuração da distância percorrida (em metros) medida automaticamente usando o sistema de monitoramento de vídeo ANY-maze<sup>TM</sup> versão 4.99 (Stoelting Co., USA).

Antes e depois da exposição de cada animal, o campo aberto foi limpo com papel toalha e álcool 10%. Após o teste da atividade locomotora, os animais foram submetidos ao teste do rotarod.

### 3.2.2 Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (teste do rotarod)

Para avaliar a função motora dos roedores foi utilizado o rotarod que é um dos testes mais utilizados por ser considerado um dos mais sensíveis. Neste ensaio foi utilizado um equipamento automatizado (Insight®, EF-411), instalado em uma

sala fechada e mantida à temperatura de aproximadamente 25°C. O aparelho consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8 cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do chão, e mantido em rotação através de um motor, a caixa é dividida em 4 baias de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo a análise de 4 animais simultaneamente.

Os animais foram previamente treinados no aparato, sendo colocados no eixo giratório por um período de 120 segundos a 8 rotações por minuto. Neste treinamento os animais foram reposicionados no eixo giratório após as quedas até a finalização do tempo estipulado para esta fase. Terminado o treino, o teste foi realizado conforme o protocolo de Slamberová et al. (2006), onde os animais foram submetidos a três exposições de 120 segundos, com intervalo de 60 segundos entre cada exposição, sendo registrado o número de quedas do animal sobre a barra de rolagem do rotarod.

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, posteriormente foram coletados os cerebelos dos animais para os testes do balanço oxidativo.

### 3.3 ESTRESSE OXIDATIVO

#### 3.3.1 Preparo das amostras

Para a coleta das amostras para a análise da bioquímica oxidativa, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Posteriormente foi realizada a decapitação para a retirada dos cerebelos, localizados na fossa posterior do crânio. Os cerebelos foram lavados com solução fisiológica, crioprotetidos e armazenados em freezer.

#### 3.3.2 Determinação dos níveis de Nitrito

Após degelo lento os lisados dos cerebelos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi separado e submetido a mensuração da concentração de nitrito, prática fundamentada na formação de compostos azoicos de cor azulada pela reação do nitrito com o reagente de GRIESS (Naftil-etileno-diamina

0,1% e Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% - 1:1). A intensidade da cor é proporcional à concentração do cromógeno, sendo que a verificação ocorre por leitura espectrofotométrica em um  $\lambda = 550\text{nm}$  (GREEN et al. 1981). Os resultados foram expressos como micromoles de nitrito para cada miligrama de proteínas.

### 3.3.3 Determinação dos níveis de Peroxidação Lipídica

Os lisados foram descongelados lentamente, centrifugados a 5.600 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante submetido a análise após serem aquecidos a 45°C por 40 minutos. Foram utilizados como reagente 325  $\mu\text{L}$  de NMFI a 10,3 mM diluído em 650  $\mu\text{L}$  de metanol (diluição 3:1) e ácido metanosulfônico. O nível de peroxidação lipídica foi determinado através do método proposto por Esterbauer e Cheeseman (1990), baseado na reação dos metabólitos de ácidos graxos poliinsaturados, malonaldeído (MDA) e 4-hidroxicineno (4-HA), com o N-metil-2-fenilindol (NMFI) em presença de ácido metanosulfônico. A reação produz um cromóforo estável, cuja coloração é proporcional à concentração de lipídios oxidados, podendo ser mensurado por espectrofotometria ( $\lambda = 570\text{ nm}$ ). Os resultados expressos como picomoles de MDA por miligrama de proteína.

### 3.3.4 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase é mediada pela metodologia de Aebi (1984) baseada na decomposição de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). As amostras homogeneizadas em solução fisiológica foram centrifugadas a 16.000G por 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram homogeneizados em 600  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato de potássio (TFK) a 10 mM com pH 7,6 e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A leitura foi realizada no espectrofotômetro com comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em unidades de atividade de catalase por miligrama de proteína (U/mg de proteína). Uma unidade da atividade da enzima é definida como 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogênio consumido por minuto.

### 3.3.5 Determinação dos níveis de Proteína

Para esta análise, utilizou-se o método proposto por Bradford (1976) adaptado para leitor de ELISA onde 100 $\mu$ L da amostra de tecido são misturados com 100  $\mu$ L do reagente de Bradford. A concentração de proteína foi medida espectrofotometricamente ( $\lambda=595\text{nm}$ ) e os resultados expressos em miligramas de proteínas. Para a construção da curva padrão foram utilizadas albumina sérica bovina (BSA) na concentração de 2 mg/mL.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados pelo teste t de *Student* de dados não pareados. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) de 9-13 animais de cada grupo experimental. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de  $p<0,05$ . A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0.

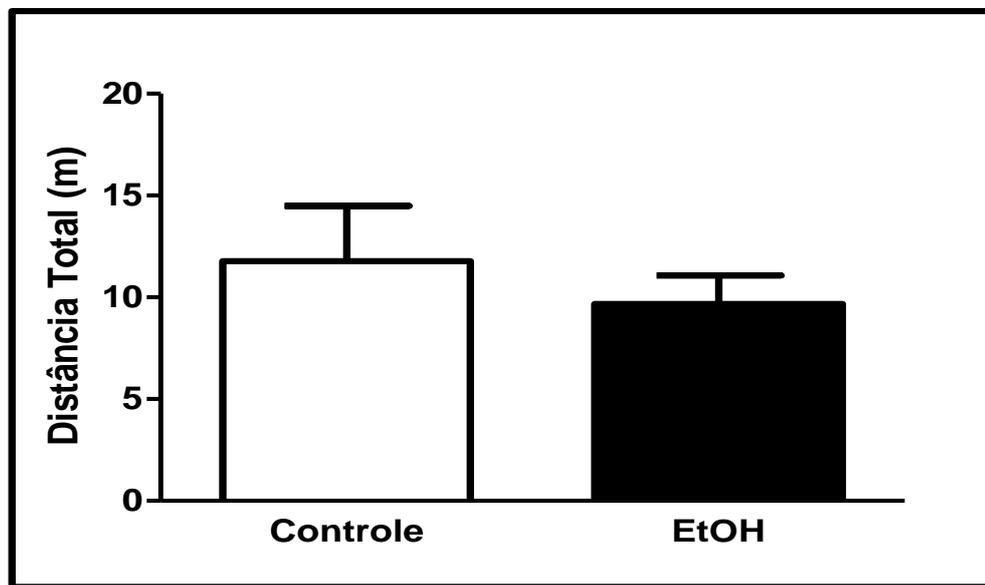
---

## **IV RESULTADOS**

---

#### 4.1 Atividade locomotora espontânea

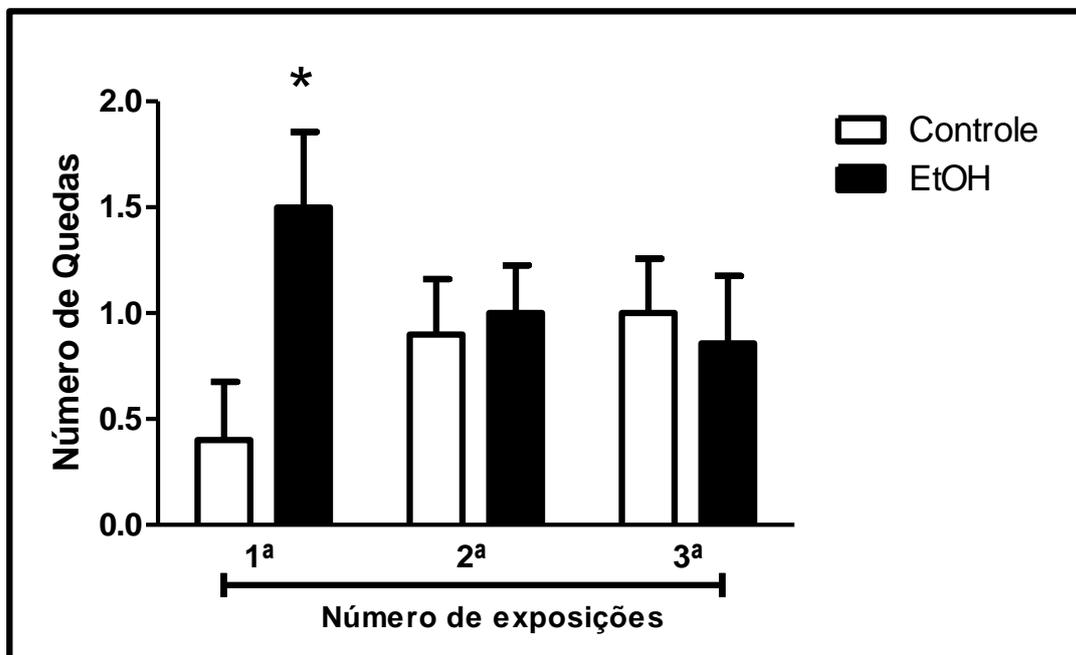
O grupo avaliado após intoxicação com um *binge de EtOH* demonstrou no teste do campo aberto que a distância percorrida pelos animais intoxicados não apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, sugerindo que o grupo intoxicado com EtOH não apresentou prejuízo motor na atividade exploratória espontânea quando comparado ao controle (Figura 6).



**Figura 8:** Efeito do etanol (EtOH) em forma de *binge* agudo na atividade locomotora/ exploratória de ratas na fase de adolescência através da distância total percorrida (metros). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m da distância total percorrida durante 300 segundos, com 10 animais por grupo. \* $p=0,91$  não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste t de Student).

#### 4.2 Teste do Rotarod

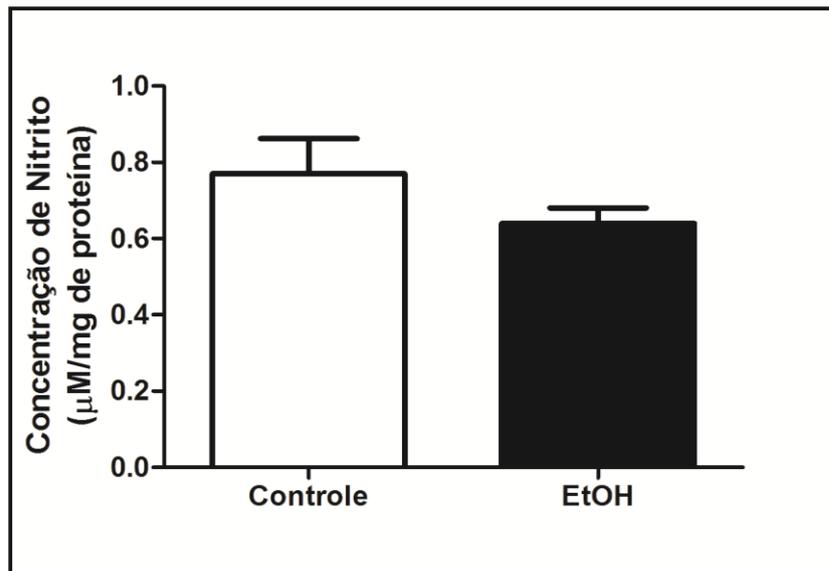
A figura 7 demonstra o número de quedas nas três exposições ao rotarod. O número de quedas na primeira exposição sobre o cilindro giratório do grupo intoxicado foi superior ao número de quedas atingido pelo grupo controle. No entanto, as ratas adolescentes expostas a um *binge* com EtOH melhoraram seu desempenho nas demais etapas aproximando-se ao número de quedas do grupo controle.



**Figura 9:** Efeito do etanol (EtOH) na forma de *binge* agudo na coordenação motora de ratas adolescentes avaliadas no teste do rotarod. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m o número de quedas nas três exposições ao equipamento, com 10 animais por grupo. \* $p=0,02$ ;  $p=0,40$ ;  $p=0,41$  respectivamente. Diferença significativa em relação ao grupo controle na 1ª exposição, não apresentou diferença significativa nas 2ª e 3ª exposições (Teste t de *Student*).

### 4.3 Níveis de Nitrito

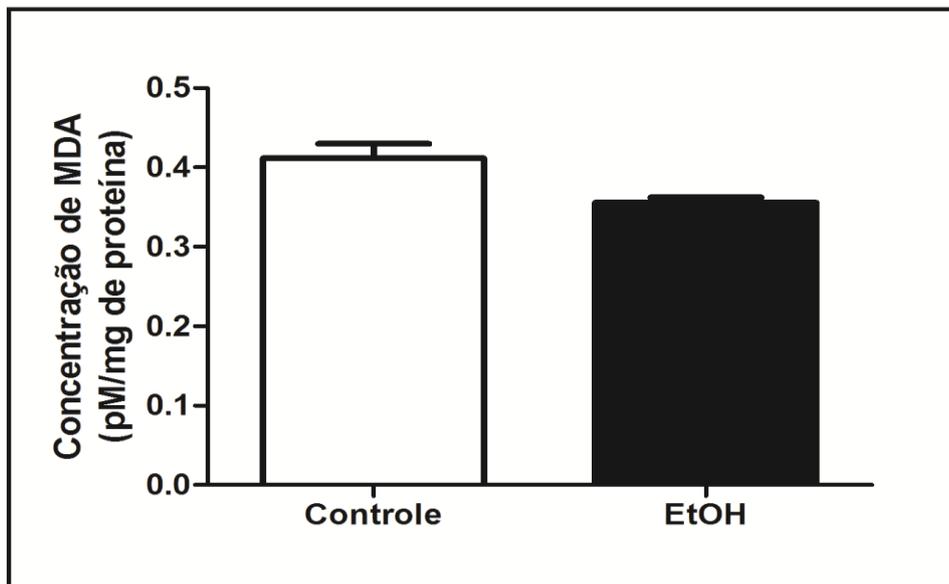
A Figura 8 demonstra os resultados da avaliação dos níveis de nitrito no cerebelo. Nesta investigação, os animais tratados com EtOH na forma de *binge* agudo em ratas adolescentes não apresentaram diferenças significativas quando comparado ao grupo controle.



**Figura 10:** Efeito da intoxicação aguda com etanol (EtOH) em forma de *binge* sobre a concentração de nitrito em tecido cerebelar de ratas adolescentes. Resultados expressos como a média  $\pm$  e.p.m de 9-13 animais por grupo. \* $p=0,32$  não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste t de *Student*).

#### 4.4 Níveis de Peroxidação Lipídica

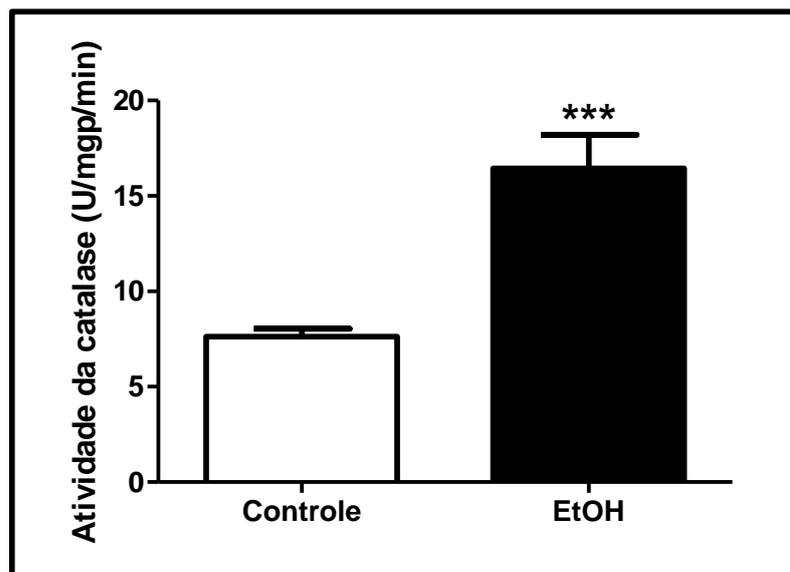
As concentrações de MDA no cerebelo dos animais testados estão apresentadas na figura 9. Os níveis de MDA e consequentemente de peroxidação lipídica encontrados nos cerebelos de ratas adolescentes tratadas agudamente com EtOH apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 9).



**Figura 11:** Efeito da intoxicação aguda com etanol (EtOH) em forma de *binge* sobre a concentração de malondialdeído (MDA) em tecido cerebelar de ratas adolescentes. Resultados expressos como a média  $\pm$  E.P.M de 9-13 animais por grupo. \* $p=0,02$  apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste t de *Student*).

#### 4.5 Atividade da Catalase

A atividade da catalase encontrada nos cerebelos de ratas adolescentes tratadas agudamente com EtOH foi maior, apresentando diferenças significativas entre os grupos (Figura 10).



**Figura 12:** Efeito da intoxicação aguda com etanol (EtOH) em forma de *binge* sobre a atividade da catalase em tecido cerebelar de ratas adolescentes. Resultados expressos como a média  $\pm$  e.p.m de 9-13 animais por grupo. \* $p=0,0006$  apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste t de *Student*).

---

## **V DISCUSSÃO**

---

Nesta investigação, os resultados obtidos demonstraram que o EtOH na forma de *binge* agudo em ratas adolescentes induziu à alterações no aprendizado motor em teste de esforço motor forçado (rotarod), porém sem déficits na atividade exploratória. Também foi observado um aumento na atividade da catalase, sem modificações nos níveis de nitrito e de peroxidação lipídica cerebelar.

De fato, nosso grupo tem investigado os efeitos do EtOH em ratas fêmeas durante a adolescência, de forma crônica e em altas doses (Oliveira et al., 2014; Pereira, 2012; Bezerra, 2013; Alencar, 2013), demonstrando que os danos causados pelo seu consumo são difusos, porém afetam as diversas áreas centrais de forma diferente. Assim sendo, buscou-se investigar neste trabalho doses mais usualmente utilizadas pelos adolescentes e no padrão de consumo socialmente adotadas por essa faixa etária (CREGO et al. 2009).

Outro fator relevante foi qual estrutura do SNC deveria ser escolhida para o estudo. Está bem documentado na literatura que o abuso desta substância é responsável por danos no SNC, porém existem certas regiões que são mais susceptíveis aos seus efeitos neurotóxicos, dentre elas destaca-se o cerebelo (HARPER et al. 1987; HARDING et al. 1996; BAKER et al. 1999). Inicialmente, Fernandes (2014) verificou alterações na função motora a partir de um “*screening*” de ensaios comportamentais. De forma mais detalhada, no *pole test* observou-se que a coordenação e equilíbrio motor fino foram prejudicados associados à lentidão nos movimentos denominada bradicinesia (Anexo 1).

A bradicinesia e a diminuição do tônus muscular são efeitos encontrados em processos degenerativos no SNC, em especial no cerebelo (FREDERICKS, 1996; PALLARES, 2001; PHILLIPS et al. 2009), desta forma o objetivo deste trabalho foi de investigar se o possível mecanismo de alteração nos movimentos de animais intoxicados com um *binge* de EtOH estão associados com a alteração em parâmetros oxidantes.

Segundo Jung e Metzger (2010), a natureza pró-oxidante do EtOH é particularmente importante no surgimento de danos em áreas do SNC mais vulneráveis como por exemplo o cerebelo, provocando inevitavelmente comprometimento do comportamento motor e aprendizagem motora, que foi

observado neste estudo em decorrência do consumo agudo do EtOH no período da adolescência.

A mensuração da distância percorrida por roedores no campo aberto é utilizada como uma medida para avaliação da atividade locomotora (KARL et al. 2003). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que não houve prejuízo na atividade locomotora espontânea após consumo de EtOH em apenas um episódio de *binge* em ratas adolescentes.

O rotarod é um dos testes mais utilizados para avaliação da função sensorial motora dos roedores, por ser considerado um dos mais sensíveis para este fim. Atraso no desenvolvimento do sistema motor ou danos sensoriais podem aumentar o número de quedas dos animais do aparato (SLAMBERVÁ et al. 2006).

Neste estudo foi avaliado o número de quedas do cilindro após um período de habituação dos animais no aparato. Este teste foi sensível para verificar a alteração no comportamento motor no início do movimento, onde foi observado um aumento no número de quedas na primeira exposição. Porém, segundo Brenes e colaboradores (2009) os animais são capazes de "aprender" o reflexo de endireitamento na superfície do aparato, o que justificaria os resultados obtidos na segunda e terceira exposição, onde não houve diferença significativa no número de quedas entre o grupo tratado e o grupo controle. Outros ensaios que examinam a locomoção poderão ser realizados em estudos futuros para testar esta hipótese.

Sabe-se que as fibras musgosas, as fibras trepadeiras e suas sinapses com as células de Purkinje formam as vias de condução de sinais no cerebelo e a integridade destas células é fundamental para o adequado funcionamento da circuitaria cerebelar (STRATA e ROSSI, 1998; KISHIMOTO et al, 2002; WATANABE, 2008).

Estudos relatam que o consumo crônico do EtOH induz à déficits no estabelecimento de sinapses eficientes entre as fibras olivares trepadeiras e as células de Purkinje, resultando em alterações motoras relacionadas ao cerebelo, tais como ataxia, bradicinesia e incoordenação motora (ICHISE, 2000; WATANABE, 2008; PIERCE, 2011 ).

Este estudo demonstrou que apenas um *binge* agudo produziu alterações no aprendizado motor, afetando o planejamento do movimento anteriormente treinado pelo animal, que são funções inerentes à estrutura cerebelar (VOOGD e RUIGROK, 2004).

Com base em dados clínicos, autópsias e exames radiológicos, um quarto a um terço dos alcoólicos crônicos apresenta degeneração cerebelar (DESHMUKH et al. 2002). Um número de limitações metodológicas associadas com um pequeno número de estudos anteriores que examinam a relação entre dano oxidativo e déficits cognitivos em um modelo de intoxicação aguda com EtOH, impede um desenho de conclusões definitivas.

Ressalta-se que os resultados comportamentais observados não poderiam ter sido promovidos pelo efeito inibitório do EtOH, visto que segundo Livy e colaboradores (2003), a concentração sanguínea de EtOH em ratos, administrado por gavagem, possui um declínio gradual e dura em torno de 450 minutos para ser eliminado do organismo. Desta forma, baseado neste estudo, os testes foram realizados 7,5 horas (sete horas e trinta minutos) após a administração de EtOH, evitando assim o efeito farmacológico do álcool.

Sabe-se que doses elevadas de EtOH administradas em um único episódio de *binge* produz neurotoxicidade que alteram a integridade do cerebelo e o funcionamento de estruturas como hipocampo e córtex pré-frontal, que são estruturas mais sensíveis à ação do EtOH e que são responsáveis por mediar funções executivas como respostas comportamentais complexas e memória de trabalho (CREWS et al. 2000; PASCUAL et al. 2007; CIPPITELLI et al. 2010; SELEMON, 2013).

Os cerebelos de ratos podem ser considerados totalmente maduros após três meses de vida, porém a partir da quarta semana a morfologia celular e conexão sináptica estão essencialmente maduras (MCKAY e TURNER, 2005). Estudos sugerem que a exposição ao EtOH em forma de *binge* induz à uma maior perda das células cerebelares de Purkinje em comparação com uma exposição crônica (JAATINEN e RINTALA, 2008) que pode ocorrer através da neurodegeneração devido a processos inflamatórios que levam a produção de radicais superóxidos e conseqüentemente morte celular (CREWS e NIXON, 2008).

Sabe-se que o EtOH possui a capacidade de alterar a estrutura das membranas lipídicas, aumentando a sua fluidez, dada sua propriedade lipofílica, na qual as consequências neurofisiológicas desta ação ainda não estão bem definidas. Como citado anteriormente, o consumo agudo e crônico desta substância está associada com a geração de ERO's e outros produtos metabólicos, que pode conduzir a dano oxidativo de estruturas e moléculas celulares, incluindo fosfolipídios e DNA (BROOKES, 2004), levando à perda neuronal.

Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram através de seus resultados que as alterações motoras observadas utilizando o mesmo modelo de intoxicação não ocorreram via estresse oxidativo. Na literatura, há registros de que a administração do álcool de forma subcrônica (4 semanas) influencia positivamente a taxa de peroxidação lipídica no cerebelo de ratos (CELEC et al. 2003). Contudo, estudos posteriores em cerebelos de ratas adolescentes expostas a um segundo *binge* poderão confirmar esta afirmativa.

Moreira et al. (2010) demonstrou que a produção de EROs pode ser regulada através de um sistema enzimático antioxidante que inclui as enzimas SOD1, GSH-Px e a catalase. A enzima SOD age transformando o radical superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), enquanto a catalase e a GSH-Px são responsáveis por converter  $H_2O_2$  em água, impedindo a formação do radical ( $OH^\cdot$ ) que é muito reativo. A ação destas enzimas está relacionada aos mecanismos de prevenção de danos oxidativos, impedindo ou controlando a formação de radicais livres.

Neste estudo, os resultados demonstraram uma elevada atividade da catalase, o que demonstra que houve uma compensação do organismo para reverter a produção de ERO's em cerebelos de ratas adolescentes expostas agudamente ao EtOH por um curto período de tempo seguido de abstinência (*binge*), através desta importante via antioxidante intracelular. Estes resultados sugerem que a alteração no aprendizado motor observado não parece ser mediada pelo estresse oxidativo, devendo ser investigado outros possíveis mecanismos, tais como alterações na neurotransmissão ou em cascatas de sinalização.

Desta forma, estes resultados sugerem que o cerebelo pode ser uma estrutura mais resistente ao EtOH no desenvolvimento de estresse oxidativo

tecidual, visto que outros trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram que mesmo em altas doses na intoxicação alcoólica (6,5 g/Kg/dia) não houve alteração na bioquímica oxidativa nos cerebelos de ratas Wistar (ALENCAR, 2013). Estes resultados são diferentes das investigações em outras áreas cerebrais, tais como córtex motor que parecem ser mais susceptíveis ao estresse oxidativo gerado pelo EtOH do que o cerebelo (TEIXEIRA et al. 2014).

---

## **VI CONCLUSÃO**

---

Os resultados obtidos através de ensaios comportamentais em ratas adolescentes intoxicadas com EtOH demonstraram que um *binge* agudo foi capaz de alterar o aprendizado motor sem comprometer a atividade locomotora espontânea. Através dos ensaios de estresse oxidativo foi identificada uma alteração na bioquímica oxidativa visto que houve uma diminuição dos níveis de malonaldeído e um aumento da atividade da catalase de ratas adolescentes intoxicadas agudamente com EtOH na forma de *binge* em relação ao grupo controle, porém os níveis de nitrito nos tecidos dos animais tratados com EtOH não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle.

Um número de limitações metodológicas associadas com um pequeno número de estudos anteriores que examinam a relação entre dano cerebelar e déficits cognitivos em um modelo de intoxicação aguda com EtOH, impede um desenho de conclusões definitivas, sendo necessárias investigações posteriores para avaliar as causas e mecanismos envolvidos nas alterações do comportamento motor neste modelo de intoxicação.

---

---

## **VII REFERÊNCIAS**

---

---

AEBI, H. **Catalase in vitro**. *Methods Enzymol.* v. 105:121-6, 1984.

ANDERSEN, B.B. **Reduction of Purkinje cell volume in cerebellum of alcoholics**. *Brain Research.* 1007: 10 – 18, 2004.

ANDERSON, P.; BAUMBERG, B. **Alcohol in Europe – A public health perspective. A report for the European Commission**. England: Institute of Alcohol Studies, 2006.

APRIOKU, J.S. **Pharmacology of free radicals and impact of reactive oxygen species on the testis**. *J Reprod Infertil.* 14(4): 158-172. 2013.

BAKER, K.; HARDING, A.; HALLIDAY, G.; KRIL, J.J.; HARPER, C. **Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy**. *Neuroscience.* 1999; 91: 429-438.

BARCLAY L.R.; ARTZ, J.D.; MOWAT J.J. **Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: 14C tracer and product studies**. *Biochim Biophys Acta.* 1995 Jul 6;1237(1):77-85.

BOMFIM, G. H.; VERDE, L. F.; FRUSSA-FILHO, R.; JURKIEWICZ, A. e JURKIEWICZ, N. H. **Functional effects of alcohol withdrawal syndrome on peripheral sympathetic neurotransmission in vas deferens of adult rats**. *Life Sci*, v. 108, n. 1, p. 34-43, 2014.

BOTTA, P.; MAMELI, M.; FLOYD, K. L.; RADCLIFFE, R. A. e VALENZUELA, C. F. **Ethanol sensitivity of GABAergic currents in cerebellar granule neurons is not increased by a single amino acid change (R100Q) in the alpha6 GABAA receptor subunit**. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 323, n. 2, p. 684-691, 2007.

BOUCHERY, E.E.; HARWOOD, H.J; SACKS, J.J; SIMON, C.J.; BREWER, R.D. **Economic costs of excessive alcohol consumption in the US, 2006**. *Am J Prev Med.* 41:516–24. doi: 10.1016/j, 2011.

BRADFORD, M.M.; **Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal Biochem.* v. 72, p. 248-54, 1976.

BRENES, J. C.; PADILLA, M. e FORNAGUERA, J. **A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats**. *Behav Brain Res*, v. 197, n. 1, p. 125-137, 2009.

BROOKES, P.S. **Mitochondrial nitric oxide synthase**. *Mitochondrion.* 3(4): 187-204. 2004.

- BROOKES, P.S. Mitochondrial nitric oxid synthase. *Mitochondrion*. 2004; 3: 187-204.
- CELEC, P.; JANI, P.; SMREKOVA, L.; MRLIAN, A.; KUDELA, M.; HODOSY, J.; BOOR, P.; KRISTOVA, V.; JAKUBOVSKY, J.; JEZOVA, D.; HALCAK, L.; BOZEK, P.; SLAMOVA, J.; ULICNA, O.; HOJSIK, D.; JURKOVICOVA, I. **Effects of anabolic steroids and antioxidante vitamins on etanol-induced tissue injury**. *Life Sci*. v. 74, p. 419-34, 2003.
- Centro Brasileiro de Informações sobre drogas Psicotrópicas (CEBRID). Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD), 2013.
- CHAMBERS, R.A.; TAYLOR, J.R.; POTENZA, M.N. **Developmental Neurocircuitry of Motivation in Adolescence: A Critical Period of Addiction Vulnerability**. *Am J Psychiatry*. June, 160(6): 1041 – 1052, 2003.
- CHEN, Q.; WANG, Z.; XIONG, Y.; XUE, W.; KAO, X.; GAO, Y.; MUHAMMAD, N. e SONG, D. **Selenium increases expression of HSP70 and antioxidant enzymes to lessen oxidative damage in Fincoal-type fluorosis**. *J Toxicol Sci*, v. 34, n. 4, p. 399-405, 2009.
- CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 2001; 25: 235-260.
- CLIMENT, B.; GAGO, N.; LLERENA, G.; GONZÁLEZ, V. **Patología médica asociada al consumo perjudicial de alcohol**. En: Monografía sobre el alcoholismo. Barcelona: Socidrogalcoho. p 181-218, 2012.
- CREGO, A.; RODRIGUEZ-HOLGUÍN, S.; PARADA, M.; MOTA, N.; CORRAL, M.; CAVADEIRA, F. **Reduced anterior prefrontal cortex activation in young binge drinkers during a visual working memory task**. *Drug Alcohol Depend*, 109: 45-56, 2010.
- CREWS, F.T.; NIXON, K. **Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism**. *Alcohol and Alcoholism*. 44, n.2,: 115–127, 2008.
- CUNHA, P.A. **Avaliação as alterações cerebelares decorrentes da exposição ao etanol da adolescência a fase adulta**. Belém: PPGCF – UFPA, 2013.
- D'AUTRAUX, B.; TOLEDANO, M.B. **ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis**. *Nat Rev Mol Cell Biol*;8(10):813-24, 2007.

DESHMUKH, A.; ROSENBLOOM, M. J.; PFEFFERBAUM, A. e SULLIVAN, E. V. Clinical signs of cerebellar dysfunction in schizophrenia, alcoholism, and their comorbidity. **Schizophr Res**, v. 57, n. 2-3, p. 281-291, 2002.

DEWIT, D.J; ADLAF, E.M; OFFORD, D.R; OGBORNE, A.C. **Age at first alcohol use: A risk factor for the development of alcohol disorders**. Am J Psychiatry, 157:745–50, 2000.

DI FLIORO, A.; CRADDOCK, N.; VAN DEN BREE, M. **Alcohol misuse in bipolar disorder. A systematic review and metaanalysis of comorbidity rates**. Eur Psychiatry; 29:117-124, 2014.

DOREMUS, T.L., VARLINSKAYA, E. I. and SPEAR, L. P. **Age-Related Differences in Elevated Plus Maze Behavior between Adolescent and Adult Rats**. Annals of the New York Academy of Sciences. 1021: 427–430, 2004.

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. **Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia**. Pharmacol Biochem Behav. 2007 May;87(1):179-97. Epub 2007 May 4. Review.

EDENBERG, H.J.; **The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants**. Alcohol Res Health. 2007; 30:5-13.

ESPERT, R.; GADEA, M. **Neurobiología del alcoholismo. Bases bioquímicas y neurobiológicas de la adicción al alcohol**. En: Monografía sobre el alcoholismo. Barcelona: Socidrogalcohol; p. 75-120, 2012.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. **Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal**. Methods Enzymol; v. 186, p. 407-21, 1990.

FERNANDES, L.M.P.  
**Efeitos do etanol no padrão binge no processo mnemônico, de emocionalidade e no comportamento motor de ratas na puberdade**. Belém: PPGCF – UFPA, 2014. 75 p.

FITZPATRICK, L.E.; JACKSON, M.; CROWE S.F. **The relationship between alcoholic cerebellar degeneration and cognitive and emotional functioning**. Neurosci Biobehav Rev. 32(3):466-85. Epub 2007 Sep 4. Review, 2008.

FREDERICKS, C.M. **Disorders of the cerebellum and its connections**. Fredericks C.M.; Saladin, L.K. (Eds.), **Pathophysiology of the motor systems**, F.A. Davis Company, Philadelphia. 445–466, 1996.

GLICKSTEIN, M. **The discovery of the visual cortex.** Sci Am. Sep; 259(3):118-27. No abstract available, 1988.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D.J.; GRANT BF. **Age at smoking onset and its association with alcohol consumption and DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey.** J Subst Abuse, 10:9–73, 1998.

GRANT, B.F.; DAWSON, DA. **Age at onset of alcohol use and its association with DSM-IV alcohol abuse and dependence: Results from a longitudinal alcohol epidemiologic survey.** J Subst Abuse. 9:103–10, 1997.

GREEN, L.C.; DE LUZURIAGA, K.R.; WAGNER, D.A. **Nitrate biosynthesis in man.** Proc . Natl. Acad. Sci. USA 78, 7764-7768, 1981.

GRUCZA, RA.; BUCHOLZ, KK.; RICE, JP.; BIERUT, LJ. **Secular trends in the lifetime prevalence of alcohol dependence in the United States: a re-evaluation.** Alcohol Clin Exp Res. 32:763–70, 2008.

HARDING, A.J.; HALLIDAY, G.M.; HARPER, C.G.; KRIL, J.J. Loss of vasopressin immunoreactive neurons in alcoholics is dose-related and time-dependent. Neuroscience. 1996; 72: 699-708.

HARPER, C.G.; KRIL, J.J.; DALY, J. Are we drinking our neurones away? Br Med J. 1987; 294: 534-536

HARRISON, L.; GARDINER, E. **Do the rich really die young? Alcohol-related mortality and social class in Great Britain, 1988-94.** Addiction, v. 94, n. 12, p. 1871-1880, 1999.

HERMENS, D.F.; LAGOPOULOS, J.; TOBIAS-WEBB, J.; DE RT.; DORE, G.; JUCKES, L.; et al. **Pathways to alcohol-induced brain impairment in young people: a review.** Cortex; 49:3-17, 2013.

HILTON, ME. **Demographic characteristics and the frequency of heavy drinking as predictors of selfreported drinking problems.** Br J Addiction. 82:913–25, 1987.

ICHISE, T., KANO, M., HASHIMOTO, K., YANAGIHARA, D., NAKAO, K., SHIGEMOTO, R., KATSUKI, M., AIBA, A. mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. Science. 288: 1832–1835, 2000.

ILHAN, A.; ALADAG, M.A.; KOCER, A.; BOLUK, A.; GUREL, A.; ARMUTCU, F. **Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model.** Brain Research Bulletin. v. 65, p. 495-499, 2005.

JAAATINEN, P.; RINTALA, J. **Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum.** *The Cerebellum*. p. 332-347, 2008.

JACOBUS, J.; TAPERT, S.F. **Neurotoxic Effects of Alcohol in Adolescence.** *Annu. Rev. Clin. Psychol.* v. 9, p. 703–21, 2013.

JUNG, M. E. e METZGER, D. B. Alcohol withdrawal and brain injuries: beyond classical mechanisms. **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4984-5011, 2010.

KARL, T.; PABST, R.; VONHÖRSTEN, S. **Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research.** *Exp Toxic Pathol* 2003; 55: 69–83.

KISHIMOTO, Y.; FUJIMICHI, R.; ARAISHI, K.; KAWAHARA, S.; KANO, M.; AIBA, A.; KIRINO, Y. mGluR1 in cerebellar Purkinje cells is required for normal association of temporally contiguous stimuli in classical conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 16: 2416 – 2424, 2002.

KOSKINEN, J.; LOHONEN, J.; KOPONEN, H.; ISOHANNI, M, Miettunen J. **Prevalence of alcohol use disorders in schizophrenia--a systematic review and meta-analysis.** *Acta Psychiatr Scand.* 2009; 120:85-96.

KRAUS L.; BLOOMFIELD K.; AUGUSTIN R.; REESE A. **Prevalence of alcohol use and the association between onset of use and alcohol-related problems in a general population sample in Germany.** *Addiction.* 95:1389–401, 2000.

LARANJEIRA, R.; PINSKY, I.; ZALESK, M.; CAETANO, R. **II levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira.**

LAUING, K.; HIMES, R.; RACHWALSKI, M.; STROTMAN, P.; CALLACI, J.J. **Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength.** *Alcohol.* 2008; 42: 649-656.

Lei n.º 8.069, de 13 de julho de 1990. **Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências.** *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília (DF), 1990 jul16: Seção 1.*

LIEBER, C.S.; ABITTAN, C.S. **Pharmacology and metabolismo of alcohol, including its metabolic effects and interactions with other drugs.** *Clin Dermatol.* v.17, p. 365-79, 1999.

LINDTNER, C.; SCHERER, T.; ZIELINSKI, E.; FILATOVA, N.; FASSHAUER, M.; TONKS, N.K.; PUCHOWICZ, M.; BUETTNER, C. **Binge Drinking Induces Whole-Body Insulin Resistance by Impairing Hypothalamic Insulin Action.** *Sci Transl Med.* 2013; 5: 170ra14. doi:10.1126/scitranslmed.3005123.

- LISTER, R. **The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.** *Psychopharmacology*. 1987; 92:180-185.
- LIVY, D.J.; PARNELL, S.E.; WEST J. R. **Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice.** *Alcohol*. 2003; 29: 165–171.
- MAKELA K; MUSTONEN H. **Relationships of drinking behaviour, gender and age with reported negative and positive experiences related to drinking.** *Addiction*. 95:727–36, 2000.
- MARGOLIS, R.L. **Cerebellum and psychiatry.** *International Review of Psychiatry* 13, 229–231, 2001.
- MCKAY, B. E. e TURNER, R. W. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J Physiol*, v. 567, n. Pt 3, p. 829-850, 2005.
- MELON, L. C.; WRAY, K. N.; MOORE, E. M. e BOEHM, S. L., 2ND. Sex and age differences in heavy binge drinking and its effects on alcohol responsivity following abstinence. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 104, n. p. 177-187, 2013.
- MIDANIK, L.T.; CLARK, W.B. **Drinking-related problems in the United States: description and trends, 1984-1990.** *J Stud Alcohol*. 56:395–402, 1995.
- MOREIRA, P. I.; SAYRE, L. M.; ZHU, X.; NUNOMURA, A.; SMITH, M. A. e PERRY, G. Detection and localization of markers of oxidative stress by in situ methods: application in the study of Alzheimer disease. *Methods Mol Biol*, v. 610, n. p. 419-434, 2010.
- NASCIMENTO, E.W.; MORAES, E DE O. **Avaliação da função motora de ratos wistar submetidos a ingestão de álcool.** *FAPPI – Faculdade de Pindamonhangaba*, 37f. Monografia 2009.
- NIAAA – National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. U.S. Department of Health and Human Services. 10th.
- O’HEARN, E.; MOLLIVER, M.E. **Organizational principles and microcircuitry of the cerebellum.** *International Review of Psychiatry*. 1: 232–246, 2001.
- OLIVEIRA, M.C.S.P.; PREDIGER, R.D.; GOMES-LEAL, W.; LIMA, R.R.; MAIA, C.S.F. **Minocycline mitigates motor impairments and cortical neuronal loss induced by focal ischemia In rats chronically exposed to ethanol during adolescence.** 2014; 1561: 23-34.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Department of Mental Health and Substance Abuse 2004.** Disponível em: <<http://www.who.int/entity/whr/2004>>. Acesso em: 13 de agosto de 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Informe sobre a saúde no mundo 2002.** Disponível em: <[http://www.who.int/entity/whr/2002/en/whr02\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/entity/whr/2002/en/whr02_en.pdf?ua=1)>. Acesso em: 13 de agosto de 2014.

OSHIMA, S.; HASEBA, T.; MASUDA, C.; KAKIMI, E.; KITAGAWA, Y. e OHNO, Y. [Dose effect of alcohol on sex differences in blood alcohol metabolism--cases where healthy subjects with ALDH2\*1/1 genotype drunk beer with meal]. **Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi**, v. 48, n. 3, p. 187-197, 2013.

PALLARÈS, M.; DARBRA, S.; PRAT, G.; FERRÉ, N. **Immediate and delayed voluntary ethanol effects on motor performance, learning and inhibition in rats.** *Pharmacol Biochem Behav.* 2001 May-Jun;69(1-2):41-9.

PASCUAL, M.; BLANCO, A. M.; CAULI, O.; MINARRO, J. e GUERRI, C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. **Eur J Neurosci**, v. 25, n. 2, p. 541-550, 2007.

PECHANSKY, F.; SZOBOT, C.M.; SCIVOLETTO S. **Uso de álcool entre adolescentes: Conceitos, características epidemiológicas e fatores etiopatogênicos.** *Rev. Bras. Psiquitr.* 26 ( supl. 1): 14-7, 2004.

PEREIRA, M.C.S  
**Efeitos da exposição crônica ao Etanol da adolescência à fase adulta em ratos sobre o processo mnemônico e na densidade celular no hipocampo.** Belém: PPGCF – UFPA, 2013.

PETIT, G.; KORNREICH, C.; VERBANCK, P.; CAMPANELLA, S. **Gender differences in reactivity to alcohol cues in binge drinkers: A preliminary assessment of event-related potentials.** *Psychiatry Research* 2013.

PHILLIPS, J.G.; OGEIL, R.P.; MÜLLER, F. **Alcohol consumption and handwriting: A kinematic analysis.** *Human Movement Science.* 28(5): 619-632. 2009.

REHM, J.; MATHERS, C.; POPOVA, S.; THAVORNCHAROENSAP, M.; TEERAWATTANANON, Y.; PATRA, J. **Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders.** *Lancet.* 373, 2223 - 2233, 2009.

REHM, J.; SHIELD, K.D. **Alcohol and mortality: global alcohol-attributable deaths from cancer, liver cirrhosis and injury in 2010.** *Alcohol Research: Current Reviews*, 35(2), 174–183, 2013.

ROERECKE, M.; REHM, J. **Alcohol intake revisited: risks and benefits.** *Curr Atheroscler Rep.* 2012; 14:556-562.

**RYTER, S.W.; CHOI, A.M.; Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models.** *Antioxid Redox Signal*. Jan-Feb;7(1-2):80-91. Review, 2005.

**SALA, C. Molecular regulation of dendritic spine shape and function.** *Neurosignals*. Jul-Aug;11(4):213-23. Review, 2002.

SARASA-RENEDO, A.; SORDO, L.; MOLIST, G.; HOYOS, J.; GUITART, A. M. e BARRIO, G. **[Health and social harm related alcohol]**. *Rev Esp Salud Publica*, v. 88, n. 4, p. 469-491, 2014.

**SARTOR, C.E.; LYNSKEY, M.T.; HEATH, A.C.; JACOB, T.; TRUE, W. The role of childhood risk factors in initiation of alcohol use and progression to alcohol dependence.** *Addiction*. 102:216–25, 2007.

**SCHMAHMANN, J.D.; DOYON, J.; MCDONALD, D.; HOLMES, C.; LAVOIE, K.; HURWITZ, A.S.; KABANI, N.; TOGA, A.; EVANS, A.; PETRIDES, M. Three-dimensional MRI atlas of the human cerebellum in proportional stereotaxic space.** *Neuroimage*. Sep;10(3 Pt 1):233-60, 1999.

SILVA, F.B.R.  
**Investigação dos prejuízos motores decorrentes da exposição crônica ao etanol, em ratas intoxicadas da adolescência à fase adulta.** Belém: PPGCF – UFPA, 2013.

**SLAMBEROVÁ, R.; POMETLOVÁ, M.; CHAROUSOVÁ, P. Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2006; 30: 82 – 88.

SLAMBEROVÁ, R.; POMETLOVÁ, M.; CHAROUSOVÁ, P. Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2006; 30: 82 – 88.

**SPEAR, L.P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations.** *Neurosci Biobehav Rev*. 2000; 24: 417 – 463.

**SPEAR, L.P.; Adolescent brain development and animal models.** *Ann NY Acad Sci*. 2004; 1021: 23–26.

**STOCKER, R.; KEANEY, J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis.** *Physiol*. 84 (4): 1381-1478. 2004.

**STRATA, P.; ROSSI, F. Plasticity of the olivocerebellar pathway.** *Trends Neurosci*. 21: 407–413, 1998.

**STRONG, M. N.; YONEYAMA, N.; FRETWELL, A. M.; SNELLING, C.; TANCHUCK, M. A. e FINN, D. A. "Binge" drinking experience in adolescent mice shows sex**

differences and elevated ethanol intake in adulthood. **Horm Behav**, v. 58, n. 1, p. 82-90, 2010.

SULLIVAN, L.; FIELLIN, D.A.; O'CONNOR, P.G.; **The prevalence and impact of alcohol problems in major depression: a systematic review**. *Am J Med*. 2005; 118:330-341.

TEIXEIRA, F.B.; SANTANA, L.N; BEZERRA, F.R; DE CARVALHO, S.; FONTES-JÚNIOR, E.A.; PREDIGER R.D.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; MAIA, C.S.; LIMA, R.R. **Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress**. *PLoS One*. 2014 Jun 26;9(6):e101074. doi: 10.1371/journal.pone.0101074. eCollection 2014.

THAVORNCHAROENSAP, M.; TEERAWATTANANON, Y.; JOMKWAN, Y.; LERTPITAKPONG C.; CHAIKLEDKAEW, U. **The economic impact of alcohol consumption: a systematic review**, 2009.

U.S. SURGEON GENERAL. **Surgeon General's call to action to prevent and reduce underage drinking**. Washington (DC): Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General, 2007.

VAN GILS, P.F.; HAMBERG - VAN REENEN, H.H.; VAN DEN BERG, M.; LUQMAN, T.; DE WIT, G.A. **The scope of costs in alcohol studies: Cost-of-illness studies differ from economic evaluations**. *Cost Eff Resource Alloc*. 8:15. doi: 10.1186/1478-7547-8-15, 2010.

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

VOOGD, J., GLICKSTEIN, M., 1998. **The anatomy of the cerebellum**. *Trends in Cognitive Sciences* 2, 307–313.

VOOGD, J.; RUIGROK, T.J. **The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis: the**

WATANABE, M. Molecular Mechanisms Governing Competitive Synaptic Wiring in Cerebellar Purkinje Cells. *Journal of Experimental Medicine*. 214(8): 175-190. 2008

WILSNACK, S.C.; WILSNACK, R.W.; KANTOR, L.W. **Focus on: Women and the costs of alcohol use**. *Alcohol Research: Current Reviews*. 35 (2): 219–228, 2013.

WOLLE, C.C.; SANCHES, M.; ZILBERMAN, M.L.; CAETANO, R.; ZALESKI, M.; LARANJEIRA, R.R.; PINSKY, I. **Differences in drinking patterns between men and women in Brazil**. *Rev Bras Psiquiatr*. v.33, p. 367-73, 2011.

WONG, D.V.T.; FERREIRA J.R.O.; FONTELES, M.M.F.; VIANA, G.S.B.; SOUZA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M. **Álcool e neurodesenvolvimento: Aspectos genéticos e farmacológicos**. Revista Eletrônica de Farmácia Vol 5(1), 16-31, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global status report on alcohol and health**. Geneva, Switzerland, World Health Organization Press, 2011.

---

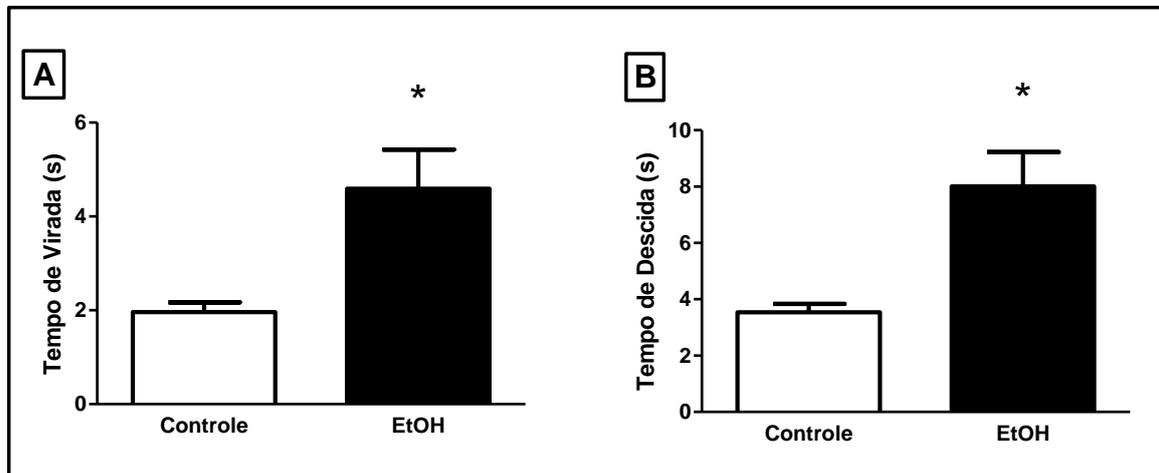
---

**VIII ANEXO**

---

---

## ANEXO A – Representação gráfica da avaliação do tempo de virada e descida no Pole Test



**Anexo 1:** Efeito da intoxicação por etanol (EtOH) em forma de *binge* agudo na determinação do controle de movimento e avaliação do desenvolvimento de bradicinesia em ratas na fase de adolescência através da média dos 3 melhores ensaios no tempo de virada no Pole Test (A) e tempo de descida (B) em segundos até a base da plataforma. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m, no período máximo de 120 segundos/ensaio, com 10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste t de *Student*). FONTE: FERNANDES, 2014.

**ANEXO B – Comitê de Ética**

|   |  |   |
|---|--|---|
|  | <b>comitê de ética em pesquisa<br/>com animais de experimentação</b> |  |
|---|--|---|

**PARECER 196-14**

**Projeto: AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL, IMUNOISTOQUÍMICA E OXIDATIVA DE RATAS INTOXICADAS COM ETANOL DA ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA, EM PADRÃO *BINGE*.**

**Coordenador:** Professora. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

**Área Temática:** Farmácia

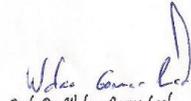
**Vigência:** 04/2014 a 04/2016

**Nº no CEPAE-UFPA:** 196-14

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (N=80, ratos Wistar) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 02 março de 2014

  
Prof. Dr. Wallace Gomes Leal  
Presidente do CEPAE-UFPA