



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR
DOUTORADO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

KÁTIA LAMARÃO VIEIRA

Atividade neuroprotetora do treinamento físico moderado contra os danos morfofuncionais cerebelares causados pelo consumo de etanol de forma intensa e episódica (*Binge drinking*) em ratos.

BELÉM

2019

KÁTIA LAMARÃO VIEIRA

Atividade neuroprotetora do treinamento físico moderado contra os danos morfofuncionais cerebelares causados pelo consumo de etanol de forma intensa e episódica (*Binge drinking*) em ratos

Tese de doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

BELÉM

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

V657a Vieira, Katia Lamarão
Atividade neuroprotetora do treinamento físico moderado
contra os danos morfofuncionais cerebelares causados pelo
consumo de etanol de forma intensa e episódica (Binge
drinking) em ratos / Katia Lamarão Vieira. — 2019.
74 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Etanol (Binge-drinkig). 2. Treinamento físico
moderado. 3. Cerebelo. 4. Estresse Oxidativo. 5.
Neurodegeneração. I. Título.

CDD 616.861

KÁTIA LAMARÃO VIEIRA

Atividade neuroprotetora do treinamento físico moderado contra os danos morfofuncionais cerebelares causados pelo consumo de etanol de forma intensa e episódica (*Binge drinking*) em ratos

Tese de doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências.

Aprovada em: 11/09/2019

Orientação: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Luanna de Melo Pereira Fernandes
Universidade da Amazônia (UNAMA)

Prof^a Dr^a. Renata Duarte de Souza Rodrigues
Instituto de Ciências da Arte, Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Freitas da Silva
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dr^a. Maria Fani Dolabela
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará

AGRADECIMENTOS

À Deus pela graça de alcançar mais uma etapa profissional e por ter se mostrado sempre ao meu lado e jamais me desamparar. Todas as dificuldades paralelas às conquistas durante essa jornada foram sinais de sua companhia e oportunidades de aprender com as lições da vida;

À minha família, que me incentivou e me apoiou em várias etapas desse processo de doutoramento;

Ao meu querido orientador Rafael Lima, que além de ter sido um grande mestre durante esses anos, tenho a felicidade de compartilhar o mesmo ambiente de trabalho;

À minha companheira de doutorado, Dinair Pamplona, que esteve ao meu lado durante as etapas cruciais desse trabalho, pelos momentos de descontração, desabafos, discussões e, sobretudo, pela amizade que formamos;

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional que me deram suporte no desenvolvimento das etapas desse trabalho, em especial ao Leonardo Bittencourt, que se tornou um grande amigo e sempre esteve solícito a ajudar no que fosse necessário, a qualquer momento;

À equipe do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Comportamento, LAFICO, sobretudo à professora Luanna Fernandes e Cristiane Maia pelo constante apoio durante a execução desse trabalho;

Aos funcionários que compõem o corpo do Biotério Central da UFPA, Reginaldo e Amarildo, pela grande ajuda e disposição a cooperar com o planejamento e execução das atividades experimentais;

À Universidade Federal do Pará, pela oportunidade de capacitação docente na qual pude realizar este doutorado, além da estrutura e corpo docente do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular;

E ao Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, que através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pude desenvolver esta tese financiada pelo órgão.

RESUMO

O etanol (EtOH) é uma droga psicotrópica, depressora do sistema nervoso central (SNC), porém bastante incentivada e consumida pela sociedade brasileira, como também em grande parte do mundo, refletindo em um problema de saúde pública. Nas últimas décadas, adolescentes têm exercido uma prática bastante comum, que é o *binge-drinking*. O consumo nocivo do EtOH promove além de alteração biopsicossocial, o desequilíbrio homeostático que causa a neurodegeneração e perda de função com desordens motoras. Em contrapartida, a prática do treinamento físico moderado (TFm) tem sido recomendada para a manutenção da saúde física e mental, como também prevenção ou minimização do desenvolvimento de algumas doenças devido a atividade motora induzir mudanças plásticas e dinâmicas no SNC, de forma favorecer a neurogênese, sinaptogênese e a angiogênese, além de contribuir para a modulação sináptica. Tendo em vista os benefícios do TFm, foram investigados os efeitos neuroprotetores sobre os parâmetros motores, teciduais e bioquímicos no cerebelo de ratos expostos ao EtOH no padrão *binge*, da adolescência a fase adulta. Para isso, foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos com 30 dias de vida, e divididos em quatro grupos, sendo o controle, com animais sedentários e tratados com H₂O destilada; o treinado, composto por animais exercitados e tratados com H₂O destilada; o EtOH, formado por animais sedentários e tratados com doses de 3 g/kg/dia de EtOH, 20% (p/v); e o Treinado + EtOH, com animais exercitados e tratados com doses de 3 g/kg/dia de EtOH, 20% (p/v). O protocolo de TFm foi realizado em uma esteira para roedores durante 5 dias, por 4 semanas e as doses do EtOH no padrão *binge*, foram administradas por gavagem intragástrica nas mesmas semanas do TFm. Após o término desse período, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto e *beam walking*. Em seguida, eutanasiados para a coleta do cerebelo, avaliando a imunohistoquímica a partir dos níveis da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC), da glutathiona reduzida (GSH), nitrito e peroxidação lipídica (LPO); como também, a morfologia das células de Purkinje (CsP), a fração de área imunomarcada por anti-sinaptofisina (SYP), e anti-proteína básica de mielina (MBP). De acordo com o resultado, o EtOH causou acentuado estresse oxidativo e danos motores, porém a execução do TFm realizado paralelamente ao tratamento com EtOH promoveu efeitos neuroprotetores no cerebelo dos ratos, entre eles, a modulação da bioquímica oxidativa pela restauração dos níveis de GSH, redução dos

níveis de LPO e aumento do TEAC, como também, evitou perda neuronal, danos às vesículas sinápticas (SYP) e componentes mielínicos (MBP). Portanto, o TFM pode ser considerado como uma estratégia terapêutica significativa para aquisição da homeostase redox, evitando assim o desequilíbrio oxidativo, como também, danos teciduais e funcionais no cerebelo de ratos tratados por EtOH no padrão *binge*.

Palavras-chave: Etanol, *binge-drinking*, treinamento físico moderado, cerebelo, estresse oxidativo, neurodegeneração.

ABSTRACT

Ethanol (EtOH) is a psychotropic drug, central nervous system (CNS) depressant, but widely encouraged and consumed by Brazilian society, as well as in much of the world, reflecting on a public health problem. In recent decades, teenagers have been practicing a very common practice, which is binge drinking. The harmful consumption of EtOH promotes, besides biopsychosocial alteration, the homeostatic imbalance that causes neurodegeneration and loss of function with motor disorders. In contrast, the practice of moderate physical training (MPT) has been recommended for the maintenance of physical and mental health, as well as prevention or minimization of the development of some diseases due to motor activity inducing plastic and dynamic changes in the CNS, in order to favor the neurogenesis, synaptogenesis and angiogenesis, besides contributing to the synaptic modulation. In view of the benefits of MPT, it was investigated the neuroprotective effects on motor, tissue and biochemical parameters in the cerebellum of rats exposed to binge-pattern EtOH from adolescence to adulthood. Forty male Wistar rats with 30 days old were used and divided into four groups, the control being sedentary animals and treated with distilled H₂O; the trained, composed of animals exercised and treated with distilled H₂O; EtOH, formed by sedentary animals and treated with doses of 3 g/kg/day EtOH, 20% (w/v); and Trained + EtOH, with exercised animals and treated with doses of 3 g/kg/day EtOH, 20% (w/v). The MPT protocol was performed on a rodent treadmill for 5 days for 4 weeks and binge-pattern EtOH doses were administered by intragastric gavage in the same weeks as the MPT. After this period, the animals were submitted to open field and beam walking behavioral tests. Then, they were euthanized for cerebellum collection, evaluating immunohistochemistry from the levels of trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), reduced glutathione (GSH), nitrite and lipid peroxidation (LPO); as well as Purkinje cell morphology (PC), the fraction of anti-synaptophysine (SYP) and anti-myelin basic protein (MBP) immunolabeled area. According to the result, EtOH caused severe oxidative stress and motor damage, but the execution of the MPT performed promoted neuroprotective effects in the rat cerebellum, among them, the modulation of oxidative biochemistry by the restoration of GSH levels, decreased LPO levels and increased TEAC, as well as preventing neuronal loss, synaptic vesicle damage (SYP) and myelin components (MBP). Therefore, MPT can be considered as a significant therapeutic strategy for the acquisition of redox

homeostasis, avoiding oxidative biochemistry imbalance, as well as tissue and functional damage in the cerebellum of rats treated by binge pattern EtOH.

Keywords: Ethanol, binge drinking, moderate physical training, cerebellum, oxidative stress, neurodegeneration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADH – Álcool desidrogenase
- ALDH – Aldeído desidrogenase
- BD – Binge drinking
- BDNF - *Brain Derived Neurotrophic Factor* (sigla em inglês)
- BPE – Beber Pesado Episódico
- CPF – Córtex Pré-Frontal
- CREB – cAMP response element binding protein (sigla em inglês)
- CsP – Células de Purkinje
- EO – Estresse Oxidativo
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- EtOH – Etanol
- FGF – Fator de crescimento de fibroblasto (sigla em inglês)
- GABA - Ácido γ -aminobutírico
- GDNF – *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor* (sigla em inglês)
- GLU – Glutamato
- GRed - Glutathiona redutase
- GSPx - glutathiona peroxidase
- MBP – Proteína básica de mielina
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde
- RLs – Radicais Livres
- SNC - Sistema Nervoso Central
- SOD – Superóxido Dismutase
- SYP – Sinaptofisina
- TFm – Treinamento Físico Moderado
- TLRs - Receptores Toll-Like
- TrKB – Tropomyosin receptor Kinase B (sigla em inglês)
- UBP – Unidade de Bebida Padrão
- VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo do etanol..	20
Figura 2. Representação esquemática da microanatomia cerebelar.	29
Figura 3. Descrição da amostra e etapas experimentais.....	39
Figura 4. Esquema do protocolo de TF e exposição ao EtOH.....	40
Figura 5. Curva de ganho de peso dos animais experimentais.	47
Figura 6. Perfil da bioquímica oxidativa dos grupos experimentais.	48
Figura 7. Contagem de Células de Purkinje.	49
Figura 8. Quantificação da fração de área imunomarcada por anti-MBP.. ..	50
Figura 9. Quantificação da fração de área imunomarcada por anti-SYP.....	51
Figura 10. Avaliação da atividade locomotora espontânea horizontal.....	52
Figura 11. Avaliação da coordenação e equilíbrio motor.....	53
Figura 12. Resumo gráfico dos principais resultados.....	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	ETANOL OU ÁLCOOL ETÍLICO	17
2.2	FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DO EtOH	19
2.3	ETANOL – <i>BINGE DRINKING</i>	23
2.4	ADOLESCÊNCIA	25
2.5	BASES NEUROANATÔMICAS DO CEREBELO	27
2.5.1.	Anatomia e Histologia do Cerebelo	27
2.5.2.	Neurofisiologia do Cerebelo	30
2.6	O TREINAMENTO FÍSICO E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	31
2.6.1.	O Treinamento Físico e seus Efeitos Neuroprotetores	31
2.6.2.	Treinamento Físico, Neuroplasticidade e Neuroproteção	33
3	OBJETIVOS	37
3.1.	OBJETIVO GERAL	37
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1.	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
4.2.	ENSAIOS COMPORTAMENTAIS	40
4.2.1.	Teste do Campo Aberto (<i>Open Field</i>)	41
4.2.2.	Teste da Caminhada sobre Varas Graduadas (<i>Beam Walking</i>)	41
4.3.	ANÁLISES DA BIOQUÍMICA OXIDATIVA	41
4.3.1.	Capacidade Antioxidante Equivalente ao <i>Trolox</i> (<i>TEAC</i>)	42
4.3.2.	Conteúdo de Glutationa Reduzida (GSH)	42
4.3.3.	Níveis de Peroxidação Lipídica (LPO)	42
4.3.4.	Níveis de Nitritos	43
4.3.5.	Concentração de Proteínas	43
4.4.	AValiação HISTOLÓGICA	43
4.4.1.	Análises Imunohistoquímicas	43
4.4.2.	Contagem de Neurônios de Purkinje	44
4.5.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
5.	RESULTADO	47
6.	DISCUSSÃO	55
7.	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXOS	73

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Etanol (EtOH) é uma preocupação global de saúde pública. Seu consumo abusivo envolve cerca de 3,3 milhões de mortes por ano (5,9% de todas as mortes no mundo) e 5,1% de morbidade no mundo (OMS, 2014). Do ponto de vista farmacológico, o EtOH é uma droga psicotrópica, dose-dependente, que ao ser consumida em grandes proporções, aumenta o risco de morbidade e/ou mortalidade (KLINTSOVA et al., 2012; REHM e IMTIAZ, 2016; OMS, 2018).

Ao longo dos anos, o padrão de consumo de EtOH mostrou mudanças significativas tanto em quantidade como em frequência (SCHUCKIT, 2009). O *Binge drinking*, tem sido considerado uma prática emergente entre adolescentes, porém perigosa por tratar-se de um consumo maior ou igual a 0,08 g/dL de EtOH no sangue, em uma única sessão, e seguido de abstinência, podendo ocasionar alterações estruturais, funcionais e químicas no sistema nervoso central (SNC) (TEIXEIRA et al., 2014; PASCUAL et al., 2017, FERNANDES et al., 2018; OMS 2018). A prevalência elevada do EtOH, em especial na adolescência, onde se apresenta um processo pleno de modulação neural, investigar os fatores modificáveis ao funcionamento neural torna-se prioridade para a obtenção de estratégias neuroprotetoras, como interrupção ou desaceleração da morte ou disfunção neuronal.

O treinamento físico moderado (TFm), atividade bastante executada entre os adolescentes, tem mostrado diversos benefícios à saúde, entre eles o efeito neuroprotetor por interferir nos sistemas moleculares essenciais para a modulação da função neural, prevenção de perda neuronal, plasticidade, melhora comportamental, e também estrutural do cérebro (DING et al., 2006; PERREY, 2013; PIN-BARRE e LAURIN, 2015; FERNANDES et al., 2018). Outros benefícios, como modulação bioquímica oxidativa, sinapse (SUBRAMANIAN et al., 2014; MADDOCK et al., 2016), aumento dos fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) e estímulo à angiogênese (FERNANDES et al., 2018), têm sido observados durante o treinamento físico de diferentes modalidades, mostrando ser importante requisito para o bom funcionamento cerebral.

Considerando a relevância epidemiológica do EtOH e as possíveis lesões no cerebelo, órgão importante no controle do sistema sensorio-motor, na coordenação motora e cognição motora (VALENZUELA et al., 2010; VALENZUELA e JOTTY, 2015; DA SILVA et al., 2018), torna-se importante investigar a ação do TFm como uma

possível estratégia neuroprotetora, para os possíveis danos motores e estruturais causados no cerebelo a partir de consumo de EtOH no padrão *binge*.

Referencial Teórico

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ETANOL OU ÁLCOOL ETÍLICO (ETOH)

O EtOH tem sido usado há séculos por homens e mulheres, hábito que tem persistido por milhares de anos (OMS, 2014). Na maioria dos países, por ser uma droga lícita, é usada em diversas ocasiões por diferentes motivos, hábito que tem persistido ao longo dos anos (ANDRADE et al., 2018). A prevalência de perturbação física e mental pelo uso nocivo do EtOH demonstra variações entre as regiões do mundo, desde os países do Oriente médio, com baixa taxa, aos países das Américas e parte da Europa oriental, com altas taxas. Apesar de variar de uma região para outra, o EtOH é a droga mais usada no mundo, ocasionando graves consequências para a saúde pública (OMS, 2018).

A evidência do consumo de EtOH no ambiente social decorre sobre vários fatores, entre eles, o incentivo da sociedade e o mercado de bebidas que, direta ou indiretamente, expõe os usuários às situações vulneráveis durante o consumo, como acidentes automobilísticos, agressões, suicídios, homicídios, entre outras (LARANJEIRA et al, 2007). O EtOH pode tornar o usuário tolerante a muitos dos seus efeitos, levando ao aumento do consumo para obtenção das mesmas sensações iniciais (SENAD, 2014).

O EtOH comercializado na forma de bebida, é obtido a partir da fermentação alcoólica de açúcares presentes em cereais, raízes e frutas, ou destilação do mostro fermentado (SENAD, 2014). Os processos químicos de fabricação levam a obtenção de uma grande diversidade de bebidas alcoólicas, tipo fermentadas e destiladas, produzidas com diferentes teores alcoólicos (CISA, 2014). Sendo assim, a título de unificar critérios para se calcular o uso do EtOH, a OMS criou a Unidade de Bebida Padrão (UBP) equivalente a quantidade de 10-12g de álcool puro, de modo que, uma lata de cerveja (330 ml) ou uma taça de vinho (100ml), ou uma dose de destilado (30 ml), correspondem aproximadamente a mesma quantidade de álcool puro (CISA, 2014).

De acordo OMS, os efeitos gerados pelo EtOH estão relacionados principalmente ao volume consumido e ao padrão de beber (HECKMANN e SILVEIRA, 2009). O consumo elevado entre os adolescentes, como também, as diferenças metabólicas entre o sexo masculino e feminino, fizeram com que OMS

normatizasse os diferentes padrões de consumo, como leve a moderado, de risco e o nocivo para o EtOH, com objetivo de minimizar possíveis agravos (CISA, 2014).

Apesar de não existir um consenso quanto ao padrão moderado, o *National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) considera o consumo feito com limites, sem que haja prejuízos a pessoa e a sociedade (NIAAA, 2014).

Devido as diversidades culturais do mundo todo não existe um consenso internacional sobre a dose padrão para o EtOH, tornando natural a existência de outras definições entre os diversos países e organizações (SENAD, 2014 e OMS, 2014).

Tabela 1. Intervalos de doses de etanol em cada padrão de consumo por sexo.

Consumo	Moderado	De risco	Nocivo
Homem	Até 30 g/ dia	40 a 60 g/ dia	Acima de 60 g/dia
Mulher	Até 20 g/ dia	20 a 40 g/ dia	Acima de 40 g/dia

Fonte: OMS, 2014

Dados epidemiológicos a partir do I Levantamento realizado no Brasil, informou que 11% dos homens adultos bebiam todos os dias, e 28% em média de 1 a 4 vezes por semana (LARANJEIRA et al., 2007). Em seguida, o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas relatou que 32% bebiam de forma moderada, e 16% mais do que seis doses por ocasião, no entanto, 32% atestaram não serem capazes de parar após a primeira dose (LARANJEIRA et al., 2012), dados que indicam alta prevalência para o diagnóstico de dependência. No ano de 2016, mais de 3 milhões de pessoas morreram pelo consumo nocivo de EtOH, o que representa 1 em cada 20 mortes, sendo o sexo masculino com maior número de ocorrência (OMS, 2018).

Avaliações sobre o consumo nocivo de EtOH, têm advertido quanto aos comportamentos de riscos que causam doenças, danos motores e cognitivos (OMS, 2014), como também, aos quadros clínicos que vão da embriaguez à intoxicação grave, seguido de depressão respiratória, perda da consciência, coma e morte (OMS, 2018). Situação que promove o EtOH como fator causal para mais de 200 doenças, lesões e outros problemas de saúde, tal como descritos na Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID 10) (OMS,1992)

2.2 FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DO EtOH

A molécula de EtOH possui baixa apolaridade apesar da sua cadeia alifática contendo carbono, contudo é suficiente para atravessar barreiras celulares e, através da hidroxila (OH) presente em sua estrutura, realiza ligações de hidrogênio com outras moléculas intra ou extracelulares (FERNANDES et al., 2017). Após a ingestão do EtOH, apenas cerca de 2 a 10% é absorvido na mucosa oral, sendo o restante absorvido pelo estômago (20%) e intestino delgado (80%) (ZAKHARI, 2006). Alguns fatores são relevantes para o processo cinético de absorção e distribuição do EtOH como a absorção concomitante com gorduras e carboidratos, além do fator de diluição da substância (BOBE & BODE, 1997; MEAD & SARKAR, 2014). Dessa forma, após a absorção, o EtOH é distribuído para os órgãos de maior perfusão sanguínea.

No aspecto farmacocinético do EtOH, destacam-se variáveis que influenciam desde aspectos cinéticos aos dinâmicos, como fatores genéticos e ambientais (WALL et al., 2016). É conhecido na literatura que o EtOH causa danos em diversos órgãos e sistemas, entretanto, na comparação entre etnias é possível observar que asiáticos apresentam menores riscos de desenvolverem doenças relacionadas ao EtOH, enquanto os caucasianos apresentam os maiores riscos (CHARTIER & CAETANO, 2010). A exemplo disso, associa-se as maiores chances de dependência química ou efeitos exacerbados ao EtOH, às variações na expressão de genes de enzimas metabolizadoras do EtOH (LI et al., 2000; WALL et al., 2016).

As enzimas responsáveis pela oxidação do EtOH no fígado, *i.e.*, metabolização, são a álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). O metabolismo ocorre em duas etapas: a primeira, mediada pela ADH que oxida o EtOH em acetaldeído, e a segunda, em que a ALDH metaboliza o acetaldeído em acetato (WALL et al., 2016). Ao final do metabolismo, o acetato é convertido em acetil coenzima A (Acetil CoA) que entrará no ciclo do ácido cítrico, transformando-se em dióxido de carbono e água (ZAKHARI, 2006; SETSHEDI et al., 2010) (Figura 1).

Diferentes fenótipos dessas enzimas estão associados aos problemas mencionados acima, por exemplo, o gene ADH1B está associado aos maiores efeitos na dependência do EtOH. Além disso, o alelo ADH1B*2 está fortemente associado à dependência em populações asiáticas, mas também a maiores efeitos protetores contra o EtOH (LUCZAK et al. 2006; LI et al. 2012). Outras enzimas do complexo citocromo P450, como a CYP2E1 metaboliza uma pequena quantidade do EtOH

absorvido em condições normais, mas é altamente requisitada quando à sobrecarga das enzimas principais mencionadas acima (WALL et al., 2016). Outros órgãos, em menores proporções, também são capazes de metabolizar o EtOH e causar danos locais (EDENBERG, 2007). No SNC a catalase é a enzima com maior participação no processo de oxidação do EtOH, assim como a CYP2E1 (ZIMATKIN et al., 2006; VASILIOU et al., 2006), como ilustrado na figura 1.

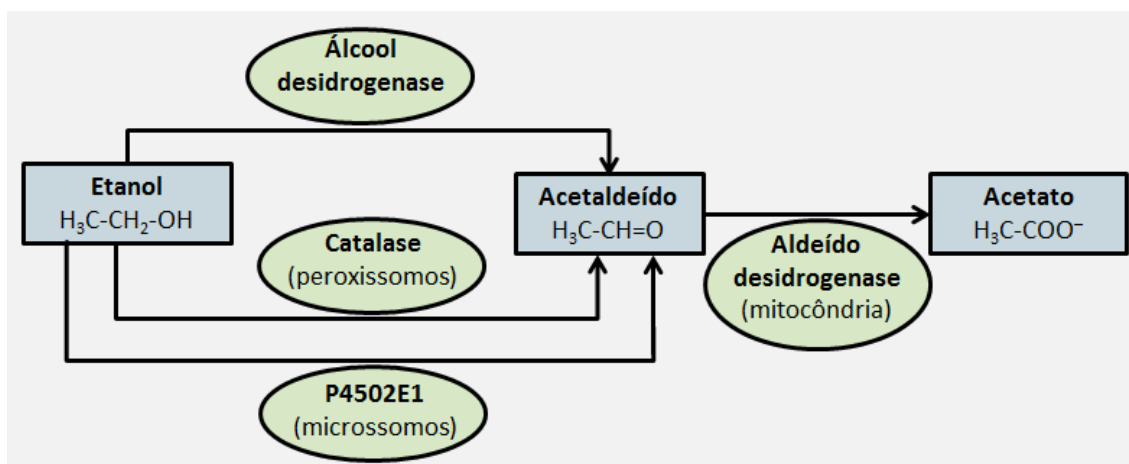


Figura 1. Metabolismo do etanol. Fonte: CISA (2019), adaptado de NIAAA (2007).

A literatura aponta que o agente causador de danos ao organismo é o acetaldeído, entretanto, deve-se considerar que devido às características químicas dessa molécula, ela é retida pela barreira hematoencefálica após distribuição pela circulação periférica devido a presença da ALDH na barreira hematoencefálica. Alguns trabalhos apontam que os efeitos observados relacionados ao SNC são frutos do metabolismo no próprio cérebro, enquanto outros ainda afirmam os efeitos tóxicos são gerados pelo acetaldeído (ZIMATKIN et al., 2006; MUKHERJEE, 2013; EDENBERG et al., 2018).

Seguindo a farmacocinética, a dinâmica do EtOH está associada a vários mecanismos de dano, destacando efeitos psicotrópicos sobre o comportamento, além de danos celulares desencadeados pelo estresse oxidativo, inflamação, modulação da expressão gênica, atividade enzimática e de receptores celulares (OLIVEIRA et al., 2015; FERNANDES et al., 2017). O EtOH está relacionado principalmente a danos cardiovasculares e hepáticos, destacando cardiomiopatias, arritmias, hipertensão arterial, esteatose, fibrose e cirrose hepática (NIAAA, 2019). Mas os efeitos mais notórios são observados após a absorção e metabolismo da substância, podendo causar tontura, náuseas, letargia e aumento da pressão arterial, a depender da dose administrada (FERNANDES et al., 2017).

Os efeitos tóxicos do EtOH no processo de maturação do SNC induzem alterações estruturais das células neurais e comprometimento funcional. O cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo, substância branca e a glia, são considerados elementos de maior vulnerabilidade por conter áreas mais susceptíveis aos danos neurais (LOECHES e GUERRI, 2011).

Embora os mecanismos celulares e moleculares ainda não estejam completamente compreendidos, observam-se modificações estruturais, como diminuição da densidade tanto da substância branca, na zona subcortical, quanto da cinzenta, na zona cortical (LISDAHL et al., 2013). A substância branca, formada pelas células da glia, e axônios mielinizados, sofrem alterações estruturais seguidos de comprometimentos funcionais, em decorrência de apoptose celular e, desmielinização axonal (LUO, 2012). Na substância cinzenta, mediante a perda neuronal, as sinapses estão reduzidas com remodelação sináptica prejudicada, interferindo na comunicação funcional das importantes áreas neurais.

No comprometimento funcional, diante à neurotoxicidade ao EtOH, os danos cerebelares por uso agudo são consistentes e relevantes às alterações comportamentais, em especial, às ataxias, que envolvem velocidade, estabilidade postural e equilíbrio (LUO, 2015). Em geral, importantes células do SNC sofrem danos ao uso nocivo do EtOH, em especial, as células de Purkinje do cerebelo que se destacam pelo processo de informação cerebelar, integração de grande parte das informações recebidas pelo corpo, resultando nos movimentos corporais harmonizados (LUO, 2015).

Em condições normais, os neurônios inibitórios das células de Purkinje – os Gabaérgicos - estimulam os neurônios dos núcleos cerebelares, regulando sua atividade. As liberações dos mediadores químicos inibitórios atuam nas células de Purkinje, e também, nos interneurônios da camada molecular e granular (ROOSTAEI et al. 2014). Todavia, por serem as únicas saídas do córtex cerebelar, danos por EtOH às células de Purkinje refletem em sua aferência excitatória, de modo causar disfunção e ataxia cerebelar (MAMELI et al., 2008; ZHANG et al., 2017).

Destaca-se que a plasticidade sináptica propriamente dita envolve a obtenção de novas informações a partir da formação de novas sinapses, enquanto que informações antigas são esquecidas devido as podas sinápticas (OMS, 2018). Referente a plasticidade neural, citam-se como principais elementos, os

neurotransmissores (GUERRI e PASCUAL, 2010), fatores neurotróficos (BDNF), neurogênicos, angiogênicos (VEGF) e apoptose (KLINTSOVA et al., 2012).

Os neurotransmissores são mediadores químicos responsáveis pelas sinapses neuronais, entre os principais estão o ácido glutâmico ou glutamato (GLU) tido como o principal neurotransmissor excitatório do SNC, com ação na plasticidade neural, cognição e movimento e o ácido γ -aminobutírico (GABA), de ação contrária, produz efeitos depressivos (BORODINKY et al. 2013). Porém, o uso crônico do EtOH, ao longo prazo, promove baixa e alta regulação sobre os receptores dos sistemas GABAérgicos e glutamatérgicos. Na abstinência alcoólica, observa-se a redução dos receptores GABAérgicos, o que significa a diminuição da sensibilidade das células neurais, de outro modo, o aumento dos receptores glutamatérgicos promove um processo de hiperexcitabilidade neuronal, podendo ocasionar convulsões, *delirium* e acidentes vasculares (ZALESKI et al., 2004)

A neurotoxicidade por EtOH, também promove déficits neurais em decorrência das alterações teciduais e bioquímicas, a exemplo, a micróglia aumentada e astrócitos hipertrofiados, além da presença de citocinas pró-inflamatórias (HERNANDEZ et al., 2016). Também, durante a abstinência alcoólica, danos neuronais e mitocondriais são observados a partir das lesões influenciadas pela excitotoxicidade, neuroinflamação, presença de citocinas pró-inflamatórias e ativação da glia (GUERRI e PASCUAL, 2010).

Estudos observaram que ligação do EtOH aos receptores *Toll-Like* (TLRs) promoveu alterações nas funções genéticas herdadas, alterações sinápticas, perda neuronais e dependência, tanto na espécie humana, quanto animal (FULTON T et al., 2017). O uso de modo crônico pelos camundongos, ativaram os receptores TRL4 que produziram mediadores inflamatórios, induzindo neuroinflamação e desmielinização (ALFONSO-LOECHES et al., 2012). Em ratos adolescentes, o uso em *binge* promoveu o aumento das expressões de TLR4 e TLR, além das citocinas inflamatórias TNF α e IL-1 β , interferindo na substância branca, em especial, no córtex pré-frontal (CPF), havendo prejuízo funcional tanto na memória, quanto no aprendizado. (PASCUAL M et al., 2014)

No SNC, o metabolismo do EtOH induz o estresse oxidativo (EO) com formação de radicais livres (RL), ocasionando a neurotoxicidade e a neurodegeneração (HERNANDEZ et al., 2016). Porém, ressalta-se que o balanço oxidativo é derivado do equilíbrio entre a quantidade de EROs produzida *versus* atividade de enzimas

antioxidantes, à exemplo, a glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona redutase (GRed) e o superóxido dismutase (SOD) presentes no SNC (HERNANDEZ et al., 2016). Perturbações no equilíbrio redox, produzem EROs, RL e peróxidos, de forma há comprometer os componentes celulares, como proteínas, lípidos e o ADN. (BARBOSA et al., 2006)

Contudo, os efeitos nocivos do beber pesado episódico (BPE) ou *binge drinking* quanto as estruturas e ação do SNC precisam de mais esclarecimentos, pois existem muitas adversidades envolvidas, como o tempo do uso, tolerância e particularidade do bebedor (FERREIRA et al., 2001).

A neurotoxicidade causada por EtOH, pode resultar em alterações anátomo-histológica com prejuízos funcionais duradouros, seja em qualquer período de vida, entretanto, é na adolescência que grande parte das estruturas neurais se encontram em processo de maturação (HARPER, 2009; BEENSTOCK et al., 2011). O cerebelo, por exemplo, em resposta a intoxicação por EtOH manifesta danos que vão desde a redução da massa cerebelar por morte parcial dos neurônios aos sintomas clínicos que caracterizam ataxia cerebelar, estes bastantes consistentes quanto ao uso agudo do EtOH (FERNANDES et al., 2017).

De outro modo, estudos radiológicos em humanos descrevem para o diagnóstico da degeneração cerebelar alcoólica (LEE et al., 2015), um processo patológico em que os neurônios do cerebelo, área do cérebro que controla a coordenação muscular e equilíbrio, podem se deteriorar e apresentar disfunções do movimento e equilíbrio (DEHEB, 2005).

De acordo com Umphred (2004) na degeneração cerebelar pode ocorrer uma desorganização do movimento com diminuição do equilíbrio e do controle postural central. Do mesmo modo que, lesões cerebelares causam sintomas motores distintos, caracterizando vários déficits motores, entre eles movimentos voluntários irregulares, imprecisos, e distúrbios da marcha com força normal e associado à hipotonia.

2.3 O CONSUMO INTENSO E EPISÓDICO DE ETANOL – *BINGE DRINKING*

A OMS e Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) tem procurado avaliar a frequência e quantidade de consumo do EtOH por pessoa, pois nos últimos anos o consumo de bebidas alcoólicas entre os adolescentes tem se modificado, e

dado origem a um padrão perigoso para o adolescente, o BPE ou *binge drinking* (BD) (OMS, 2006).

Dados epidemiológicos têm expressado ao longo dos anos o padrão de consumo de EtOH, com também, o perfil dos usuários. O último Relatório Global sobre Álcool e Saúde, constatou-se que 43% da população mundial havia consumido o EtOH aos 15 anos de idade, e 18,2 % teria feito de modo pesado e episódico. Mas, o que chama atenção é a redução em cerca de 2,3% deste padrão quando avaliado na esfera global, e o crescimento de 6,7%, no Brasil (OMS, 2018)

No Brasil, em 2012, realizou-se um levantamento para analisar a quantidade e a frequência com que os adolescentes consumiam EtOH, de modo a se intoxicarem em pequeno espaço de tempo, e observou-se um aumento de 10% quando comparado ao ano de 2006, e também, um crescimento de 11% quanto realizado em pelo ao menos uma vez na semana (OMS, 2006; INPAD, 2014).

O BD é uma prática conhecida na literatura internacional e empregada no mundo todo, pois trata-se de um padrão de consumo relevante devido estar associado às alterações biopsicossociais, podendo ocasionar riscos iminentes a vida, entre eles, dependência, violência física e psicológica, alterações nas atividades psicomotoras envolvendo diminuição dos reflexos e coordenação motora (HECKMANN e SILVEIRA, 2009).

Na literatura científica, diferentes terminologias definem o padrão *binge*, tornando inviável a padronização da definição internacional (PARADA, 2010). Porém, entre as definições mais aceitas ao padrão *binge*, é o consumo correspondente a 5 ou mais UBP para os homens, e 4 ou mais UBP para as mulheres, em uma única ocasião, pelo ao menos nas últimas semanas, equivalendo uma concentração igual ou superior a de 0,08 g/dl de EtOH no sangue, após seu consumo (NIAAA, 2004). O *Journal of Studies on Alcohol and Drugs* (JSAD), descreve o padrão como um consumo de modo repetido, em um longo período de tempo com 2 ou mais dias, resultando no processo de intoxicação acompanhado por atitudes negligentes as obrigações (JSAD, 2015)

Para a OMS, o BD corresponde a um padrão de consumo intenso e prolongado, geralmente mais que um dia, em cada ocasião, e intercalados com períodos de abstinência (OMS, 2014).

Para o SNC, o beber em *binge* causa danos neurológicos relacionados a cognição, atenção, ao julgamento e a coordenação motora (LARANJEIRA et al.,

2007). Em adolescentes, devido o cérebro estar passando por processo de maturação neural, a prática do BD ocasiona prejuízos na função motora e cognitiva, e na comunicação entre as áreas cerebrais (PASCUAL *et al.*, 2014; NIXON, 2013; JACOBUS e TAPERT, 2013).

A monitoração do padrão BPE ou em *binge* na adolescência é relevante para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e políticas públicas. Do mesmo modo que buscar conhecimentos dos eventos moleculares subjacentes aos efeitos do EtOH sobre o cérebro adolescente, ajuda nas estratégias terapêuticas para as desordens neurais (GUERRI e PASCUAL, 2010)

2.4 ADOLESCÊNCIA

A adolescência é um período fugaz do desenvolvimento humano onde há transição da infância para a idade adulta, com alterações biopsicossociais relevantes para afirmação e consolidação na vida adulta (NIXON, 2013). Contudo, a maturidade biológica antecede a psicossocial que é marcada por comportamentos impulsivos, curiosos e exploratórios (JAWORSKA e MACQUEEN, 2015). Em meio a estes acontecimentos muitos adolescentes consomem o EtOH de modo nocivo e expondo-se a riscos e prejuízos sociais (CISA, 2014)

Objetivando compreender o desenvolvimento do adolescente, a OMS, procurou dividir as faixas etárias da adolescência nos seguintes grupos, o precoce (10 a 14 anos), médio (15 a 17 anos) e o tardio (18 a 19 anos). Contudo, destaca-se que a faixa etária do adolescente pode ser ampliada até os 24 anos, de modo sobrepor a dos jovens (WHO, 1989).

Além do desenvolvimento fisiológico, o cérebro adolescente passa por mudanças até alcançar sua plenitude, e esse processo de remodelação permite a sua reestruturação funcional (PETIT *et al* 2013). Esse processo reconstrutivo é representado pela neurogênese, sinaptogênese, pelos hormônios e mensageiros químicos (PASCUAL *et al.*, 2014; CREWS *et al.*, 2007).

Ao longo da maturação, a reestruturação do SNC permite a formação de novas conexões sinápticas, e eliminação de outras, refletindo assim no afinamento cortical. De outro modo, a substância branca é aumentada pelo crescimento da mielinização dos axônios (JACOBUS e TAPERT, 2013) que influencia no potencial de ação dos

impulsos nervosos (SOWELL et al., 2004; GUERRI e PASCUAL, 2010; PETIT et al, 2013; PASCUAL et al., 2014).

No decorrer da maturação, o desenvolvimento cognitivo e psicossocial faz parte do processo de refinamento do circuito neurológico e amadurecimento da função cerebral (RISHER et al., 2015). Do ponto de vista funcional o desenvolvimento cognitivo, motor e sensorial são fundamentais para a performance do adolescente, e as variáveis, como neurotransmissores, plasticidade e remodelação sináptica, também implicam funcionalmente nas regiões neurais, a exemplo, o córtex pré-frontal (CPF) que é responsável pelas funções executivas do adolescente (GUERRI e PASCUAL, 2010).

Na adolescência, o EtOH é a droga lícita mais usada, e o grau da exposição é proporcional aos prejuízos estruturais e funcionais (GUERRI e PASCUAL, 2010; NIXON, 2013). Alguns estudos justificam esses transtornos através da predisposição ou antecedentes genéticos que envolvem o contexto do adolescente (CISA, 2015).

A imaturidade neuroquímica e a neuroplasticidade intensificada em regiões límbicas permitem maior sensibilidade ao EtOH, o que leva provavelmente o consumo precoce da bebida, e conseqüentemente, alteração do desenvolvimento neural, como exemplo, função cerebral imatura e desvio na neurocognição (Pascual et al., 2014). Comprometimento dos processos neuroquímicos e neurocomportamentais também refletem em prejuízos motores e cognitivos. (NGUYEN-LOUIE et al., 2017).

Em geral, acredita-se que a faixa etária adequada para ser dado início ao consumo do EtOH seja a partir dos 21 anos de idade, por se tratar de uma fase de transição para a idade adulta onde o desenvolvimento social está à frente do desenvolvimento neurológico (NGUYEN-LOUIE et al., 2017). Vale reforçar que o consumo nocivo do EtOH pode ocasionar além dos comportamentos antissociais, o uso de drogas ilícitas, aparecimento de doenças crônicas e dependência (NIAAA, 2019)

Baseado no IV Levantamento de Uso de Drogas entre Estudantes Brasileiros, 60% das crianças e adolescentes entre 10 a 19 anos já haviam consumido o EtOH (CEBRID, 2010). Anos depois, o IBGE (2013) revelou que 34% dos adolescentes que consumiam o EtOH tinham em torno de 15 a 17 anos (SCHUCKIT et al., 2014). Em 2015, a Pesquisa Nacional de Saúde Escolar (PeNSE) realizada pelo IBGE, também foi confirmado o consumo precoce do EtOH por estudantes na faixa etária de 13 a 17 anos, alguns casos com episódios de embriagues (CISA, 2017). Em relação ao sexo

feminino, apesar de serem mais vulneráveis, foi observado também um crescimento do consumo de EtOH nos últimos anos (INPAD, 2013; ANDRADE et al., 2009).

Dessa forma, conclui-se que o consumo do EtOH na adolescência é uma realidade ampla e difundida na sociedade, e que precisa ser avaliada como também trabalhada pelas autoridades civis e governamentais, de modo minimizar o consumo precoce e indevido de bebidas alcoólicas (CISA, 2015), pois existe uma tendência entre os adolescentes ao consumo pesado e episódico do EtOH chamado de *binge drinking*, que está relacionado a diversos prejuízos sociais, físicos e mentais (GIGLIOTTI e COPETTI, 2013).

2.5 BASES NEUROANATÔMICAS DO CEREBELO

2.5.1 Anatomia e Histologia do Cerebelo

O cerebelo é um órgão do sistema suprasegmental separado do cérebro pela tenda do cerebelo, uma prega de dura-máter, e unido à medula e ao tronco encefálico por seus pedúnculos cerebelares superiores, médios e inferiores (MACHADO e HAERTEL, 2013). Macroscopicamente o cerebelo é constituído de uma porção ímpar, o vérmis, ligado a duas massas laterais, os hemisférios cerebelares, ainda na superfície sulcos transversais superficiais separam as folhas do cerebelo, enquanto que os mais profundos, separam grupos de folhas em lóbulos (MACHADO e HAERTEL, 2013)

O córtex medular, formado por substância cinzenta, forma toda a superfície externa do órgão, como também reveste uma porção de substância branca central, o corpo medular, de onde partem folhas ou as lâminas brancas do cerebelo. No corpo medular também é possível evidenciar quatro núcleos de substância cinzenta, chamados núcleos profundos do cerebelo (LARSELL, 1970)

Considerando a dissociação anatomofisiológica do cerebelo, foram propostos diversos modelos de divisões funcionais para este órgão, entre eles, o de LARSELL (1970) que divide o órgão em três porções anatomo-funcionais, o lobo flóculo-nodular e o corpo do cerebelo, sendo este dividido nos lobos anterior e posterior a partir da fissura prima. Outra importante divisão é filogenética, baseada no desenvolvimento evolutivo desta estrutura. Nela, tem-se o arquicerebelo que corresponde ao lóbulo flóculo-nodular; o paleocerebelo, correspondente ao lobo anterior de Larsell somado à pirâmide e à úvula - componentes do lobo posterior naquela divisão - e o

neocerebelo, correspondente ao restante do lobo posterior (MACHADO e HAERTEL, 2013).

Histologicamente, o córtex cerebelar é organizado em três camadas, a molecular, de Purkinje e a granular. A camada molecular, mais externa, apresenta os interneurônios inibitórios, as células estreladas e em cesto, além dos dendritos das células de Purkinje e axônio dos neurônios da camada granular, denominados de fibras paralelas (APPS e HAWKES, 2009)

A camada média, ou de células de Purkinje, é constituída por corpos celulares de Purkinje posicionados lado a lado em uma única camada. Os dendritos dessa camada são projetados para a camada molecular, recebendo aferências de outros componentes estruturais como fibras trepadeiras e interneurônios inibitórios e excitatórios; enquanto os axônios estão direcionados e projetados em direção aos núcleos cerebelares e núcleos vestibulares do tronco encefálico. Diante disso, destaca-se o papel das células de Purkinje como importantes células integradoras e efetoras na comunicação neuronal cerebelar, integrando informações do núcleo pontino e núcleo da oliva inferior (RAMNANI, 2006; APPS e HAWKES, 2009).

Mais profundamente encontra-se a camada granular com a maior densidade de neurônios, cita-se células granulares, além de interneurônios de Golgi, células de Lugaro, células em escova e em candelabro. Uma unidade sináptica denominada de glomérulo cerebelar, que compreende as terminações nervosas das fibras musgosas com células granulares e neurônios de Golgi, interagindo entre si em processos inibitórios e excitatórios (RAMNANI, 2006; APPS e HAWKES, 2009).

Além de todos os tipos celulares já citados, cabe ainda mencionar a importância das células da glia sobre o desenvolvimento normal, estando responsáveis, dentre outras funções, pela secreção de diversos fatores tróficos indispensáveis aos neurônios. Ademais, contribuem também no processo de reparação tecidual, composição da barreira hemato-encefálica e sustentação neuronal, representando, pois, mais um grupo celular que, se afetado, pode interferir na produção do movimento (MARTIN, 2013).

Tendo em vista a diversidade de estruturas celulares no cerebelo, observa-se uma complexa circuitaria nervosa de inibições e excitações sinápticas, apresentando *inputs* e *outputs* entre diversas regiões cerebrais. Como mencionado anteriormente, o cerebelo atua ativamente no processo regulatório de atividades e aprendizado motor,

e para isso, o cerebelo estabelece comunicações com córtex motor do prosencéfalo (ATWELL et al., 2002; APPS e HAWKES, 2009).

Alterações na atividade das células de Purkinje reflete na forma de disfunção cerebelar e ataxia cerebelar, do mesmo modo que, os núcleos profundos, identificados como fastigial, interpósito e denteado, quando afetados pela ativação inadequada das Células de Purkinje (CsP), também promovem alteração na saída excitatória dos núcleos profundos, como a ativação profunda de CsP, é apresentada como uma disfunção cerebelar e ataxia. A ativação das CsP diminui o débito excitatório de núcleos profundos do cerebelo, levando à disfunção cerebelar e ataxia. Alternativamente, a supressão das CsP aumenta a saída excitatória de núcleos profundos do cerebelo, levando ao alívio da disfunção cerebelar e ataxia (DAR et al., 2015).

A partir das eferências das CsP, formam-se os tratos e vias, entre eles, o trato fastigiobulbar que exerce controle sobre a manutenção do equilíbrio e da postura; as vias interpósito-rubrospinal e interpósito-tálamo-cortical, que exercem controle sobre a musculatura distal dos membros, permitindo o ajuste fino de movimentos; as vias dento-tálamo-cortical e a interpósito-tálamo-cortical, que se dirigem ao trato corticoespinal, exercendo controle sobre ajustes finos de movimentos de grupos musculares distais (GUYTON e HALL, 2014)

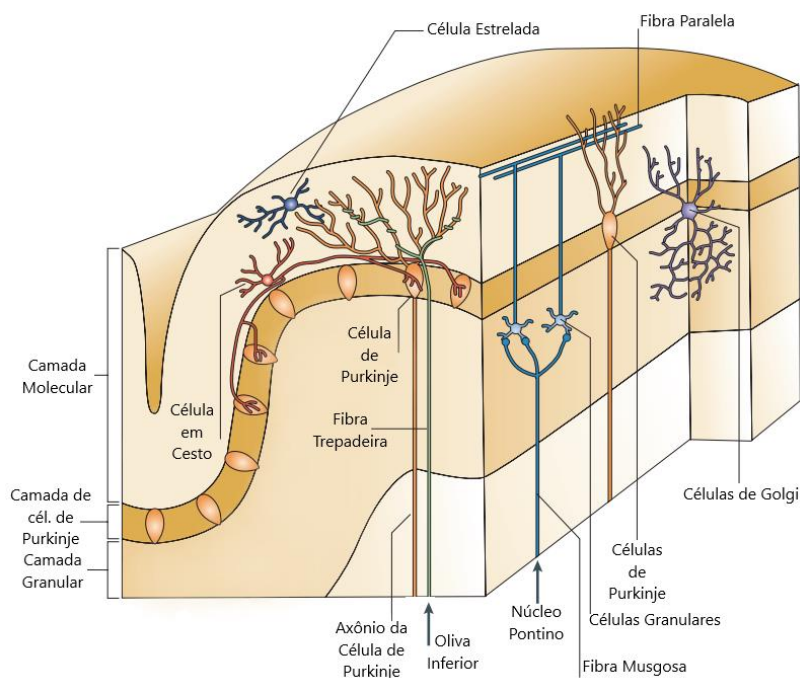


Figura 2. Representação esquemática da microanatomia cerebelar. Fonte: Adaptado de Rammani et al. (2006)

2.5.2 Neurofisiologia do Cerebelo

Assim como acontece no córtex cerebral, junto aos seus núcleos, as diferentes áreas do corpo humano também estão relacionadas, topograficamente, as diferentes áreas do cerebelo. A exemplo, a porção axial do corpo, representada principalmente pelo vérmis, a face e os membros, pelas massas laterais ou lobos cerebelares (RAMNANI, 2006).

A forma das associações neurais, permitem ao cerebelo o modelo de um tecido multimodal de associação e integração de informações, tanto sensoriais, quanto motoras (BUGALHO, 2006), as áreas do corpo emitem projeções aferentes ao cerebelo para realização de ajustes motores, ao mesmo tempo, a área envolvida do corpo recebe as eferências das CsP, a partir das regiões representadas pelo córtex cerebelar (ARTWELL et al., 2002). Informações advindas do córtex cerebral através da via córtico-ponto-cerebelar, induz a regulação da atividade motora com formação de um plano motor, baseado na intenção e meta estabelecida pelas áreas superiores do SNC. Da zona lateral, as informações são conduzidas através do tracto córtico-espinal às regiões efetoras relacionadas, e responsáveis pela execução do movimento (KANDEL et al., 2014).

No início da atividade motora, informações sensoriais são captadas por diversos órgãos proprioceptivos e sensoriais, e enviadas através das vias aferentes espino-cerebelares à zona intermédia do cerebelo, os quais se transmite aos órgãos efetores através da via interpósito-tálamo-cortical (MACHADO, 2011). Na atividade motora dos núcleos profundos, o núcleo denteado associa-se ao planejamento das ações, enquanto que, o interpósito às correções em diferentes momentos da atividade motora (GUYTON e HALL, 2011)

Estudos também apontam que, o cerebelo encontra-se implicado no processo de adaptação à realização de movimentos repetitivos, através da aprendizagem motora (ATWELL et al., 2002). As fibras do núcleo olivar inferior ao chegarem no cerebelo, transformam-se em fibras trepadeiras, exercendo papel modulador excitatório sobre as células de Purkinje (MACHADO, 2013)

2.6O TREINAMENTO FÍSICO E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

2.6.1 O Treinamento Físico e os Efeitos Neuroprotetores

A prática de atividade física provém de ações ou movimentos que envolvem gastos de energia e alterações orgânicas benéficas para os aspectos gerais da saúde física e mental (PITANGA, 2010; CONTREIRA e CORAZZA, 2009).

Em contrapartida, quando planejada, estruturada e advinda de protocolos controlados e padronizados passa a denominar-se de treinamento físico (TF), agindo na prevenção, reabilitação orgânico-funcional, tratamento de doenças crônicas, modulação de hormônios, entre outros. (FERREIRA, 2011). No entanto, ressalta-se que o tipo de TF regular, duração e intensidade são fatores fundamentais para a obtenção de bons resultados (MOURÃO, 2010)

Por entender que o TF beneficia vários sistemas orgânicos, diversas modalidades como natação, exercício acrobático ou voluntário, esteira e outros, de alta e baixa intensidade, intermitente ou contínuo, de curta ou longa duração, com diferentes protocolos têm sido utilizados para avaliar os seus efeitos na função cerebral (ARIDA et al., 2007).

Dessa forma, entende-se que a prática regular do TF pode ser utilizada como um recurso preventivo e terapêutico para saúde (PERREY, 2013) capaz de reduzir o índice de morbidade e mortalidade na saúde pública (NUNES e DALL'AGOS, 2008).

Ao contrário do sedentarismo que está associado às inúmeras patologias, o TF tem sido relevante ao combate de doenças neurológicas e neurodegenerativas, como também, atenuação às respostas neurais quanto ao estresse oxidativo e imunodepressão (DISHMAN et al., 2006), atuando também em aumento do sistema antioxidante e diminuição dos níveis da peroxidação lipídica (ARIDA et al., 2007)

Portanto, os efeitos neuroprotetores do TF ganharam importância nas últimas décadas tornando-se foco de pesquisas tanto em humano, quanto em animal (MOURÃO, 2010; FERREIRA, 2011).

Estudos com sessões de TF citam o metabolismo cerebral em níveis aumentados com excelência na plasticidade, neurogênese e angiogenese (AGUIAR JR e PINHO, 2007), de modo a refletir nas mudanças estruturais e funcionais das do SNC, em especial, nas áreas motoras (REAL, 2009; FERREIRA, 2011, SALAME, 2013).

Outra intervenção, é a prevenção e/ou melhora da função cerebral em doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e a de Alzheimer (AGUIAR JR e PINHO, 2007; DISHMAN et al., 2006; PERREY, 2013), além de reduzir risco de doenças crônicas e metabólicas, provavelmente por exercer efeito anti-inflamatório em cada sessão de treinamento (GLEESON et al., 2011).

Do mesmo modo, tem-se mostrado capaz em proteger o cérebro do declínio mental, em decorrência do envelhecimento e lesão cerebral, facilitando a recuperação funcional pós-lesão (REAL, 2009; FERREIRA, 2011). Cita-se que TF influencia de modo positivo na restauração da função cerebral, proporcionando melhor aprendizagem, memória e neuroplasticidade, tanto no cérebro saudável quanto o danificado (KLINTSOVA et al., 2012).

O TF, devido induzir alterações fisiológica, bioquímicas e psicológicas, pode ser visto como uma intervenção não medicamentosa para o tratamento de distúrbios relacionados aos aspectos psicobiológicos, tais como depressão, ansiedade e dependência química (MELLO et al., 2005). Sendo assim, estudos epidemiológicos reforçam a teoria de que o TF é favorável tanto na esfera física quanto a psicológica devido a atividade ocasionar em pessoas moderadamente ativas menor risco de desenvolver transtornos quando comparados às sedentárias (ANTUNES et al., 2006).

Porém, o TF aeróbico e anaeróbico, sobretudo de alta intensidade está associado aos danos celulares e teciduais, motivados pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SOUZA e FERNANDES, 2006). As EROs durante os treinos são produzidas por distintos mecanismos, como redução parcial de oxigênio nas mitocôndrias, processo inflamatório, bem como, processos de isquemia e perfusão (MCRIDE e KRAEMER, 1999).

Embora exista um paradoxo em relação aos benefícios do TF e a formação de radicais livres (RL), existem indicações de que o ambiente celular aumente a concentração endógena de antioxidantes para compensar o estresse provocado pelo treinamento (SOUZA e FERNANDES, 2006).

O TF pode promover adaptação do sistema antioxidante com as enzimas de regulação, proporcionando redução aos danos oxidativos (MOURÃO, 2010).

Pesquisa em ratos mostrou que o TF voluntário aumentou a peroxidação lipídica, ao passo de que outros protótipos de treinamento atenuaram os danos oxidativos, sendo assim, acredita-se que os protocolos também possam interferir nos resultados (MOURÃO, 2010). Como exemplo, o TF de forma aguda modula

negativamente os efeitos do estresse, contribuindo com a atenuação das respostas neurais a ele (DISHMAN et al., 2006).

Diversas pesquisas ao longo dos anos vêm estudando os efeitos neuroprotetores do TF, embora algumas ações já sejam confirmadas na literatura, como melhoria da plasticidade neuronal, indução de angiogênese e excelência no metabolismo cerebral (AGUIAR e PINHO 2007). Cita-se também uma redução na progressão de doenças degenerativas, como Mal de Parkinson e Alzheimer (PERREY, 2013). Também, considera-se pela atividade anti-inflamatória do TF, a capacidade em regular a modulação funcional do tecido nervoso, após lesão do tecido nervoso, e também, proteger alterações neurais pelo envelhecimento, diminuindo o risco de déficits (GLEESON, 2011).

Durante algum tempo acreditou-se que haveria um efeito deletério advindo da prática do TF regular, em função da produção aumentada de EROs, (MCBRIDE e KRAEMER, 1999). Entretanto, existem processos celulares adaptativos às condições do treinamento, sugerindo, pois, o aumento concomitante da produção de antioxidantes intracelulares, a fim de contrabalancear o processo oxidativo (SOUZA e FERNANDES, 2006)

2.6.2 Treinamento Físico, Neuroplasticidade e Neuroproteção

Durante décadas acreditou-se que o SNC fosse imutável, porém, já se sabe que os neurônios passam por mudanças morfológicas e funcionais em respostas aos estímulos ambientais, esse processo dinâmico chamado de neuroplasticidade apresenta grande variabilidade neuronal que modificam a fisiologia do SNC permitindo assim a conservação do processamento de informação e desenvolvimento de novas funções (SALAME, 2013 e LENT et al., 2008).

A neuroplasticidade é também descrita como um processo adaptativo através do qual o SNC se reorganiza frente às informações obtidas, ou seja, às experiências vividas, sendo fundamental para a reparação tecidual, como também para os aspectos cognitivos, como memória e aprendizagem (SALE et al. 2014). No entanto, na adolescência o processo age majoritariamente nas sinapses e, em nível celular e molecular em menor grau, mas ainda assim responsável por mudanças estruturais e funcionais do sistema nervoso (PERREY, 2013; SALE et al., 2014)

De acordo que as atividades motoras, qualificam o funcionamento neural por induzir mudanças plásticas e dinâmicas no SNC, favorecendo os processos de neurogênese, angiogênese e sinaptogênese (BORELLA e SACHELLI 2008). Ou seja, o TF influencia a plasticidade neural, promovendo mudanças biológicas e físico-químicas, como também, modulação da expressão de fatores neurotróficos e oxigenação do SNC (PERREY, 2013; FERNANDES et al., 2018).

Em animal, a estimulação neural quando realizado na presença de ambientes enriquecidos por objetos, como espelhos, escadas e rodas, mostrou alterações morfofuncionais de diversas regiões corticais, a exemplo, o aumento da espessura de camadas no córtex visual, aumento do número de sinapses, ampliação do volume e peso cerebrais, crescimento dos núcleos e corpos neuronais, além de alterações químicas, como quantidade aumentada de neurotransmissores (ROSENZWEIG, 1996). Outros efeitos observados na presença de estímulos, foram regulação negativa sobre eventos apoptóticos, aumento na produção e liberação de antioxidante no microambiente neuronal, modulação na síntese e degradação de neurotransmissores, de forma interferir diretamente no funcionamento do SNC (KLINTSOVA et al. 2012). Outros experimentos em animais sãos e submetidos à lesão neural indicaram transformações adaptativas em diversas áreas corticais, desde o nível químico até o nível de transmissão sináptica, com mudanças na trajetória dos axônios e aumento da mielinização destes (JOHANSSON, 2000).

O aumento das substâncias químicas pelo TF, também promovem o desenvolvimento neuronal. A exemplo, as neurotrofinas *Glial Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) e do BDNF responsáveis pela mudança estrutural e fisiológica do SNC, agem diretamente sobre a expressão gênica dos neurônios (OGONOVSKY et al. 2005; SEBBEN et al. 2011). O BDNF, possui papel fundamental como regulador da plasticidade sináptica, na função cerebral, especialmente, pelo treinamento (CALLAGHAN et al., 2006)

A plasticidade neuronal como mecanismo neuro-protetor atua em inúmeras variáveis capazes de promoverem a regeneração e a sobrevivência de neurônios, como também a supra-regulação dos fatores de crescimento neurais, que concedem proteção ao SNC através do crescimento e desenvolvimento de novos neurônios (MOURÃO, 2010).

Contudo, embora os estudos incentivem a prática do TF como meta para a conservação ou melhora do SNC, através da plasticidade neural, ainda não se tem uma compreensão exata para esse mecanismo (PERREY, 2013).

Dessa maneira, torna-se importante investigar a ação do TF de moderada intensidade como uma possível estratégia neuroprotetora, para os efeitos deletérios do EtOH no padrão *binge* sobre o cerebelo.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os possíveis efeitos neuroprotetores do treinamento físico aeróbico em esteira de moderada intensidade contra os efeitos nocivos do consumo de EtOH em padrão *binge-drinking* no cerebelo de ratos da adolescência à idade adulta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar a possível modulação do perfil da bioquímica oxidativa do cerebelo de ratos adultos expostos a 4 ciclos repetidos de EtOH no padrão *binge*, avaliando parâmetros pró e antioxidantes;
- b) Avaliar os efeitos do EtOH no padrão *binge* sobre a população de células de Purkinje em cerebelo de ratos;
- c) Investigar os efeitos da exposição a 4 ciclos de EtOH em padrão *binge* sobre a imunomarcção de componentes estruturais da mielina e vesículas sinápticas;
- d) Analisar os efeitos da exposição ao EtOH durante a adolescência à fase adulta sobre as funções motoras cerebelares de ratos;

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Quarenta ratos machos *Wistar*, pesando entre 100 e 150 g com a idade de 30 dias, foram utilizados nesta investigação. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (4 animais cada) com água e ração *ad libitum* e mantidos em sala climatizada (25 °C) com ciclo claro/escuro de 12:12 h (luzes acesas às 7h). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Pará, sob o protocolo CEPAE-UFGA: 227-14, seguindo o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NRC, 2011). Os animais experimentais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos:

- 1) Grupo Controle: animais sedentários que receberam H₂O destilada por gavagem;
- 2) Grupo Treinado: animais exercitados que receberam H₂O destilada por gavagem;
- 3) Grupo EtOH: animais sedentários que receberam 3g/kg/dia de EtOH, 20% (p/v) por gavagem;
- 4) Grupo Treinado e EtOH: animais exercitados que 3g/kg/dia de EtOH, 20% (p/v) por gavagem.

O desenho experimental está resumido na figura 3.

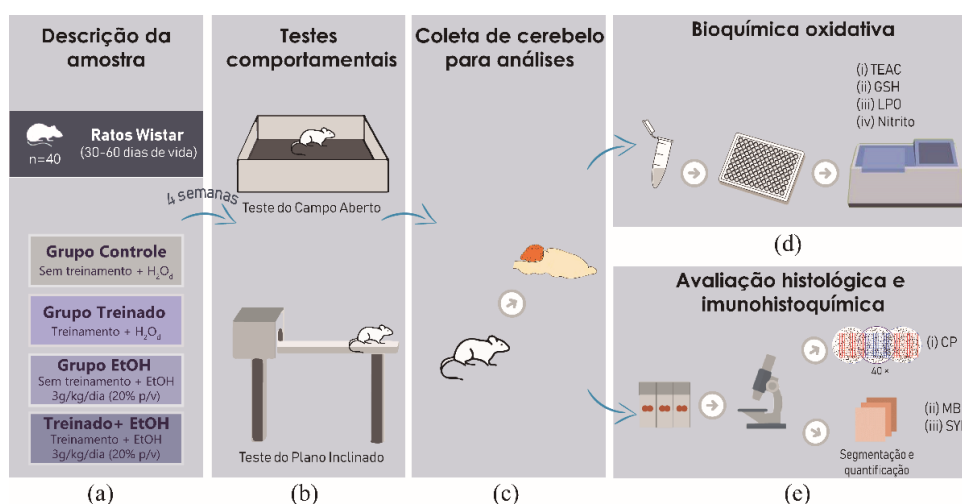


Figura 3. Descrição da amostra e etapas experimentais. (A) Descrição da amostra e divisão de grupos experimentais de TF em esteira gavados com EtOH ou H₂O destilada. (B) Os ensaios comportamentais: testes de *Open Field* e *Beam Walking*. (C) Coleta do cerebelo para análises. (D) Análise do equilíbrio oxidativo através da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), glutatona reduzida (GSH),

peroxidação lipídica (LPO) e níveis de nitrito (nitrito). (E) Análise histológica por quantificação de células de Purkinje (CP) e avaliação imunohistoquímica por anti-sinaptofisina (SYP) e anti-proteína básica de mielina (MBP). Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018).

O protocolo de TF foi adaptado de Arida et al. (2007), a partir do qual os animais foram submetidos a 5 dias consecutivos de TF durante 4 semanas na esteira sem grau de inclinação (MasterOne). A escala de TF é descrita na Fig 4.

Após cinco dias de TF em esteira, foi realizado um ciclo de tratamento com EtOH tipo *binge*. Este ciclo envolveu uma única administração de EtOH/ dia, através de gavagem intragástrica, durante 3 dias consecutivos, seguidos de 4 dias de folga. Os animais do grupo controle receberam apenas água destilada, no mesmo protocolo (LAUING et al., 2008; LINDTNER et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014). O ciclo de TF em esteira e a exposição ao EtOH em *binge* duraram 4 semanas, sendo os animais pesados semanalmente para ajuste de dose e acompanhamento da massa corporal.

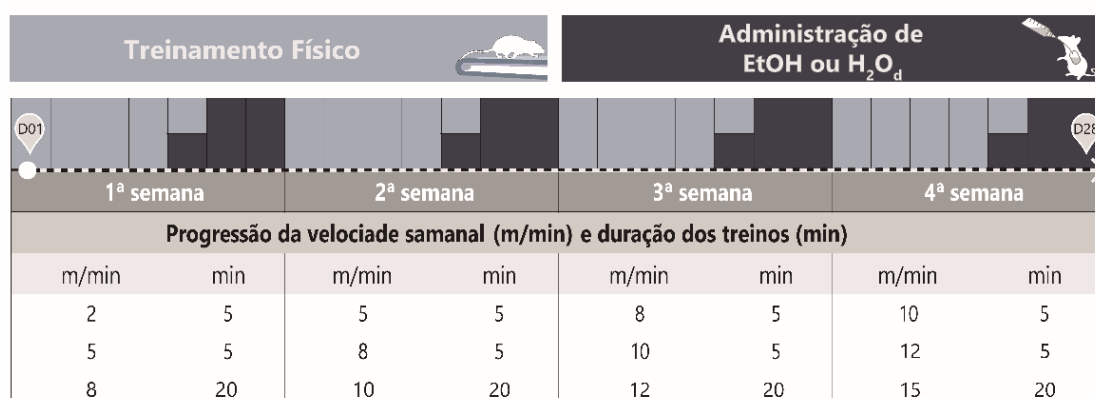


Figura 4. Esquema do protocolo de TF e exposição ao EtOH. Desenho experimental do protocolo de TF em esteira e administração de EtOH ou H₂O destilada por gavagem intragástrica, durante 3 dias consecutivos, por 4 semanas. O TF a cada semana apresentou três velocidades no mesmo treino. O protocolo de TF foi adaptado de Arida et al. (2007). Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018).

4.2. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Vinte e quatro horas após o último dia de protocolo de exposição ao EtOH e treinamento físico em esteira, os animais foram conduzidos para a sala de ensaio para testes comportamentais motores. Os testes do campo aberto (*Open Field*) e caminhada sobre vigas graduadas (*Beam walking*) foram conduzidos entre 11:00 e 18:00 em uma sala de som atenuado sob luz de baixa intensidade (12 lux), onde os ratos foram habituados por pelo menos 2 horas antes de iniciar os testes.

4.2.1. Teste do Campo Aberto (*Open Field*)

As análises de locomoção espontânea e atividade exploratória vertical foram avaliadas pelo protocolo de campo aberto (WALSH & CUMMINS, 1976). Os animais foram colocados na arena (100 x 100 x 40 cm), sendo o chão dividido virtualmente em 25 quadrantes iguais (20 x 20 cm). Primeiramente, cada animal foi colocado no centro do chão e observado por cinco minutos. O número total de interseções foi analisado pelo software ANY-maze™ (Stoelting, EUA).

4.2.2. Teste da Caminhada sobre Varas Graduadas (*Beam Walking*)

Após o ensaio de campo aberto, os animais foram submetidos ao teste de *Beam Walking*. Neste experimento, a coordenação motora e o equilíbrio foram avaliados com base na capacidade dos animais de atravessar uma série graduada de vigas estreitas para alcançar uma plataforma de segurança fechada. O aparelho consiste em vigas de madeira (100 cm de comprimento) suspensas a 50 cm do chão, o que permite aos ratos acessarem uma plataforma segura (caixa fechada de 20 x 20 cm). Os animais foram brevemente aclimatados nas vigas de uma área transversal maior, e um limite de 120 segundos foi fixado para alcançar a caixa. A fim de intensificar a dificuldade da tarefa, os animais foram submetidos a duas sessões de teste (tempo de corte de 60 segundos) em cada viga de seção quadrada (12 mm e 5 mm), respectivamente. A latência para alcançar a caixa fechada foi medida em segundos, e o número de escorregões foi registrado considerando um ou ambos os membros posteriores escorregados do feixe (KARL et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2018).

Após os testes comportamentais, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical e os cerebelos foram imediatamente removidos para posteriores análises bioquímicas. Os outros 5 animais de cada grupo foram perfundidos e os cerebelos foram destinados às avaliações histológicas.

4.3. ANÁLISES DA BIOQUÍMICA OXIDATIVA

Após a coleta do cerebelo, o tecido dissecado foi limpo em solução salina, congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado a -80 °C. Em seguida, o tecido foi descongelado e ressuspendido em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) a 4°C e homogeneizado sonicamente. A preparação do tecido para análise bioquímica

oxidativa foi descrita em detalhes em nossos estudos anteriores (TEIXEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

4.3.1. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC)

Para análise do nível TEAC, utilizamos o método descrito por Rufino et al. (2007) e o método adaptado de nosso estudo anterior (MIRANDA et al., 2018). Resumidamente, o ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolino) -6-sulfônico (ABTS; 7 mM) foi incubado pela adição de persulfato de potássio (2,45 mM) à temperatura ambiente durante 16h para produzir o radical ABTS+. A solução de trabalho foi preparada a partir do radical ABTS+ em tampão fosfato salina (PBS; pH 7,2) até a absorvância a 734nm. Posteriormente, 35µL desta solução ou padrões Trolox (curva padrão) foram adicionados a 2970µL de solução de ABTS, e a absorvância foi lida após 5 minutos. As absorvâncias foram medidas em triplicata e calculadas segundo uma curva padrão com concentrações de padrão de Trolox (RE et al., 1999). A capacidade antioxidante total foi expressa em µmol/L.

4.3.2. Conteúdo de Glutathiona Reduzida (GSH)

A determinação dos níveis de GSH foi baseada na habilidade da GSH em reduzir o ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) ao ácido nitrobenzóico (TNB), quantificado por espectrofotometria a 412nm. Assim, a metodologia descrita por Ellman (1959) foi adaptada para essa determinação. Inicialmente, uma alíquota (20µL) do sobrenadante foi adicionada em um tubo contendo água destilada (20µL) e solução de PBS pH 8,0 (3mL) para realizar a primeira medição. Em seguida, 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB; 0,47mMol) foi adicionado à solução, e outra medida foi realizada após 3 minutos (SCHALDCHER et al., 2014; MIRANDA et al., 2018). A concentração de GSH foi expressa em µg/mL.

4.3.3. Níveis de Peroxidação Lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi estimada como os níveis de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-alquenos (4HDA), conforme detalhado anteriormente por Esterbauer e Cheeseman (1990). Como descrito anteriormente em nossos estudos (TEIXEIRA et al., 2014; BITTENCOURT et al., 2017), uma alíquota do sobrenadante foi processada conforme descrito pelo kit Bioxytech LPO-568 (Cayman Chemical). Este kit é um reagente cromogênico que reage com o MDA a 45 ° C. A medição da absorvância nos espectrofotômetros foi realizada a 586 nm de comprimento de onda.

4.3.4. Níveis de Nitritos

Para quantificação de nitrito, utilizamos o protocolo descrito por Green et al. (1981), que consiste em usar o sobrenadante de uma alíquota de homogenato bruto que foi centrifugada a 21.000 por 20min a 4 °C, para analisar os níveis de nitrito. Resumidamente, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 20min com o reagente de Griess (0,1% naftiletenodiamina e 1% sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% - 1: 1). A absorbância foi medida a 550 nm por um espectrofotômetro e comparada às soluções padrão de nitrito de sódio.

4.3.5. Concentração de Proteínas

A medição do teor de proteína nos sobrenadantes (20µL) foi realizada conforme descrito por Bradford (1976), a fim de corrigir os valores de LPO e nitrito pela concentração de proteínas. Assim, os resultados dos níveis de LPO e nitrito foram corrigidos e expressos em porcentual do grupo controle.

4.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Após avaliação comportamental, 5 animais de cada grupo foram utilizados para análise tecidual. Os animais foram profundamente anestesiados com cloridrato de cetamina (90mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg) e perfundidos através do coração com PBS 0,1 M heparinizada (1%) seguida por paraformaldeído a 4%. Os cerebelos foram removidos do crânio e pós-fixados por 4 horas em solução de *Bouin*. Em seguida, os cerebelos foram desidratados em soluções crescentes de EtOH, diafanizados em xilol e embebidos em *paraplast (McCormick®)*. Secções de 5 µm de espessura foram obtidas por cortes coronais no micrótomo e, em seguida, colocadas em lâminas de microscopia.

4.4.1. Análises Imunohistoquímicas

Para análise imuno-histoquímica as secções do cerebelo dos animais foram montadas em lâminas de microscopia revestidas com 3-aminopropiltriétoxi-silano (Sigma®). O comprometimento da mielina foi avaliado utilizando um anticorpo contra a proteína básica de mielina (MBP), um componente importante da mielina compacta. Além disso, utilizamos anti-sinaptofisina (SYP) para imunomarcção de vesículas sinápticas.

Todos os procedimentos imunohistoquímicos foram conduzidos de acordo com os estudos publicados anteriormente (LIMA et al., 2016; FAGUNDES et al., 2016; ARAGAO et al., 2018; SANTANA et al., 2019). Resumidamente, os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em soluções decrescentes de EtOH (100%, 100%, 90%, 80%, 70%) e hidratados em PBS 0,1 M por 5 min. A recuperação do sítio antigênico foi realizada com solução tampão citrato (pH 6,0), previamente aquecida a 60 °C, por 20 min. Depois disso, as secções foram resfriadas a temperatura ambiente e incubadas em solução metanólica de peróxido de hidrogénio a 3% (H₂O₂) ao abrigo da luz durante 20 min para a inibição da atividade da peroxidase endógena. Em seguida, as secções foram lavadas três vezes em solução de PBS/Tween (1%) durante 5min e incubadas com soro normal de cavalo a 10% e albumina sérica bovina a 3% (BSA, Sigma®), diluídos em PBS durante 1h. As secções foram novamente lavadas durante 5min (três vezes) e incubadas em complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Kit, *Vector Laboratories*®) durante 2h. As secções foram lavadas três vezes (cinco minutos cada) em solução PBS e reveladas com 3,3-diaminobenzidina (DAB). Após a reação do DAB, as secções foram lavadas duas vezes em PBS, contracoradas com hematoxilina de *Mayer*, desidratadas usando álcoois e xilol e montadas com *Entellan* (*Merck*®).

Para análise quantitativa da imunomarcação de MBP e sinaptofisina, fotomicrografias foram adquiridas por um microscópio Axioscope (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com uma câmera colorida AxioCam HRC CCD (Carl Zeiss) com a mesma amplia o de 40x. As fotomicrografias foram adquiridas na região da segunda folha cerebelar de 5 sec es por animal, 3 micrografias por sec o (5 animais por grupo). As fotomicrografias foram segmentadas pelo plugin *Color Deconvolution* (Gabriel Landini, <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>) utilizando o software *ImageJ*(NIMH, NIH, Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Posteriormente, os valores da fra o de área (%) da revela o por DAB foram medidos nas sec es (FERNANDES et al., 2015; LIMA et al., 2016; FAGUNDES et al., 2016). Os valores obtidos foram expressos como média \pm erro padrão médio.

4.4.2. Contagem de Neurônios de Purkinje

Para análise das células de Purkinje, as sec es de tecido foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). O número de neurônios de Purkinje foi avaliado usando

uma gradícula quadrada de 0,25 mm de largura na ocular do microscópio para avaliações quantitativas. Essa grade corresponde a uma área de 0,0625mm². Pelo menos 3 campos no cerebelo por seção e 3 seções por animal de cada grupo foram analisados, adaptados de Lima et al. (2016) para o cerebelo.

4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a coleta de dados, todos os resultados foram tabulados e analisados pelo software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA); a distribuição dos dados foi testada pelo método de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade. A curva de peso foi avaliada com análise de variância (ANOVA) de 2 vias seguido do teste *post hoc de Tukey*. A bioquímica oxidativa, a análise das células de Purkinje e os testes comportamentais foram analisados pela ANOVA de 1 via e pelo teste *post hoc de Tukey*, exceto pela marcação imunohistoquímica, na qual utilizou-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, devido à análise da fração de área. Os valores obtidos foram expressos como média \pm erro padrão médio, e os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. A EXPOSIÇÃO A REPETIDOS CICLOS DE EtOH NO PADRÃO *BINGE* E AO TFm NÃO INTERFERIU NO GANHO DE PESO DE RATOS.

Após os repetidos ciclos de exposição ao EtOH em padrão *binge*, e TFm durante 4 semanas, não promoveu alterações no peso dos animais ($p=0,538$; Fig. 04). Ao final do período de experimentação, os animais não apresentaram diferença significativa na massa corporal (Grupo Controle: $129,6 \pm 14,9$; Grupo Exercício: $126,7 \pm 10,69$; Grupo EtOH: $124 \pm 8,232$; Grupo EtOH + Exercício: $119,3 \pm 11,62$).

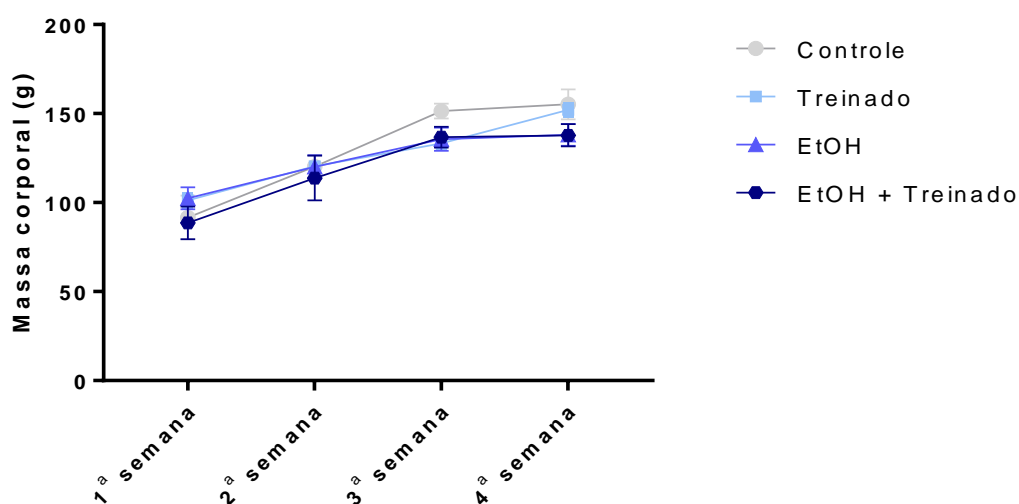


Figura 5. Curva de ganho de peso dos animais experimentais Efeitos dos ciclos repetidos de TFm e exposição ao EtOH no padrão *binge* durante 4 semanas no ganho de massa (g) corporal da adolescência à fase adulta em ratos *Wistar*. Resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA – 2 vias e pós teste de *Tukey*, $p>0,05$. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018).

5.2. O TFm MINIMIZOU O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO NO CEREBELO DE RATOS APÓS 4 CICLOS DE EXPOSIÇÃO AO EtOH NO PADRÃO *BINGE*.

A exposição tipo *binge* ao EtOH diminuiu os níveis de TEAC (Grupo EtOH: $80,13 \pm 6,16$; Figura 4A) no cerebelo de ratos quando comparados ao grupo controle ($99,88 \pm 2,445\%$; $p= 0,015$). Esse desbalanço do parâmetro antioxidante foi evitado pelo TFm (Grupo EtOH + Treinamento: $84,87$; $p= 0,863$; Figura 5A). Além disso, como

observado na figura 5B, a exposição ao EtOH não promoveu modificação nos níveis de GSH ($p>0,999$) nos grupos experimentais.

Por outro lado, os fatores pró-oxidantes foram encontrados estatisticamente elevado após a exposição ao EtOH. O modelo de exposição tipo binge por 4 semanas foi capaz de modular a bioquímica oxidativa através do aumento dos níveis de LPO (Grupo EtOH: $748,3 \pm 69,62\%$) no cerebelo dos animais, apresentando diferença estatística ao comparar com o grupo controle ($100,00 \pm 28,05\%$; $p<0,0001$), como observado na Figura 5C. Em contraste, o TFM reduziu a LPO no cerebelo, refletindo a neuroproteção contra os efeitos do EtOH (Grupo EtOH + Treinamento: $83,02 \pm 19,25\%$; $p=0,977$). Nenhuma diferença na concentração de nitritos entre os grupos foi detectada ($p=0,178$; Figura 5D).

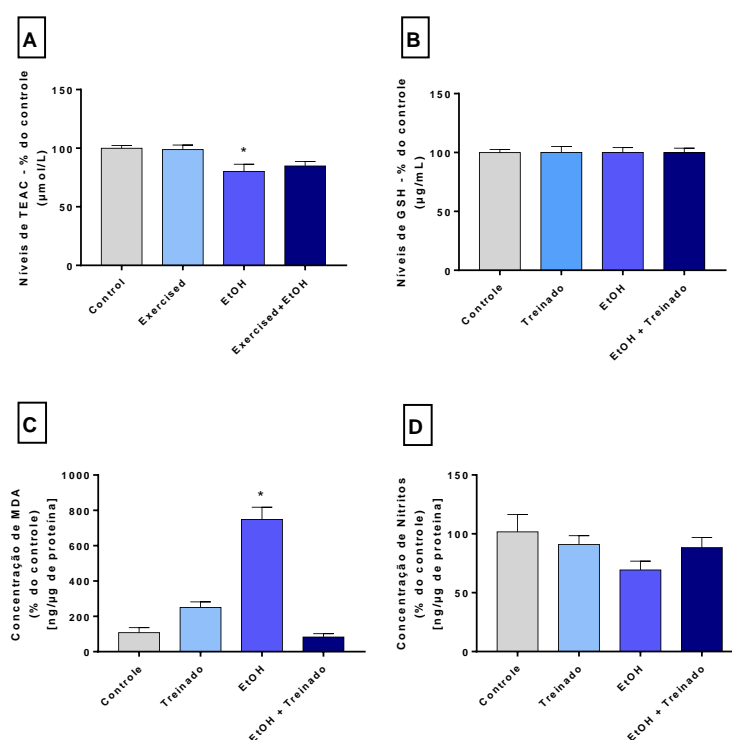


Figura 6. Perfil da bioquímica oxidativa dos grupos experimentais. Efeitos dos ciclos repetidos de TFM e exposição ao EtOH no padrão *binge* durante 4 semanas sobre a bioquímica oxidativa do cerebelo de ratos *Wistar*. (A) Níveis de TEAC; (B) Níveis de GSH; (C) Concentração de MDA; (D) níveis de nitritos. Resultados são expressos como média \pm erro padrão da média do percentual do grupo em relação ao controle. ANOVA – 1 vias e pós teste de *Tukey*, * $p<0,05$. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018).

5.3. O TFm REDUZIU DANOS TECIDUAIS NO CEREBELO DE RATOS CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO AO EtOH NO PADRÃO *BINGE* POR 4 SEMANAS.

A fim de avaliar se exposição ao EtOH no padrão *binge* seria capaz de causar alterações na morfologia cerebelar, executamos análise em HE para investigar os danos aos neurônios de Purkinje. Nossos resultados mostram que o padrão *binge* de consumo de EtOH reduz a população de neurônios de Purkinje em cerebelo de ratos (Grupo EtOH: $5,667 \pm 0,441$) quando comparado ao Grupo Controle ($8,875 \pm 0,5154$; $p= 0,0002$; Figura 6). Por outro lado, o TFm evitou os danos uma vez que o grupo EtOH + Treinamento não apresentou diferença significativa quando comparado ao Grupo Treinado (Grupo Treinado: $8,222 \pm 0,4938$; Grupo Treinado +EtOH: $7,875 \pm 0,4407$; $p> 0,481$; Figura 6).

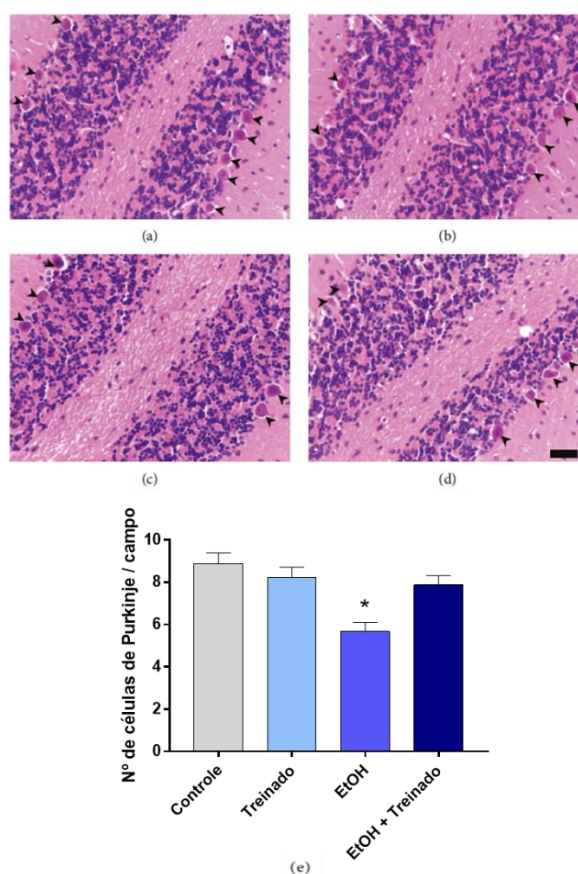


Figura 7. Contagem de Células de Purkinje. Efeitos dos ciclos repetidos de TFm e exposição ao EtOH no padrão *binge* durante 4 semanas sobre as células de Purkinje no cerebelo de ratos *Wistar*. Fotomicrografias representativas do grupo controle (a), grupo treinado (b), grupo EtOH (c) e grupo EtOH + Treinado (d). As cabeças de setas indicam células de Purkinje. Resultados são expressos como média \pm erro padrão da média do número de células contadas por campo (e). Barra de escala de $20\mu\text{m}$. ANOVA – 1 via e pós-teste de *Tukey*, $*p<0,05$. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018).

Além das alterações morfológicas causadas pela exposição ao EtOH, também foi observada redução na fração de área imunomarcada por anti-MBP no grupo somente exposto ao EtOH (Grupo EtOH: $39,54 \pm 1,822$; $p < 0,0001$) em comparação aos demais grupos. O grupo que executou Tfm protegeu a redução da fração de área de MBP (Grupo EtOH + Treinamento: $49,88 \pm 1,817$; Grupo Controle: $54,91 \pm 2,085$; $p = 0,243$), como observado na figura 7, indicando uma possível atividade neuroprotetora contra danos do EtOH no cerebelo.

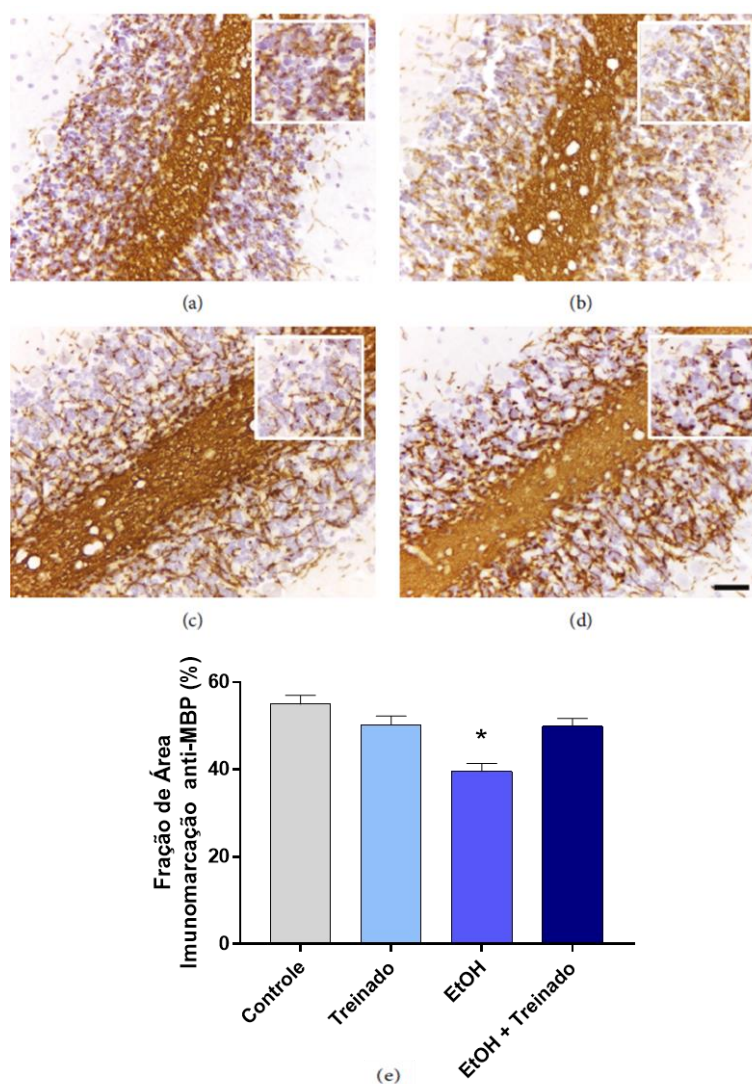


Figura 8. Quantificação da fração de área imunomarcada por anti-MBP. Efeitos dos ciclos repetidos de Tfm e exposição ao EtOH no padrão binge durante 4 semanas sobre a imunomarcagem de anti-MBP no cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografias representativas do grupo controle (a), grupo treinado (b), grupo EtOH (c) e grupo EtOH + Treinado (d). Resultados são expressos como média \pm erro padrão da média da porcentagem de área imunomarcada (e). Barra de escala de $20\mu\text{m}$. ANOVA – 1 via e pós teste de Tukey, $*p < 0,05$. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018).

Foi observada também uma notória redução da fração de área imunomarcada por anti-sinaptofisina ($p < 0,0001$) no grupo exposto ao EtOH, indicando danos às vesículas sinápticas, mas que pode ser minimizado pelo TFm (Grupo Controle: $54,69 \pm 1,333$; Grupo EtOH + TF: $55,45 \pm 0,8258$; $p=0,956$; Figura 8).

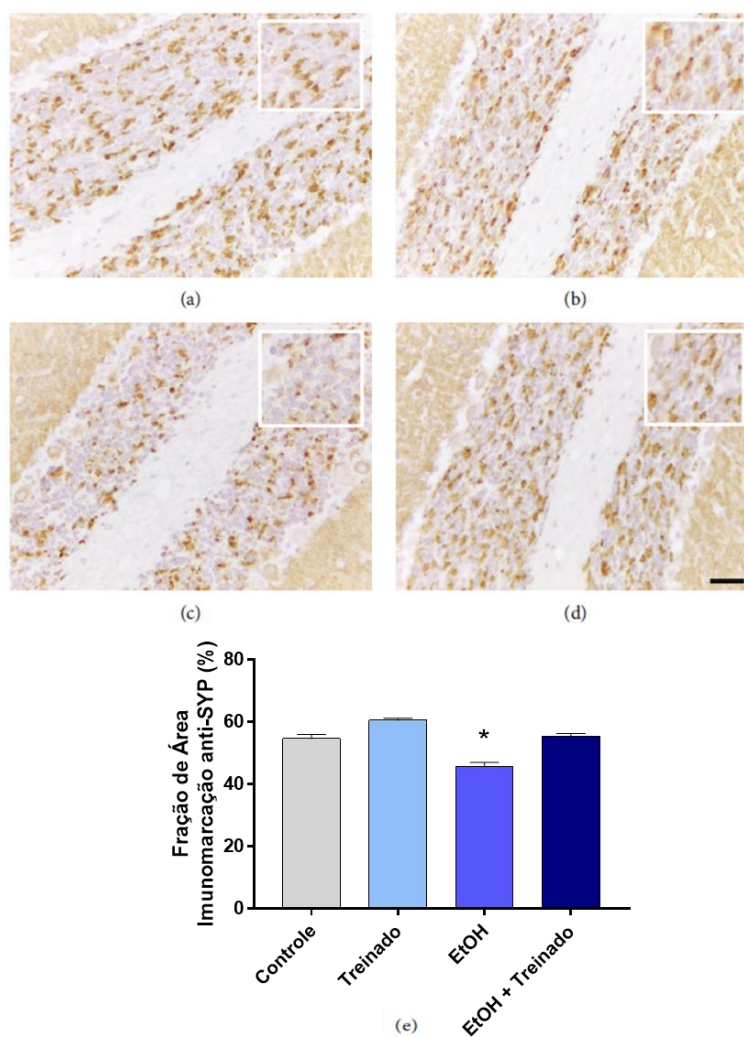


Figura 9. Quantificação da fração de área imunomarcada por anti-SYP. Imunomarcção de anti-sinaptofisina (SYP) no cerebelo de ratos expostos a ciclos repetidos de TFm e exposição ao etanol (EtOH) no padrão binge durante 4 semanas. Fotomicrografias representativas do grupo controle (a), grupo treinado (b), grupo EtOH (c) e grupo EtOH + Treinado (d). Resultados são expressos como média \pm erro padrão da média da porcentagem de área imunomarcada (e). Barra de escala de 20 μ m. ANOVA – 1 via e pós teste de Tukey, * $p < 0,05$. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018).

5.4. O DÉFICIT DE FUNÇÃO LOCOMOTORA ESPONTÂNEA HORIZONTAL, PELO DESBALANÇO OXIDATIVO E DANOS MORFOLÓGICOS EM CEREBELO DE RATOS DESENCADEADOS PELA EXPOSIÇÃO AO EtOH NO PADRÃO *BINGE*, FOI CONTORNADO PELO TF_m EM ESTEIRA.

A exposição ao EtOH no padrão tipo *binge* por 4 semanas em ratos induziu danos ao comportamento motor espontâneo. Entretanto, o TF_m em esteira proporcionou melhor desempenho nas atividades de locomoção horizontal espontânea, tanto na distância total percorrida (Grupo Controle: 19,74 ± 1,562; Grupo EtOH: 10,11 ± 2,021; p=0,005; Figura 9A) e no número de quadrantes cruzados (Grupo controle: 99,22 ± 12,17; Grupo EtOH: 36,44 ± 7,658; p= 0,0014; Figura 9B) na arena, como observado na figura 8.

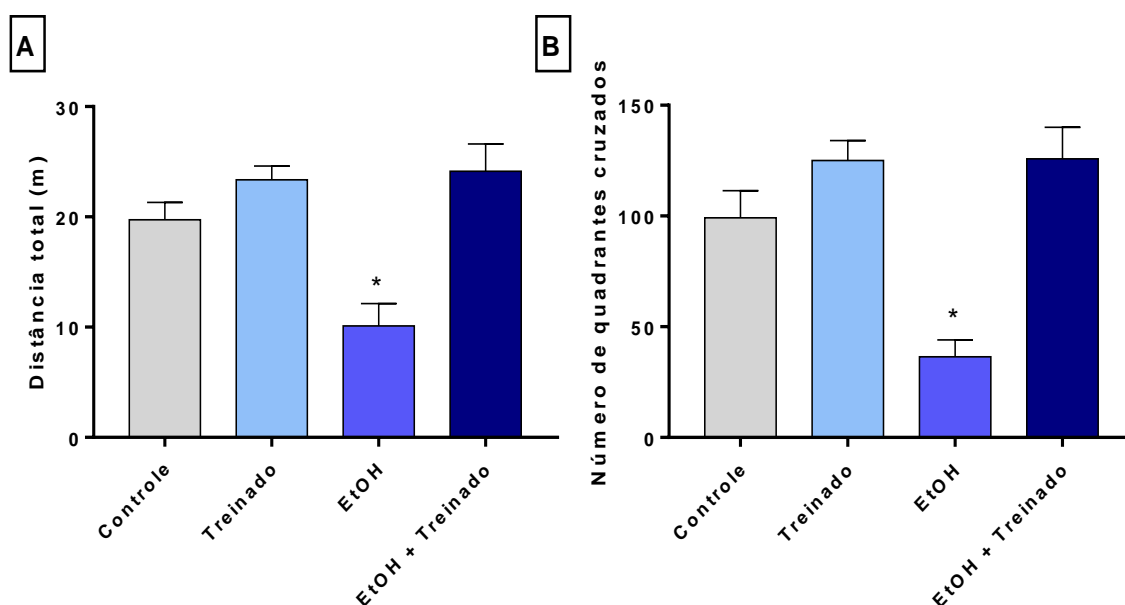


Figura 10. Avaliação da atividade locomotora espontânea horizontal. Efeitos dos repetidos ciclos de TF_m e exposição ao EtOH no padrão binge durante 4 semanas na locomoção espontânea horizontal de ratos Wistar. (a) distância total em metros, e (b) quadrantes totais cruzados no teste do campo aberto. ANOVA – 1 via e pós teste de Tukey, *p<0,05. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018).

Nos testes de coordenação motora e equilíbrio, os animais expostos ao EtOH apresentaram performances deficientes nos testes de vigas graduadas (*beam walking*), aumentando a latência para alcançarem a caixa segura nas vigas de 12mm

e 5mm (Grupo EtOH: 12mm = 47 ± 3 e 5mm = 33 ± 6 ; Grupo Controle: 12mm: $16,91 \pm 3,596$, $p < 0,001$ e 5mm: $13,38 \pm 1,749$, $p < 0,001$; Figura 10A). Além disso, o grupo EtOH aumentou o número de deslizamentos de patas durante os desafios com varas menores em comparação aos demais grupos (5 mm: Grupo Controle: $2 \pm 0,0$; Grupo Treinado: $2,65 \pm 0,3578$; Grupo EtOH: $4,556 \pm 0,5031$; Grupo EtOH + Treinamento: 2 ± 0 ; $p = 0,005$; Figura 10B). Entretanto, o TFM melhorou a performance dos animais reduzindo a latência para cruzar as vigas, assim como o número de deslizamentos de patas, restaurando a eficiência motora aos níveis controles.

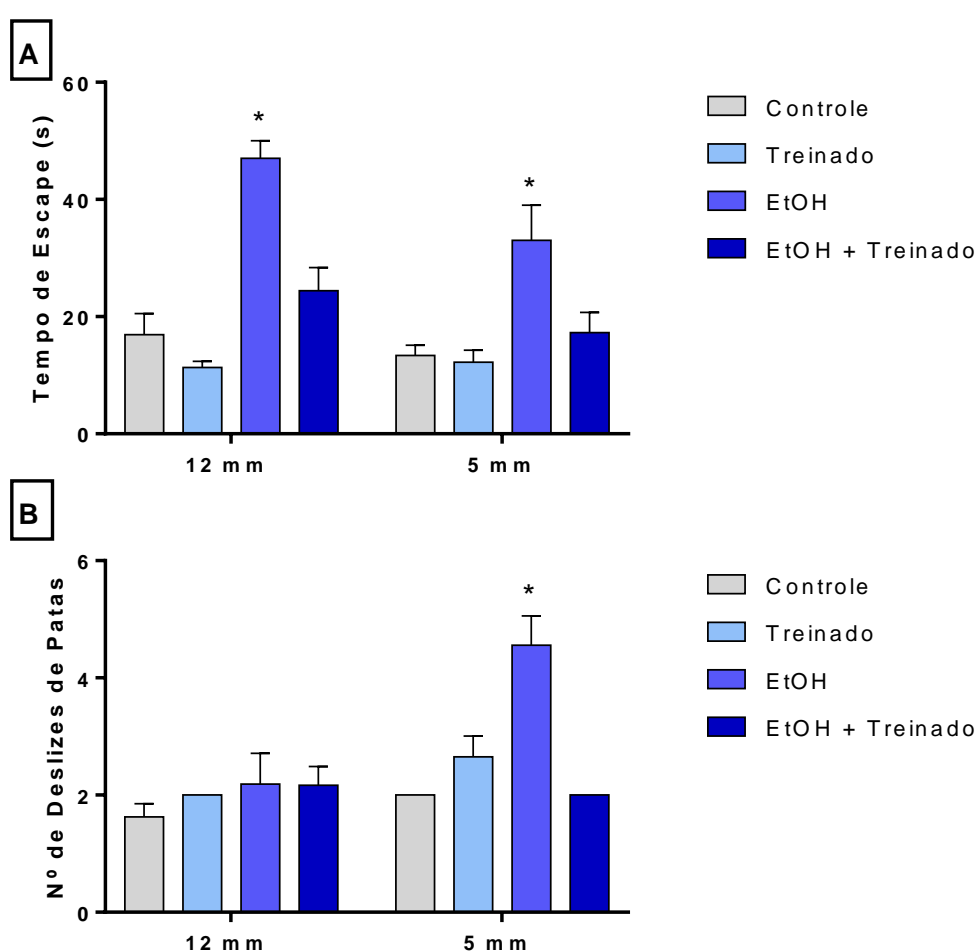


Figura 11. Avaliação da coordenação e equilíbrio motor. Efeitos de repetidos ciclos de TFM e EtOH tipo binge, durante 4 semanas, na coordenação motora fina e equilíbrio de ratos Wistar com 60 dias de idade. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média da (a) latência em segundos e (b) números de falha em feixes de 12mm e 5mm do teste de caminhada sobre vigas graduadas (beam walking). ANOVA uma via e pós teste de Tukey, * $p < 0,05$. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018).

Discussão

6. DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que a exposição ao EtOH por meio de 4 *binges* da adolescência até a idade adulta é capaz de promover alterações bioquímicas, teciduais e funcionais no cerebelo de ratos, o que pode ser minimizado através da neuroproteção proporcionada pelo exercício físico em esteira concomitante à exposição. Os presentes achados demonstram que o protocolo de consumo de EtOH proposto induz desbalanço da bioquímica oxidativa caracterizado pela redução dos níveis de TEAC e aumento da peroxidação lipídica, o que pode desencadear danos teciduais e comportamentais em ratos. Além disso, mostramos pela primeira vez na literatura que tais danos no cerebelo de ratos adultos promovidos pelo consumo excessivo de álcool podem ser minimizados pelo TFM aeróbico em esteira de Intensidade moderada.

O controle cerebral dos movimentos é realizado por várias regiões do SNC, entre eles, o córtex cerebral é responsável pelo planejamento e programação motora, além de comandar tanto a medula espinhal quanto o tronco encefálico que modulam os reflexos e os movimentos grosseiros (VALENZUELA & JOTTY, 2015). Um sistema de controle sensível e preciso é realizado pelo cerebelo e gânglios da base (VALENZUELA et al., 2010; PAILLARD et al., 2015). O cerebelo foi escolhido como área de investigação, uma vez que essa estrutura modula as vias motoras, os movimentos planejados e coordenados, bem como a aprendizagem motora (PAILLARD et al., 2015).

Neste contexto de controle motor, o cerebelo é considerado como a região do SNC que integra movimento e postura, de modo a controlar a distância e amplitude de movimento (VALENZUELA & JOTTY, 2015). Para modular o movimento, as fibras aferentes e eferentes do circuito cerebelar comunicam com várias regiões do sistema nervoso. As fibras musgosas e trepadeiras formam sinapses excitatórias com núcleos cerebelares profundos e células de Purkinje, direta ou indiretamente (VALENZUELA et al., 2010). Nesse estudo, avaliou-se a densidade da MBP, o padrão de comunicação sináptica e a preservação dos neurônios de *Purkinje* nas folhas cerebelares.

Os neurônios de *Purkinje* foram escolhidos para analisar os danos causados pelo EtOH, já que figuram como os principais elementos do circuito cerebelar. Essas células são de fundamental importância na calibração sensório-motora devido a sua

atividade durante as tarefas motoras a fim de promover a eficiência no desempenho (VALENZUELA et al., 2010). Além disso, os neurônios de *Purkinje* podem influenciar nas atividades sensório-motoras, transferir a plasticidade do córtex cerebelar para os núcleos profundos e contribuir diretamente para o comando motor (PAILLARD et al., 2015). Em nosso estudo, encontramos uma diminuição da densidade de neurônios de *Purkinje* em animais expostos ao EtOH, fato que pode ter contribuído para os danos funcionais observados.

Além disso, encontramos uma redução na imunomarcagem da proteína sinaptofisina relacionada à sinapse após 4 semanas de consumo de EtOH no padrão *binge*. No entanto, é importante enfatizar que os neurônios cerebelares são capazes de se envolver em mecanismos compensatórios para manter a neurotransmissão em níveis normais (VALENZUELA & JOTTY, 2015). Além disso, EtOH é reportado como capaz de promover alteração em outras estruturas celulares, tais como organelas citoplasmáticas, núcleo e citoesqueleto, bem como alterações nos contatos sinápticos neuronais em culturas de células do córtex cerebral de ratos (MEDINA, 2011).

Além de reduzir a densidade de neurônios de *Purkinje* e a comunicação sináptica, o padrão de consumo de EtOH foi capaz de danificar a bainha de mielina. Sabe-se que os danos a essas estruturas podem causar déficits na condução do impulso elétrico durante o potencial de ação nos neurônios mielinizados, os quais são os principais responsáveis pela resposta motora (GUADOGNOLI et al., 2016). Acredita-se que esses dados reúnem evidências para apoiar nossa hipótese de que a exposição excessiva ao EtOH pode desencadear danos no cerebelo, que pode ser sugerido como elementos responsáveis pelo comprometimento motor encontrados em nossa investigação.

Deficiência na síntese de tiamina, modulação de ácido retinóico e neuroinflamação podem ser identificados como elementos responsáveis pelos danos causados ao SNC pelo EtOH, enquanto o estresse oxidativo é um forte mecanismo também associado aos danos como descrito em estudos anteriores (BUTTERMORE et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014; YANG & LUO, 2015). O estresse oxidativo é resultado de um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de neutralizá-las, sendo capaz de gerar danos celulares severos que

podem levar – após uma sequência de outros danos – às alterações comportamentais (YANG e LUO, 2015).

Apesar da literatura indicar o estresse oxidativo como um dos principais mecanismos de dano ao SNC causados pelo EtOH (MULLER et al., 2017; TAPIA-ROJAS et al., 2017; AGOSTINI et al., 2018), esta investigação é a primeira a descrever as mudanças oxidativas no cerebelo de ratos ocasionadas pelo padrão binge de consumo de EtOH da adolescência à fase adulta. Foi observado que mesmo com 4 episódios de *binge* durante o período experimental, há uma diminuição na capacidade antioxidante total e um aumento nos níveis de peroxidação lipídica no cerebelo. Isso foi previamente reportado por outros estudos, entretanto, em modelo de consumo crônico de EtOH (LUO, 2015; YANG & LUO, 2015; MULLER et al., 2017). Apesar dos mecanismos de danos ao SNC não estarem completamente elucidados, o estresse oxidativo é considerado como o mais relevante (AGOSTINI et al., 2018; HAMID et al., 2018). A intoxicação provocada pelo EtOH por exposição aguda, crônica ou tipo *binge* leva ao estresse oxidativo como resultado no desbalanço entre radicais livres e defesa antioxidante, como mencionado anteriormente, seguido pela formação de mais espécies reativas e peroxidação lipídica (BUTTERMORE et al., 2013; YANG e LUO, 2015). Recentemente, nosso grupo também demonstrou que a exposição ao EtOH levou ao estresse oxidativo com aumento dos níveis de MDA e, possivelmente, associado a reflexos no SNC que levam a desordens psiquiátricas e danos cognitivos (HERNANDEZ et al., 2016). Assim, esse quadro causado pelo consumo de EtOH pode estar associado ao aumento na atividade de CAT induzido pelo processo metabólico do EtOH, que gera excesso de H_2O_2 e radicais hidroxil ($OH\bullet$), que possui grande capacidade em levar à oxidação e danos à biomoléculas (BELEM-FILHO et al., 2018). Portanto, nós confirmamos que a toxicidade do EtOH durante o seu metabolismo leva ao estresse oxidativo devido às fortes moléculas oxidantes no corpo.

Quando se avalia a atividade motora do modelo de exposição *binge* proposto, os resultados indicaram que o EtOH promoveu mudanças na capacidade exploratória, uma vez que os animais expostos percorreram menor número de quadrantes e menor distância total. Além disso, no teste de caminhada sobre varas, os animais que consumiram álcool apresentaram pior desempenho motor caracterizado por maior número de quedas e menor capacidade para atividades que exigiam destreza motora.

Esses resultados corroboram aqueles recentemente encontrados em outro estudo do nosso grupo, que demonstrou que episódios de compulsão durante a adolescência impactam o desempenho motor (HERNANDEZ et al., 2016), bem como afetam outras áreas cerebrais, induzindo um comportamento ansiogênico e influenciando a memória de reconhecimento de curto prazo (FERNANDES et al., 2018). Acreditamos que o consumo de EtOH aumentou o fluxo sanguíneo cerebral e, como consequência, a demanda metabólica de oxigênio de modo que as regiões cerebrais relacionadas à atividade motora e à rede de comando central foram afetadas. Assim, o aumento do consumo de oxigênio resulta no aumento da produção de uma variedade de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido, OH^\bullet , óxido nítrico (NO) e oxigênio singlete devido ao vazamento de oxidação de elétrons relacionados à fosforilação da cadeia de transporte mitocondrial (HERNANDEZ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018). As EROs podem causar danos oxidativos aos componentes celulares, prejudicando a energia celular e modulando as vias de sinalização ("sinalização redox") que levam a várias mudanças agudas e crônicas no ambiente celular, especialmente no SNC (KUDIN et al., 2008). No geral, a diminuição dos níveis de antioxidantes e o aumento de ROS no cerebelo podem ser responsáveis por danos celulares, incluindo nos neurônios Pukinje, que resultaram em prejuízo na atividade motora, no comportamento ansiogênico e na falha na memória de reconhecimento de curto prazo.

Por outro lado, existem algumas estratégias para reverter, minimizar ou proteger o SNC de alterações causadas pelo estresse oxidativo (HOSEMBERG et al., 2010; SHICHIRI et al., 2014; HAN et al., 2015). Entre as estratégias de neuroproteção, o TFM é uma subcategoria de atividade física que envolve várias peculiaridades, como volume, frequência e intensidade. O TFM para o fortalecimento muscular, por exemplo, baseia-se principalmente em fontes de energia anaeróbicas (LUCZAJ et al., 2015). Por outro lado, os de resistência geralmente usam fontes de energia aeróbica (ROSEMBERG et al., 2010). Assim, o TFM aeróbico de intensidade moderada é essencial para manter boa saúde ajudando na prevenção de doenças crônicas, incluindo as neurodegenerativas (CECHETTI et al., 2012; ZOLADZ et al., 2014; DOUGHERTY et al., 2017). A este respeito, vários estudos relatam que o TFM moderado, de forma regular, estimula a função cerebral desempenhando um importante papel preventivo e terapêutico em casos de acidente vascular cerebral e doenças de Alzheimer e Parkinson (NEEPER et al. 1995; MONTENI et al., 2004;

OGONOVSKY et al., 2005; MARQUES et al., 2018). No entanto, os benefícios são amplos, incluindo a estimulação da neurogênese, aumento da capilarização, diminuição do dano oxidativo e aumento da degradação proteolítica pelo proteossoma e neprilisina, entre outros (OGONOVSKY et al., 2005).

Embora os treinamentos anaeróbicos, de fortalecimento muscular, apresentem alguma relevância em relação à melhora dos parâmetros relacionados ao SNC, como habilidades motoras, equilíbrio e coordenação (RADAK et al., 2007), nós escolhemos o treinamento aeróbico como um possível modulador de estresse oxidativo no cerebelo devido à sua capacidade em modular a bioquímica oxidativa também em outros tecidos, como o sangue (GARBER et al., 2011; CHAILIMONIUK et al., 2015). Em nossa investigação, o TF aeróbico em esteira de intensidade moderada foi capaz de modular os parâmetros antioxidantes enzimáticos, e não enzimáticos, no cerebelo de ratos, levando a manutenção da capacidade antioxidante total com redução dos níveis do estresse oxidativo por peroxidação lipídica. Um estudo em humanos, sobre o efeito do TFm após 12 e 24 meses, relatou a capacidade em modular enzimas antioxidantes, no entanto, o resultado do TFm parece depender do tempo, já que a diferença na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi observada em 12 meses, enquanto que na atividade da catalase (CAT) e redução da LPO foram encontradas após 24 meses (CHALIMONIUK et al., 2015). A ação do TFm nas atividades de enzimas antioxidantes ainda é conflitante, uma vez que alguns trabalhos citam a região do cérebro como requisito para ação antioxidante do TFm; a exemplo, do tronco encefálico e o corpo estriado que apresentaram aumento nos níveis de superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPX) (RYBAK et al., 1995; HAJIZADEH et al., 2018), enquanto no cerebelo não mudou. Outro dado interessante é que o TF aeróbico em esteira, não alterou as atividades de SOD, catalase ou GPX no cérebro de ratos (OGONOVSKY et al., 2005). Em animais, sugere-se que o TFm regule seletivamente os fatores antioxidantes, principalmente os enzimáticos, em diferentes regiões do cérebro, contudo devendo ser levado em consideração o tipo, intensidade e duração do treinamento, como também a idade, sexo e linhagem (OGONOVSKY et al., 2005).

Em animais, um protocolo de TFm em esteira durante 6 semanas não resultou diferença em SOD; entretanto, observou-se alterações em CAT, e redução do estresse oxidativo em regiões associadas a funções motoras, como o córtex motor, o

cerebelo e o estriado (GARBER et al., 2011). Nenhuma melhora foi observada usando nosso protocolo composto por 4 semanas de treinamento aeróbico com intensidade moderada (ARIDA et al., 2007); Os parâmetros antioxidantes não foram alterados em comparação ao grupo controle, o que indica um efeito neuroprotetor sobre a atividade antioxidante (GARBER et al., 2011). O treinamento não foi capaz de melhorar a capacidade do sistema antioxidante dos animais que não consumiram EtOH; isso pode ser explicado pelo fato de que as respostas antioxidantes dependem do tipo de exercício, volume e intensidade do protocolo de treinamento (RADAK et al., 2006).

Embora os parâmetros antioxidantes não tenham melhorado, o protocolo do treinamento foi capaz de evitar a redução da imunomarcação da proteína básica de mielina (MBP), bem como a diminuição da densidade de células de Purkinje causada pelo consumo de EtOH. Esses resultados podem ser decorrentes do TF aeróbico moderado ser capaz em aumentar a expressão de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso (CAMILETTI-MOIRON et al., 2013; FERNANDES et al., 2018). O TF possui efeitos modulatórios na energia hemostática através da melhora da função mitocondrial, levando a níveis aumentados de BDNF que ativam o fator de transcrição CREB (*cAMP response element binding protein*) através de receptores TrkB (*Tropomyosin receptor kinase B*). Esse processo cria um ciclo positivo para as cascatas, além de induzir a autofagia e promover um sistema antioxidante, tornando os neurônios mais resistentes ao estresse oxidativo por meio da ativação de mecanismos reguladores nessa célula (SARAULLI et al., 2017). Os sítios de ligação do DNA para CREB contribuem para o aumento da expressão do mRNA do BDNF, processo que pode ser regulado pelas EROs. O aumento de EROs estimula a expressão desses fatores que desempenham um papel fundamental no controle do processo oxidativo (OGONOVSKY et al., 2005; BO et al., 2013). Portanto, o TF pode levar à homeostase redox, estimulando o processo de regulação.

Nesse aspecto, a melhora funcional de um cérebro senil, está relacionado ao TF regular por atenuar o acúmulo de proteínas carboniladas relacionadas ao estresse oxidativo, como também aumentar a atividade do proteassoma (PEERI & AMIRI, 2015). Estudos com camundongos transgênicos que acumulam proteínas beta-amilóides, mostraram que o TF voluntário diminuiu o acúmulo de beta-amilóide no

cérebro, aumentando a atividade da neprilisina, uma proteína responsável pela degradação dos beta-amilóides (LAZAROV et al., 2005). Desse modo, alterações bioquímicas podem levar a danos celulares e resultar em redução da atividade motora, como visto neste estudo. Em contraste, o TF foi capaz de proteger o SNC de todas as alterações causadas pelo EtOH, incluindo danos bioquímicos, celulares e comportamentais. Toda essa proteção está condicionada à capacidade do TF em modular o processo antioxidante, fatores de crescimento e manutenção do SNC (SAMILETTI-MOIRON et al., 2013; FERNANDES et al., 2018).

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Foi constatado que o EtOH no padrão *binge* induziu o desequilíbrio bioquímico oxidativo a partir da diminuição dos níveis de TEAC e maior produção de LPO, o que pôde desencadear os danos teciduais e comportamentais em ratos. É provável que o dano tecidual, caracterizado pela diminuição do número de células de Purkinje tenha sido o principal responsável pelas mudanças no controle motor fino. Uma das principais contribuições desse estudo foi mostrar pela primeira vez que os danos ocasionados no cerebelo de ratos pelo consumo nocivo de EtOH podem ser minimizados pelo Tfm aeróbico em esteira de intensidade moderada, que evitou o desequilíbrio oxidativo como também minimizou os danos teciduais e funcionais no cerebelo, possivelmente levando à homeostase redox ao estimular o processo regulatório. Os principais achados estão na figura 11.

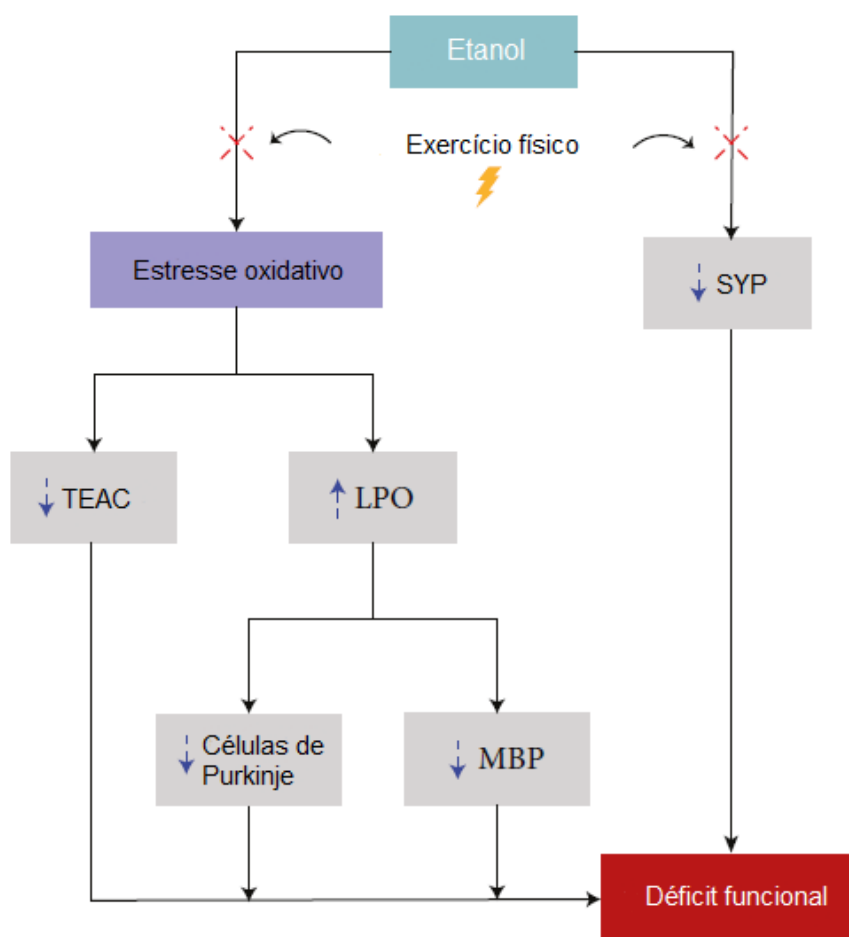


Figura 12. Resumo gráfico dos principais resultados. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018).

REFERÊNCIAS

AGOSTINI JF, TOÉ HCZD, VIEIRA KM, BALDIN SL, Costa NLF, CRUZ CU, Longo L, MACHADO MM, DA SILVEIRA TR, SCHUCK PF, RICO EP. 2018. Cholinergic system and oxidative stress changes in the brain of a zebrafish model chronically exposed to ethanol. *Neurotoxicity Research*, vol. 33, no. 4, pp. 749–758.

APPS R, HAWKES R. 2009. Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 10, p. 670–681.

ARAGÃO WAB, TEIXEIRA FB, FAGUNDES NCF, FERNANDES RM, FERNANDES LMP, DA SILVA MCF, AMADO LL, SAGICA FES, OLIVEIRA EHC, CRESPO-LOPEZ ME, MAIA CSF, LIMA RR. 2018. Hippocampal dysfunction provoked by mercury chloride exposure: evaluation of cognitive impairment, oxidative stress, tissue injury and nature of cell death. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, Article ID 7878050, 11 pages.

ARIDA RM, SCORZA FA, DE LACERDA AFS, DA SILVA SG, EA CAVALHEIRO. 2007. Physical training in developing rats does not influence the kindling development in the adult life, *Physiology & Behavior*, vol. 90, no. 4, pp. 629–633.

ATTWELL JEP, COOKE SF, YEO CH. 2002. Cerebellar Function in Consolidation of a Motor Memory. *Neuron*. Volume 34, p. 1011-1020.

BELÉM-FILHO IJA, RIBERA PC, NASCIMENTO AL, GOMES ARQ, LIMA RR, CRESPO-LOPEZ ME, MONTEIRO MC, FONTES-JÚNIOR EA, LIMA MO, MAIA CSF. 2018. Low doses of methylmercury intoxication solely or associated to ethanol binge drinking induce psychiatric-like disorders in adolescent female rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 60, pp. 184–194.

BITTENCOURT LO, PUTY B, CHARONE S, ARAGÃO WAB, FARIAS-JUNIOR PM, SILVA MCF, CRESPO-LOPEZ ME, LEITE AL, BUZALAF MAR, LIMA RR. 2017. Oxidative biochemistry disbalance and changes on proteomic profile in salivary glands of rats induced by chronic exposure to methylmercury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, Article ID 5653291, 15 pages.

BO H, JIANG, JI LL, ZHANG Y. 2013. Mitochondrial redox metabolism in aging: effect of exercise interventions, *Journal of Sport and Health Science*, vol. 2, no. 2, pp. 67–74.

BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248–254.

BUTTERMORE ED, THAXTON CL, BHAT MA. 2013. Organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. *Journal of Neuroscience Research*, vol. 91, no. 5, pp. 603–622.

CAMILETTI-MOIRON D, APARICIO VA, ARANDA P, RADAK Z. 2013. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, vol. 23, no. 4, pp. e202–e212.

CECHETTI F, WORM PV, ELSNER VR, BERTOLDI K, SANCHES E, BEN J, SIQUEIRA IR, NETTO CA. 2012. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. ***Neurobiology of Learning and Memory***, vol. 97, no. 1, pp. 90–96.

Chalimoniuk M, Jagsz S, Sadowska-Krepa E, Chrapusta SJ, Klapcinska B, Langfort J. 2015. Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats. ***Journal of Physiology and Pharmacology***, vol. 66, no. 4, pp. 539–547.

CHALIMONIUK M, JAGSZ S, SADOWSKA-KREPA E, CHRAPUSTA SJ, KLAPCINSKA, LANGFORT J. 2015. Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats. ***Journal of Physiology and Pharmacology***, vol. 66, no. 4, pp. 539–547.

CHARTIER K, CAETANO R. 2010. Ethnicity and health disparities in alcohol research. ***Alcohol Research & Health*** 33(1–2):152–160.

DA SILVA FBR, CUNHA PA, RIBERA PC, BARROS MA, CARTÁGENES SC, FERNANDES LMP, TEIXEIRA FB, FONTES-JÚNIOR EA, PREDIGER RD, LIMA RR, MAIA CSF. 2018. Heavy chronic ethanol exposure from adolescence to adulthood induces cerebellar neuronal loss and motor function damage in female rats. ***Frontiers in Behavioral Neuroscience***, vol. 12, p. 88.

DAR MS. 2015. Ethanol-Induced Cerebellar Ataxia: Cellular and Molecular Mechanisms. ***Cerebellum***. Aug;14(4):447-65.

DING YH, DING Y, LI J, BESSERT DA, RAFOLS JA. 2006. Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model,” ***Neurological Research***, vol. 28, no. 2, pp. 184–189.

DOUGHERTY RJ, SCHULTZ SA, KIRBY TK, BOOTS EA, OH JM, EDWARDS D, GALLAGHER CL, CARLSSON CM, BENDLIN BB, ASTHANA S, SAGER MA, HERMANN BP, CHRISTIAN BT, JOHNSON SC, COOK DB, OKONKWO OC. 2017. Moderate physical activity is associated with cerebral glucose metabolism in adults at risk for Alzheimer’s disease,” ***Journal of Alzheimer’s Disease***, vol. 58, no. 4, pp. 1089–1097.

EDENBERG HJ, MCCLINTICK JN. 2018. Alcohol Dehydrogenases, Aldehyde Dehydrogenases, and Alcohol Use Disorders: A Critical Review. ***Alcohol Clin Exp Res***. Dec;42(12):2281-2297.

EDENBERG HJ. 2007. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. ***Alcohol Res Health***; 30(1):5-13.

ELLMAN GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***, vol. 82, no. 1, pp. 70–77.

ESTERBAUER H, CHEESEMAN KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. ***Methods in Enzymology***, vol. 186, pp. 407–421.

FAGUNDES NC, FERNANDES LM, PARAENSE RS, de FARIAS-JUNIOR PM, TEIXEIRA FB, ALVES-JUNIOR SM, PINHEIRO Jde J, CRESPO-LÓPEZ ME, MAIA CS, LIMA RR. 2016. Binge drinking of ethanol during adolescence induces oxidative damage and morphological changes in salivary glands of female rats. ***Oxidative Medicine and Cellular Longevity***, vol. 2016, Article ID 7323627, 11 pages.

FERNANDES LM, TEIXEIRA FB, ALVES-JUNIOR SM, PINHEIRO Jde J, MAIA CS, LIMA RR. 2015. Immunohistochemical changes and atrophy after chronic ethanol intoxication in rat salivary glands. ***Histology and Histopathology***, vol. 30, no. 9, pp. 1069–1078.

FERNANDES LMP, CARTÁGENES SC, BARROS MA, CARVALHEIRO TCVS, CASTRO NCF, SCHAMNE MG, LIMA RR, PREDIGER RD, MONTEIRO MC, FONTES-JÚNIOR EA, Cunha RA, MAIA CSF. 2018. Repeated cycles of binge-like ethanol exposure induce IMMEDIATE and delayed neurobehavioral changes and hippocampal dysfunction in adolescent female rats,” ***Behavioural Brain Research***, vol. 350, pp. 99–108.

FERNANDES RM, CORREA MG, DOS SANTOS MAR, ALMEIDA APCPSC, FAGUNDES NCF, MAIA LC, LIMA RR. 2018. The effects of moderate physical exercise on adult cognition: a systematic review,” ***Frontiers in Physiology***, vol. 9, p. 667.

FERNANDES RM, CORREA MG, DOS SANTOS MAR, ALMEIDA APCPSC, FAGUNDES NCF, MAIA LC, LIMA RR. 2018. The Effects of Moderate Physical Exercise on Adult Cognition: A Systematic Review. ***Front Physiol***; 9: 667.

GARBER CE, BLISSMER B, DESCHENES MR, FRANKLIN BA, LAMONTE MJ, LEE IM, NIEMAN DC, SWAIN DP; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. 2011. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise,” ***Medicine and Science in Sports and Exercise***, vol. 43, no. 7, pp. 1334–1359.

GREEN LC, TANNENBAUM SR, GOLDMAN P. 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat,” ***Science***, vol. 212, no. 4490, pp. 56–58.

GUADAGNOLI T, CALTANA L, VACOTTO M, GIRONACCI MM, BRUSCO A. 2016. Direct effects of ethanol on neuronal differentiation: an in vitro analysis of viability and morphology. ***Brain Research Bulletin***, vol. 127, pp. 177–186.

HAJIZADEH MALEKI B, TARTIBIAN B, MOOREN FC, FITZGERALD LZ, KRÜGER K, CHEHRAZI M, MALANDISH A. 2018. Low-to-moderate intensity aerobic exercise training modulates irritable bowel syndrome through antioxidative and inflammatory mechanisms in women: results of a randomized controlled trial. ***Cytokine***, vol. 102, pp. 18–25.

HALLIWELL B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, ***Plant Physiology***, vol. 141, no. 2, pp. 312–322.

HAMID A, IBRAHIM FW, MING TH, NASROM MN, EUSOFF N, HUSAIN K, ABDUL LATIF M. 2018. Zingiber zerumbet L. (Smith) extract alleviates the ethanol-induced brain damage via its antioxidant activity," **BMC Complementary and Alternative Medicine**, vol. 18, no. 1, p. 101.

HAN JH, TIAN HZ, LIAN YY, YU Y, LU CB, LI XM, ZHANG RL, XU H. 2015. Quetiapine mitigates the ethanol-induced oxidative stress in brain tissue, but not in the liver, of the rat. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, vol. 11, pp. 1473–1482.

HERNANDEZ JA, LOPEZ-SANCHEZ RC, RENDON-RAMIREZ A. 2016. Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. ***Oxidative Medicine and Cellular Longevity***, vol. 2016, Article ID 1543809, 15 pages.

HERNÁNDEZ JA, LÓPEZ-SÁNCHEZ RC, RENDÓN-RAMÍREZ A. 2016. Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. ***Oxid Med Cell Longev***; 1543809.

JAWORSKA N, MACQUEEN G. 2015. Adolescence as a unique developmental period. ***J Psychiatry Neurosci***; Sep; 40(5): 291–293.

KANDEL ER, SCHWARTZ J, JESSELL TM, SIEGELBAUM SA, HUDSPETH AJ, DALMAZ C, QUILLFELDT JA. 2014. Princípios de Neurociências. **Editora AMGH**, 5ª ed., 1544 p.

KARL T, PABST R, VON HORSTEN S. 2003. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. ***Experimental and Toxicologic Pathology***, vol. 55, no. 1, pp. 69–83.

KLINTSOVA AY, HAMILTON GF, BOSCHEN KE. 2012. Long-term consequences of developmental alcohol exposure on brain structure and function: therapeutic benefits of physical activity. ***Brain Sci***. Dec 21;3(1):1-38.

KLINTSOVA AY, HAMILTON GF, BOSCHEN KE. 2013. Long-term consequences of developmental alcohol exposure on brain structure and function: therapeutic benefits of physical activity," ***Brain Sciences***, vol. 3, no. 4, pp. 1–38.

KUDIN AP, MALINSKA D, KUNZ WS. 2008. Sites of generation of reactive oxygen species in homogenates of brain tissue determined with the use of respiratory substrates and inhibitors. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics***, vol. 1777, no. 7-8, pp. 689–695.

LAUING K, HIMES R, RACHWALSKI M, STROTMAN P, CALLACI JJ. 2008. 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***, vol. 42, no. 8, pp. 649–656.

LAZAROV O, ROBINSON J, TANG YP, HAIRSTON IS, KORADE-MIRNICS Z, LEE VM, HERSH LB, SAPOLSKY RM, MIRNICS K, SISODIA SS. 2005. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. ***Cell***, vol. 120, no. 5, pp. 701–713.

LI D, ZHAO H, GELERNTER J. 2012a. Strong protective effect of the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2) 504lys (*2) allele against alcoholism and alcohol-induced medical diseases in Asians. *Human Genetics* 131(5): 725–737. PMID: 22102315

LI, TK. 2000. Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking. *Journal of Studies on Alcohol* 61(1):5–12.

LIMA RR, SANTANA LN, FERNANDES RM, NASCIMENTO EM, OLIVEIRA AC, FERNANDES LM, DOS SANTOS EM, TAVARES PA, Dos SANTOS IR, GIMARÃES-SANTOS A, GOMES-LEAL W. Neurodegeneration and glial response after acute striatal stroke: histological basis for neuroprotective studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 3173564, 15 pages, 2016.

LINDTNER C, SCHERER T, ZIELINSKI E, FILATOVA N, FASSHAUER M, TONKS NK, PUCHOWICZ M, BUETTNER C. 2013. Binge drinking induces whole-body insulin resistance by impairing hypothalamic insulin action, *Science Translational Medicine*, vol. 5, no. 170, article 170ra14.

LUCZAJ W, JAROCKA-KARPOWICZ I, BIELAWSKA K, SKRZYDLEWSKA. 2015. “Sweet grass protection against oxidative stress formation in the rat brain. *Metabolic Brain Disease*, vol. 30, no. 1, pp. 183–190.

LUCZAK, S.E.; GLATT, S.J., WALL, T.L. 2006a. Meta-analyses of ALDH2 and ADH1B with alcohol dependence in Asians. *Psychological Bulletin* 132(4):607–621

LUO, J. 2015. Autophagy and ethanol neurotoxicity. *Autophagy*, vol. 10, no. 12, pp. 2099–2108.

MACHADO A & HAERTEL LM. 2013. Neuroanatomia Funcional. **Editora Atheneu**, 3ª ed., 360 p.

MADDOCK RJ, CASAZZA GA, FERNANDEZ DH, MADDOCK MI. 2016. Acute modulation of cortical glutamate and GABA content by physical activity. *The Journal of Neuroscience*, vol. 36, no. 8, pp. 2449–2457.

MAMELI M, BOTTA P, ZAMUDIO PA, ZUCCA S, VALENZUELA CF. 2008. Ethanol decreases Purkinje neuron excitability by increasing GABA release in rat cerebellar slices. *J Pharmacol Exp Ther*. Dec;327(3):910-7.

MARQUES A, PERALTA M, MARTINS J, GOUVEIA ER, VALEIRO MG. 2018. Cross-sectional and prospective relationship between low-to-moderate-intensity physical activity and chronic diseases in older adults from 13 European countries. *Journal of Aging and Physical Activity*, pp. 1–9.

MEDINA JF. 2011. The multiple roles of Purkinje cells in sensori-motor calibration: to predict, teach and command. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 21, no. 4, pp. 616–622.

MIRANDA GHN, GOMES BAQ, BITTENCOURT LO, ARAGÃO WAB, NOGUEIRA LS, DIONIZIO AS, BUZALAF MAR, MONTEIRO MC, LIMA RR. 2018. Chronic Exposure

to Sodium Fluoride Triggers Oxidative Biochemistry Misbalance in Mice: Effects on Peripheral Blood Circulation. *Oxid Med Cell Longev*, Aug 27;2018:8379123.

MOLTENI R, ZHENG JQ, YING Z, GOMEZ-PINILLA F and TWISS JL. 2004. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 22, pp. 8473–8478.

MUKHERJEE S. 2013. Alcoholism and its effects on the central nervous system. *Curr Neurovasc Res*; Aug;10(3):256-62.

MULLER TE, NUNES SZ, SILVEIRA A, LORO VL, ROSEMBERG DB. 2017. “Repeated ethanol exposure alters social behavior and oxidative stress parameters of zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 79, no. Part B, pp. 105–111.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, *The National Academies Press*, Washington, DC, 8th edition.

NEEPER SA, GÓAUCTEMEZ-PINILLA F, CHOI J, COTMAN C. 1995. Exercise and brain neurotrophins. *Nature*, vol. 373, no. 6510, p. 109.

OGONOVSKY H, BERKES I, KUMAGAI S, KANEKO T, TAHARA S, GOTO S, RADÁK Z. 2005. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochemistry International*, vol. 46, no. 8, pp. 635–640.

OGONOVSKY H, SASVÁRI M, DOSEK A, BERKES I, KANEKO T, TAHARA S, NAKAMOTO H, GOTO S, RADÁK Z. 2005. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. *Canadian Journal of Applied Physiology*, vol. 30, no. 2, pp. 186–195.

OLIVEIRA AC, PEREIRA MC, SANTANA LN, FERNANDES RM, TEIXEIRA FB, OLIVEIRA GB, FERNANDES LM, FONTES-JÚNIOR EA, PREDIGER RD, CRESPO-LÓPEZ ME, GOMES-LEAL W, LIMA RR, MAIA CS. 2015. Chronic ethanol exposure during adolescence through early adulthood in female rats induces emotional and memory deficits associated with morphological and molecular alterations in hippocampus. *Journal of Psychopharmacology*, vol. 29, no. 6, pp. 712–724.

OLIVEIRA AN, PINHEIRO AM, BELÉM-FILHO IJA, FERNANDES LMP, CARTÁGENES SC, RIBERA PC, FONTES-JÚNIOR EA, CRESPO-LOPEZ ME, MONTEIRO MC, LIMA MO, MAIA CSF. 2018. Unravelling motor behaviour hallmarks in intoxicated adolescents: methylmercury subtoxic-dose exposure and binge ethanol intake paradigm in rats,” *Environmental Science and Pollution Research International*, vol. 25, no. 22, pp. 21937–21948.

PAILLARD T, ROLLAND Y, DE SOUTO BARRETO P. 2015. Protective effects of physical exercise in Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease: a narrative review. *Journal of Clinical Neurology*, vol. 11, no. 3, pp. 212–219.

PASCUAL M, MONTESINOS J, MARCOS M, TORRES JL, COSTA-ALBA P, GARCÍA-GARCÍA F, LASO FJ, GUERRI C. 2017. Gender differences in the

inflammatory cytokine and chemokine profiles induced by binge ethanol drinking in adolescence,” *Addiction Biology*, vol. 22, no. 6, pp. 1829–1841.

PEERI M, AMIRI S. 2015. Protective effects of exercise in metabolic disorders are mediated by inhibition of mitochondrial-derived sterile inflammation. *Medical Hypotheses*, vol. 85, no. 6, pp. 707–709.

PERREY S. 2013. Promoting motor function by exercising the brain. *Brain Sciences*, vol. 3, no. 4, pp. 101–122.

PIN-BARRE C, J. LAURIN. 2015. Physical exercise as a diagnostic, rehabilitation, and preventive tool: influence on neuroplasticity and motor recovery after stroke. *Neural Plasticity*, vol. 2015, Article ID 608581, 12 pages.

RADÁK Z, KANEKO T, TAHARA S, NAKAMOTO H, PUCSOK J, SASVÁRI M, NYAKAS C, GOTO S. 2001. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemistry International*, vol. 38, no. 1, pp. 17–23.

RADAK Z, KUMAGAI S, TAYLOR AW, NAITO H, GOTO S. 2007. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, vol. 32, no. 5, pp. 942–946.

RADAK Z, TOLDY A, SZABO Z, SIAMILIS S, NYAKAS C, SILYE G, JAKUS J, GOTO S. 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochemistry International*, vol. 49, no. 4, pp. 387–392.

RAMMANI N. (2006). The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nature Reviews Neuroscience*, volume 7, pages 511–522.

RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, PANNALA A, YANG M, RICE-EVANS C. “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,” *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 26, no. 9-10, pp. 1231–1237, 1999.

REHM J, IMTIAZ S. 2016. A narrative review of alcohol consumption as a risk factor for global burden of disease. *Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy*, vol. 11, no. 1, p. 37.

ROOSTAEI T, NAZERI A, SAHRAIAN MA, MINAGAR A. 2014. The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurol Clin*. Nov;32(4):859-69.

ROSEMBERG DB, DA ROCHA RF, RICO EP, ZANOTTO-FILHO A, DIAS RD, BOGO MR, BONAN CD, MOREIRA JC, KLAMT F, SOUZA DO. 2010. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience*, vol. 171, no. 3, pp. 683–692.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. 2007. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺, *Embrapa Agroindústria Tropical*, Fortaleza.

RYBAK LP, SOMANI SM, RAVI R. 1995. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, vol. 50, no. 4, pp. 635–639.

SANTANA LNDS, BITTENCOURT LO, NASCIMENTO PC, FERNANDES RM, TEIXEIRA FB, FERNANDES LMP, FREITAS SILVA MC, NOGUEIRA LS, AMADO LL, CRESPO-LOPEZ ME, MAIA CDSF, LIMA RR. 2019. Low doses of methylmercury exposure during adulthood in rats display oxidative stress, neurodegeneration in the motor cortex and lead to impairment of motor skills,” *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 51, pp. 19–27.

SARAULLI D, COSTANZI M, MASTRORILLI V, FARIOLI-VECCHIOLI S. 2017. The long run: neuroprotective effects of physical exercise on adult neurogenesis from youth to old age. *Current Neuropharmacology*, vol. 15, no. 4, pp. 519–533.

SCHALCHER TR, BORGES RS, COLEMAN MD, BATISTA JÚNIOR J, SALGADO CG, VIEIRA JL, ROMÃO PR, OLIVEIRA FR, MONTEIRO MC. 2014. Clinical oxidative stress during leprosy multidrug therapy: impact of dapsone oxidation. *PLoS One*, vol. 9, no. 1, article e85712.

SCHUCKIT MA. 2009. Alcohol-use disorders. *The Lancet*, vol. 373, no. 9662, pp. 492–501.

SHICHIRI M. 2014. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 54, no. 3, pp. 151–160.

SUBRAMANIAN M, HOLT AG, MUELLER PJ. 2014. Physical activity correlates with glutamate receptor gene expression in spinally-projecting RVLM neurons: a laser capture microdissection study, *Brain Research*, vol. 1585, pp. 51–62.

TAPIA-ROJAS C, MIRA RG, TORRES AK, JARA C, PÉREZ MJ, VERGARA EH, CERPA W, QUINTANILLA RA. 2017. Alcohol consumption during adolescence: a link between mitochondrial damage and ethanol brain intoxication,” *Birth Defects Research*, vol. 109, no. 20, pp. 1623–1639.

TEIXEIRA FB, DE OLIVEIRA ACA, LEÃO LKR, FAGUNDES NCF, FERNANDES RM, FERNANDES LMP1, DA SILVA MCF, AMADO LL, SAGICA FES, DE OLIVEIRA EHC, CRESPO-LOPEZ ME, MAIA CSF, LIMA RR. 2018. Exposure to inorganic mercury causes oxidative stress, cell death, and functional deficits in the motor cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 11, no. 125.

TEIXEIRA FB, SANTANA LN, BEZERRA FR, DE CARVALHO S, FONTES-JÚNIOR EA, PREDIGER RD, CRESPO-LÓPEZ ME, MAIA CS, LIMA RR. 2014. Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress. *PLoS One*, vol. 9, no. 6, article e101074.

VALENZUELA CF, JOTTY K. 2015. “Mini-review: effects of ethanol on GABAA receptor-mediated neurotransmission in the cerebellar cortex--recent advances,” *Cerebellum*, vol. 14, no. 4, pp. 438–446.

- VALENZUELA CF, LINDQUIST B, ZAMUDIO-BULCOCK PA. 2010. A review of synaptic plasticity at Purkinje neurons with a focus on ethanol-induced cerebellar dysfunction. *International Review of Neurobiology*, vol. 91, pp. 339–372.
- VASILIOU V, ZIEGLER TL, BLUDEAU P, PETERSEN DR, GONZALEZ FJ, DEITRICH RA. 2006. CYP2E1 and catalase influence ethanol sensitivity in the central nervous system. *Pharmacogenet Genomics*; Jan;16(1):51-8.
- WALL TL, LUCZAK SE, HILLER-STURMHÖFEL S. 2016. Biology, Genetics, and Environment: Underlying Factors Influencing Alcohol Metabolism. *Alcohol Res*;38(1):59-68.
- WALSH RN, CUMMINS RA. 1976. The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, vol. 83, no. 3, pp. 482–504.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. 1989. The health of youth. WHO. Geneva, 1989 (document A42/Technical Discussions/2) n WHO Global Information System on Alcohol and Health (GISAH) [online database]. Global Health Observatory (GHO) data. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/gho/alcohol/en/>> acesso em 25/07/2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. 2014. Global Status Report on Alcohol and Health, World Health Organization, 2014.
- YANG F, LUO J. 2015. Endoplasmic reticulum stress and ethanol neurotoxicity. *Biomolecules*, vol. 5, no. 4, pp. 2538–2553.
- ZHANG GJ, WU MC, SHI JD, XU YH, CHU CP, CUI SB, QIU DL. 2017. Ethanol Modulates the Spontaneous Complex Spike Waveform of Cerebellar Purkinje Cells Recorded in vivo in Mice. *Front Cell Neurosci*; 28;11:43.
- ZIMATKIN SM1, PRONKO SP, VASILIOU V, GONZALEZ FJ, DEITRICH RA. 2006. Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcohol Clin Exp Res*; Sep;30(9):1500-5.
- ZOLADZ JA, MAJERCZAK J, ZELIGOWSKA E, MENCEL J, JASKOLSKI A, JASKOLSKA A, MARUSIAK J. 2014. Moderate-intensity interval training increases serum brain-derived neurotrophic factor level and decreases inflammation in Parkinson's disease patients. *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 65, no. 3, pp. 441–448.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética



PARECER 227-14

Projeto: Investigação dos efeitos do treinamento físico de moderada intensidade sobre os parâmetros motores e cognitivos de ratos expostos cronicamente ao etanol, de forma intensa e episódica (*binge*), da adolescência a fase adulta

Coordenador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

Área Temática: Neurociências

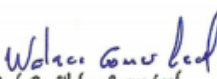
Vigência: 01/2014 a 12/2018

Nº no CEPAE-UFPA: 227-14

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 1032/2014 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, 01 de janeiro de 2014


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

Anexo B – Artigo Científico Fruto dos Experimentos da Tese de Doutorado

Hindawi
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2019, Article ID 6802424, 14 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/6802424>



Research Article

Physical Exercise Attenuates Oxidative Stress and Morphofunctional Cerebellar Damages Induced by the Ethanol Binge Drinking Paradigm from Adolescence to Adulthood in Rats

Kátia Lamarão-Vieira,¹ Dinair Pamplona-Santos,¹ Priscila C. Nascimento,¹
Márcio G. Corrêa,¹ Leonardo O. Bittencourt ,¹ Savio M. dos Santos ,²
Sabrina C. Cartágenes,³ Luanna Melo Pereira Fernandes,³ Marta C. Monteiro ,²
Cristiane S. F. Maia ,³ and Rafael R. Lima

¹Laboratory of Functional and Structural Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará (UFPA), Belém, PA, Brazil

²Laboratory of Clinical Immunology and Oxidative Stress, Pharmacy Faculty, Institute of Health Science, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil

³Laboratory of Inflammation and Behavior Pharmacology, Pharmacy Faculty, Institute of Health Science, Federal University of Pará (UFPA), Belém, PA, Brazil

Correspondence should be addressed to Rafael R. Lima; rafalima@ufpa.br

Received 27 August 2018; Accepted 6 November 2018; Published 18 February 2019

Academic Editor: Jeferson L. Franco

Copyright © 2019 Kátia Lamarão-Vieira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Ethanol (EtOH) binge drinking is characterized by high EtOH intake during few hours followed by withdrawal. Protection strategies against the damages generated by this binge are poorly explored. Thus, this study is aimed at investigating the protective role of treadmill physical exercise (PE) on the damage caused after repeated cycles of binge-like EtOH exposure in the oxidative biochemistry, morphology, and cerebellar function of rats from adolescence to adulthood. For this, animals were divided into four groups: control group (sedentary animals with doses of distilled water), exercised group (exercised animals with doses of distilled water), EtOH group (sedentary animals with doses of 3 g/kg/day of EtOH, 20% w/v), and exercised+EtOH group (exercised animals with previous mentioned doses of EtOH). The PE occurred on a running treadmill for 5 days a week for 4 weeks, and all doses of EtOH were administered through intragastric gavage in four repeated cycles of EtOH in a binge-like manner. After the EtOH protocol and PE, animals were submitted to open field and beam walking tests. In sequence, the cerebellums were collected for the biochemical and morphological analyses. Biochemical changes were analyzed by measurement of Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), reduced glutathione content measurements (GSH), and measurement of nitrite and lipid peroxidation (LPO). In morphological analyses, Purkinje cell density evaluation and immunohistochemistry evaluation were measured by antimyelin basic protein (MBP) and antisynaptophysin (SYP). The present findings demonstrate that the binge drinking protocol induced oxidative biochemistry imbalance, from the decrease of TEAC levels and higher LPO related to tissue damage and motor impairment. In addition, we have shown for the first time that treadmill physical exercise reduced tissue and functional alterations displayed by EtOH exposure.

1. Introduction

Ethanol (EtOH) is a global public health concern. Its abusive consumption involves about 3.3 million of deaths per year

(5.9% of all world deaths) and 5.1% of morbidity in the world [1]. From the pharmacological point of view, EtOH is a dose-dependent psychotropic drug that when consumed in large proportions increases the risk of morbidity and/or mortality [2, 3].

Anexo C – Capítulo de Livro Desenvolvido em Paralelo à Tese com Temática Associada



Addictive Substances and Neurological Disease

Alcohol, Tobacco, Caffeine, and Drugs of Abuse in Everyday Lifestyles

2017, Pages 75–82



Chapter 9 – Consumption of Ethanol and Tissue Changes in the Central Nervous System

L.O. Bittencourt, F.B. Teixeira, K.L. Vieira, D.P. Santos, C.S.F. Maia, R.R. Lima

[+](#) Show more

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805373-7.00009-8>

[Get rights and content](#)

Abstract

The central nervous system (CNS) is strongly affected by ethanol (EtOH) toxicity and there are many mechanisms involved in the damage process. Histological changes in nervous tissues are commonly observed in experimental models of EtOH exposure. Among these impairments are included neuron death and reduction of glial cell populations. In this chapter, we approach the mechanisms involved in tissue changes in CNS, exploring biochemical and cellular processes.

Keywords

Central nervous system; Cerebellum; Ethanol; Hippocampus; Histological changes; Motor cortex