



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

**INVESTIGAÇÃO DOS PREJUÍZOS MOTORES  
DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETANOL,  
EM RATAS INTOXICADAS DA ADOLESCÊNCIA À FASE  
ADULTA.**

**Fernando Bezerra Romualdo da Silva**

Belém-PA

2014

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

**INVESTIGAÇÃO DOS PREJUÍZOS MOTORES  
DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETANOL,  
EM RATAS INTOXICADAS DA ADOLESCÊNCIA À FASE  
ADULTA.**

Autor: Fernando Bezerra Romualdo da  
Silva

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém-PA

2014

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Bezerra Romualdo da Silva

**Investigação dos Prejuízos Motores decorrentes da Exposição Crônica ao Etanol, em ratas intoxicadas da Adolescência à fase Adulta.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia (UFPA)**

Banca examinadora:

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo (UFPA)**

---

**Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger (UFSC)**

Aprovado em:

## DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à pessoa mais especial da minha vida: minha mãe! Só eu sei o quanto é difícil não tê-la aqui, nos momentos em que mais precisei do seu acalento. Mas que ainda assim, chorou e suou comigo pra que, hoje e juntos, pudéssemos olhar pra trás e ver que tudo foi válido, que no fim das contas, todo esforço do mundo torna-se gratificante quando há amor. Te amo, Livia.

"Você não sabe o quanto caminhei, pra chegar até aqui...  
percorri milhas e milhas antes de dormir, eu nem  
cochilei..."

*Toni Garrido*

## RESUMO

### **INVESTIGAÇÃO DOS PREJUÍZOS MOTORES DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETANOL, EM RATAS INTOXICADAS DA ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA.**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o etanol é a droga psicotrópica mais utilizada em todo mundo, ocupando hoje um lugar de destaque por já ser considerado um problema de saúde pública em todo o mundo. Seu consumo pesado está em alta dentre adolescentes, a partir de 15 anos, e adultos jovens. Uma grande variedade de pesquisas relacionam seus efeitos nocivos a diversos órgãos e sistemas do organismo, bem como prejuízos e degeneração de estruturas do Sistema Nervoso central, sendo o cerebelo um de seus principais alvos, seja pela afinidade dessa substância por estruturas celulares seja pela capacidade de gerar uma cascata de processos deletérios. O objetivo deste estudo foi avaliar alterações comportamentais, associadas ao cerebelo, em ratas intoxicadas cronicamente por etanol da adolescência a fase adulta. Ratas com 35 dias de vida pós-natal receberam, durante 55 dias, etanol por meio de gavagem. Após esse período de intoxicação, os animais passaram por uma bateria de testes para avaliar déficits motores. Os testes comportamentais consistiram Open Field, Pole Test, Beam Walking e Rota-rod. Os resultados demonstraram que os animais expostos ao etanol apresentaram déficits motores em todos os testes comportamentais. Embora vários mecanismos estejam associados à degeneração cerebelar, estudos mais aprofundados devem ser realizados para investigar o verdadeiro efeito desta droga e sua correlação aos resultados obtidos nesta pesquisa.

Palavras-chave: etanol, cerebelo, testes comportamentais.

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF MOTOR LOSSES RESULTING FROM CHRONIC ETHANOL EXPOSURE IN RATS INTOXICATED FROM ADOLESCENCE TO ADULTHOOD.**

According to the World Health Organization, ethanol is the most widely used psychoactive drug in the world, occupying a prominent place by now be considered a public health problem worldwide. His heavy drinking among adolescents is on the rise, from 15 years and young adults A wide variety of research related to its damaging many organs and body systems effects, as well as damage and degeneration of the central nervous system structures, and the cerebellum one of its main targets is the affinity of the substance for cellular structures is the ability to generate a cascade of deleterious processes . The aim of this study was to evaluate behavioral changes associated with the cerebellum in rats chronically intoxicated with ethanol adolescence to adulthood. Female at 35 days of postnatal life received during 55 days, ethanol by gavage. After this period of intoxication, the animals underwent a battery of tests to assess motor deficits. Behavioral tests consisted Open Field, Pole Test, Walking Beam and Rotarod. The results showed that animals exposed to ethanol displayed motor deficits in all behavioral tests. Although several mechanisms are associated with cerebellar degeneration, further studies should be conducted to investigate the true effect of this drug and their correlation wiser the results obtained in this research.

Keywords: ethanol, cerebellum, behavioral tests.

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

<b>Figura 1</b>	Consumo Mundial <i>per capita</i> de EtOH puro em litros.....	13
<b>Figura 2</b>	Média das idades de iniciação do consumo de EtOH no Brasil.....	19
<b>Figura 3</b>	EtOH e Excitotoxicidade.....	24
<b>Figura 4</b>	Esquema dos grupos e intoxicação com EtOH.....	31
<b>Figura 5</b>	Figura do Campo Aberto.....	32
<b>Figura 6</b>	Figura esquemática da descida em viga vertical.....	33
<b>Figura 7</b>	Figura esquemática do equilíbrio em vigas graduadas.....	34
<b>Figura 8</b>	Figura do Rotarod.....	36
<b>Figura 9</b>	Efeitos do EtOH sobre a locomoção espontânea.....	38
<b>Figura 10</b>	Efeitos do EtOH sobre o número de levantamentos exploratórios.....	38
<b>Figura 11</b>	Efeitos do EtOH sobre o tempo de descida na viga vertical.....	39
<b>Figura 12</b>	Efeitos do EtOH sobre o tempo de escape e número de escorregadas em vigas quadradas e circulares (aclimatação).....	40
<b>Figura 13</b>	Efeitos do EtOH sobre o tempo de escape e número de escorregadas em vigas quadradas e circulares (28mm).....	41
<b>Figura 14</b>	Efeitos do EtOH sobre o tempo de escape e número de escorregadas em vigas quadradas (12 mm) e circulares (17mm).....	42
<b>Figura 15</b>	Efeitos do EtOH sobre o tempo de escape e número de escorregadas em vigas quadradas (5 mm) e circulares (11 mm).....	43
<b>Figura 16</b>	Efeitos do EtOH sobre Desempenho Total no Rotarod.....	44
<b>Tabela 1</b>	Prevalência de uso e dependência de EtOH no Brasil.....	18



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT3	Receptor de serotonina subtipo 3
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
BWT	" <i>Beam Walking Test</i> " (Teste sobre vigas graduadas)
BWT/C	" <i>Beam Walking Test</i> " com vigas de secção Circular
BWT/Q	" <i>Beam Walking Test</i> " com vigas de secção Quadrada
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CEBRID	Centro brasileiro de informação sobre drogas psicotrópicas
CID	Classificação Internacional das Doenças
CP	Células de Purkinje
DTR	Desempenho Total no Rotarod
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
e.p.m	Erro padrão da média
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EtOH	Etanol
GABA <sub>A</sub>	Ácido gama-aminobutírico A
Glu	Glutamato
GlyR	Receptor de glicina
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	Água destilada
iGluR	Receptor ionotrópicos de glutamato
K <sup>+</sup>	Íon potássio
LAFICO	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento
LNNE	Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
min	minuto
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
nnAChR	Receptor nicotínico neuronal de acetilcolina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico

OFT	Open Field Test (Teste da Locomoção Espontânea)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PT	<i>"Pole Test"</i> (Teste da descida em viga vertical)
s	segundo
SDA	Síndrome de Abstinência do Álcool
SNC	Sistema nervoso central
TGI	Trato Gastrintestinal

## SUMÁRIO

<b>I INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Álcool e Epidemiologia.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Álcool e Adolescência.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Mecanismos de Neurotoxicidade do EtOH.....</b>	<b>21</b>
1.3.1 CANAIS IÔNICOS.....	21
1.3.2 ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO.....	22
1.3.3 GLUTAMATO E NMDA.....	23
<b>1.4 EtOH e SNC.....</b>	<b>24</b>
<b>II OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>III METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Animais.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Intoxicação com EtOH.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Testes Comportamentais.....</b>	<b>31</b>
3.3.1 TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA.....	32
3.3.2 TESTE DA DESCIDA EM VIGA VERTICAL.....	33
3.3.3 TESTE DAS VIGAS GRADUADAS.....	34
3.3.4. TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA FORÇADA.....	35
<b>3.6 Análise Estatística.....</b>	<b>36</b>
<b>IV RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Teste da Atividade Locomotora Espontânea.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Teste da Descida em Viga Vertical.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Teste das Vigas Graduadas.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4. Teste da Atividade Locomotora Forçada.....</b>	<b>43</b>
<b>V DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>VI CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>VII REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
<b>VIII ANEXOS.....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ÁLCOOL E EPIDEMIOLOGIA

O álcool etílico (EtOH) é uma das mais antigas substâncias psicoativas utilizadas pela humanidade (SHER, 2006; ROOM; BARBO; REHM, 2005). Além de ter um histórico cultural, sendo aceito em quase todas as sociedades organizadas (HILL e CHOW, 2002, SHER, 2006; ELLIOT e BOWER, 2008; UHART e WAND, 2009), seu consumo é favorecido por ser uma droga lícita, de custo reduzido, amplamente disponível e de fácil acesso (JERNIGAN et al. 2002).

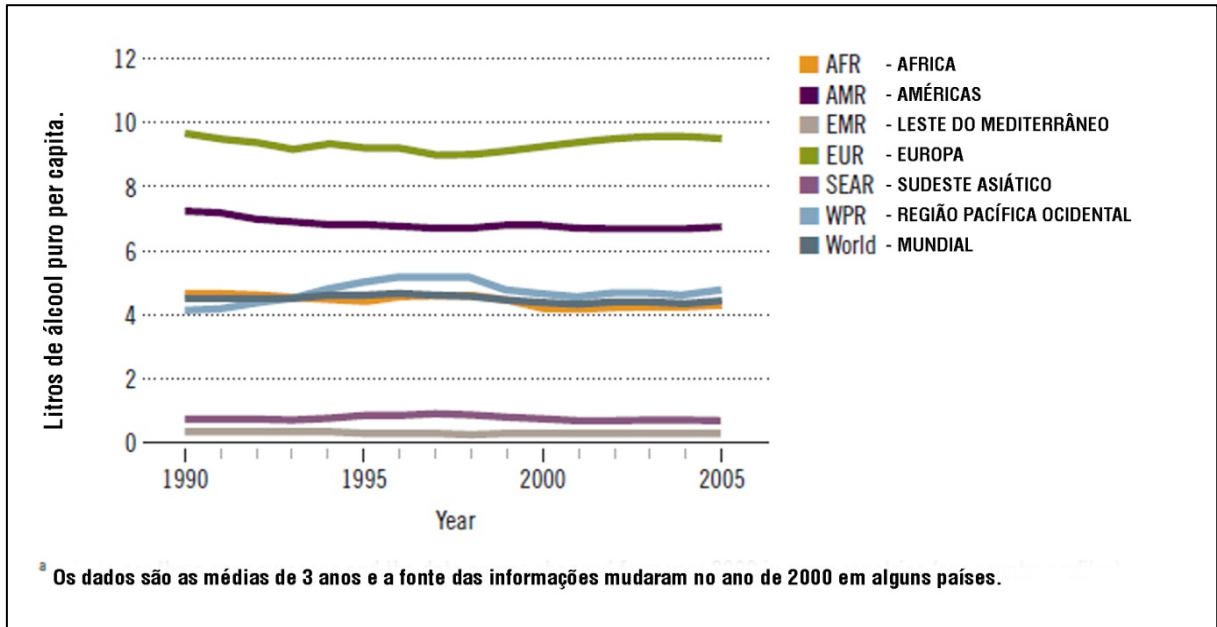
Aliado a estes fatores, o uso de álcool é incentivado pelo consumo em celebrações, situações sociais e de negócios, cerimônias religiosas e eventos culturais (MELONI e LARANJEIRA, 2004). Sua frequência é ainda mais favorecida, fundamentalmente, por seus efeitos positivos durante o consumo agudo (DAWSON, 2000; CYR e MCGARRY; 2002;). Desinibição, capacidade de aliviar tensão/estresse e ansiedade são fatores reforçadores para a continuidade da ingestão (KOOB e KREEK, 2007).

Porém, o consumo excessivo e constante do álcool é um problema de saúde e economia ao Estado. O abuso desta substância pode desencadear uma cascata de problemas agudos de saúde, tais como lesões, acidentes de carro, problemas sociais, incluindo a violência doméstica, carga econômica na sociedade, perda de produtividade no local de trabalho (MANZO-AVALOSS e SAAVEDRA-MOLINA, 2010), crimes e desordens públicas (REHM et al., 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2011, publicou um relatório sobre o consumo de álcool no mundo e apontou que o mesmo é um fator causal em 60 tipos de doenças e responsável por quase 4% de todas as mortes, maior do que as mortes causadas por HIV / AIDS, a violência ou a tuberculose.

Os elevados níveis de consumo no mundo são traduzidos a partir da média anual *per capita* de 4,3-4,7 litros de álcool puro ingerido por pessoas de 15 ou mais anos de idade (OMS, 2011). Nas Américas, a média tangencia 6,7 L, ficando atrás apenas da região europeia, com 9,5 L (Figura 1). No entanto, não se segue que alta renda e consumo sempre se traduzam em grandes transtornos relacionados ao

EtOH, contrário disso, quanto menores os níveis socioeconômicos, maior a incidência de doenças atribuíveis ao álcool (HERTTUA et al. 2008; MACKENBACH et al. 2008).



**Figura 1:** Registro do consumo de álcool puro, *per capita*, em adultos. 1990 – 2005.

Fonte: Adaptado da OMS, 2011.

Nos países ricos, a proporção relativamente pequena, apesar do alto nível de consumo de álcool, pode ser explicada pela baixa incidência de problemas associados aos padrões de consumo, estrutura etária e impacto de baixo risco de morte (OMS, 2011). Países não desenvolvidos ou em desenvolvimento e baixo status socioeconômico geralmente significam grandes problemas de saúde, como exemplo, Brasil e China (HARRISON e GARDINER, 1999; ANDRADE et al. 2002).

Nestas nações, as bebidas alcoólicas são um dos principais fatores de doença e mortalidade, com seu impacto deletério sendo considerado entre 8% e 14,9% do total de problemas de saúde dessas nações (MELONI E LARANJEIRA, 2004). No Brasil, o custo anual para o Sistema Único de Saúde é de 60 milhões de reais, decorrente ao consumo indevido de álcool, dispensados sob a forma de auxílio médico aos doentes e encargos financeiros e psicológicos às famílias (NASCIMENTO e JUSTO, 2000; REINHOLDZ; BENDTSEN; SPAK, 2011). Este

valor representa 84,5% contra 14,6% de gastos no consumo de outras drogas psicotrópicas (DATASUS, 2004).

Dentro deste contexto epidemiológico, o Brasil ocupa um lugar de importância, não apenas pelo impacto econômico que o alcoolismo gera, mas também pelo crescimento sistemático no consumo (GALDUROZ e CAETANO, 2004), alcançado a média de 6,16 L *per capita* em 2004 (OMS, 2011). Paralelamente, encontra-se altos níveis de prevalência de consumo e dependência do álcool: 74,6% consomem (uso da substância pelo menos uma vez durante a vida, para todas as faixas etárias, em 2005) (LARANJEIRA et al. 2007) e 12,3% dos consumidores podem ser considerados dependentes do EtOH (CARLINI et al. 2002).

Ao encontro da assertiva, em 2003 o Instituto Nacional do Câncer (INCA) pesquisou a taxa de prevalência do consumo excessivo do álcool, na população com 15 anos ou mais, no Distrito Federal e outras 17 capitais brasileiras, Belém ocupou o 9º lugar, dentre as cidades pesquisadas, com maior incidência, e 12ª em prevalência, com total de 31% (pelo menos uma dose nos últimos 30 dias).

Assim, dada as altas taxas de prevalência e incidência, relacionadas aos padrões de consumo de álcool, houve a reafirmação histórica do papel nocivo desta substância, surgindo uma gama extensa de respostas políticas para o enfrentamento dos problemas decorrentes de seu consumo, (OMS, 2011)

Os problemas de saúde, associados ao uso abusivo de EtOH, são amplamente estudados em todo mundo, e demonstram perturbações no trato gastrintestinal (FISHER *et al*, 2008) e órgãos associados, como fígado e pâncreas (KARINCH et al. 2008; YANG *et al*, 2008; MERCER, 2011). Efeitos difusos sobre o metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras (TING e LAUTT, 2006), aumento da liberação de corticosteróides (CHOUDHRY e CHAUDRY, 2006) e insuficiência de respostas imunológicas (HAPPEL *et al*, 2007). Porém seus efeitos mais pronunciados envolvem também o sistema nervoso central (SNC) (HARPER, 2009).

Diante da importância neuropatológica, artigos científicos descrevendo alterações estruturais do SNC causadas por intoxicação com álcool, na década 80, estabeleceram métodos analíticos para medição de volume e contagem de células (TERRY e DETERESA, 1982). Recentemente, com o avanço científico, por meio de

ressonância magnética (DE BRUIN et al. 2005), imunistoquímica (DUGLOS e PENTNEY, 2001), eletrofisiologia (UUSISAARI e KNÖPFEL, 2011), ensaios comportamentais pré-clínicos (MAIA et al. 2010), entre outras ferramentas, confirmam os efeitos deletérios da exposição a esta droga.

Os prejuízos associados ao SNC acontecem em qualquer faixa etária, no entanto tornam-se mais evidentes e devastadores quando o abuso no consumo do álcool se inicia na puberdade (CHAMBERS et al. 2003; DOREMUS et al. 2004). Estudos comprovam que, neste grupo, por apresentar um sistema nervoso em processo de maturação, há uma maior vulnerabilidade e suscetibilidade desta droga psicotrópica (CREWS, 2000; 2003; 2007), resultando em alterações no padrão de liberação neuroendócrina (MCCORMICK et al. 2008) a rearranjos moleculares (MANZO-AVALOSS e SAAVEDRA-MOLINA, 2010).

A confirmação do álcool como um grave problema de saúde é ainda mais acentuado no consumo abusivo precoce do álcool etílico, por elevar a gravidade e a incidência de morbidades na população jovem (OMS, 2011). Aliado a isso, o volume, frequência de consumo e condições preexistentes que vão desde psicopatologias e ambiente familiar a padrões genéticos tornam o adolescente mais propenso à ingestão de bebidas alcoólicas (BECKER; LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER, 2011).

Desta forma, políticas públicas de prevenção, educação e tratamento, baseadas na problemática do uso excessivo do álcool, não deve apenas atender uma minoria, dependentes de álcool (EDWARDS, 1997; CAETANO e CURANDI, 2002; JERNIGAN; MONTEIRO; ROOM; SAXENA, 2000), mas para toda população e, principalmente, aos jovens que relataram problemas relacionados ao EtOH (aproximadamente 40%) entre as idades de 15-19 anos, (CHAMBERS, TAYLOR e POTENZA, 2003).

## 1.2 ÁLCOOL E ADOLESCÊNCIA

A adolescência corresponde ao período compreendido entre a infância e a idade adulta, caracterizada por alterações morfofisiológicas, psicológicas e sociais (CASEY et al. 2008). Estas mudanças físicas compreendem um “surto de crescimento” desde aumento e mudança da massa corpórea à consolidação sexual;

as alterações psicológicas são marcadas pela intensidade afetiva, idealismo e o senso de invulnerabilidade; e o distanciamento (primazia das relações em grupo e entre pares) como comportamento social predominante (ERNST, 2006).

Neste período de mudanças nas relações sociais, mais tempo se gasta com os colegas do que com adultos (STEINBERG, 1989), uma rede de amizade entre os jovens é formada e o álcool desempenha um papel central para facilitar as relações sociais da adolescência, tanto através do consumo pessoal quanto em conjunto (SUMNALL et al. 2007; ZARZAR et al. 2012). Além disso, o aumento de escolhas perigosas pelos adolescentes, junto com a reatividade emocional e a sensibilidade exacerbada, influenciam no aumento da incidência e/ou desenvolvimento de distúrbios afetivos e dependência química, dentre eles o EtOH (PINE et al. 2001; SILVERI et al. 2004; REINHOLDZ et al. 2011).

A fim de conseguir efeitos que vão desde relaxamento à completa desinibição, inclusive a sexual (JOHNSON e STAHL, 2004; BELLIS et al. 2008), soma-se o comportamento impulsivo e arriscado (CASEY et al. 2005), estresse e ansiedade (SHER e ZALSMAN, 2005; DUMONT e OLSON, 2012), necessidade de aprovação (MATHIJSEN et al, 2012) e a elevada atividade do sistema de recompensa sobre o sistema de punição (ERNST, 2006), favorecendo ainda mais o consumo do álcool pelos jovens.

Estudos comprovam que, na realidade, adolescentes reconhecem esta substância desde a infância, onde as crianças são expostas a aprender sobre álcool por meio dos pais, família e comunidade em geral, reconhecendo bebidas alcoólicas e desenvolvendo uma atitude em relação a esta droga desde a pré-escola (NOLL et al. 1990; GILLIGAN e KYPRI, 2012).

Neste contexto, além das características inerentes ao adolescente e do reconhecimento prévio da droga, estudos constatam que fatores familiares incidem uma maior prevalência sobre o consumo excessivo do EtOH pelos jovens, dentre eles: pouca supervisão dos pais (LEDOUX et al. 2002), ausência de regras e padrões de comportamentos bem esclarecidos (GUO et al. 2001) e baixa qualidade de comunicação entre os membros da família (GUILAMO-RAMOS et al. 2005).



No entanto, uma vez ocorrido o contato inicial com a droga, a totalidade dos jovens não é receptiva aos sinais alcoólicos (LEON e McCAMBRIDGE, 2006), levando-os quase sempre ao consumo excessivo ou “beber pesado” (consumo de mais 14g de álcool puro em menos de 2 horas) e embriaguez, o que é um grave problema de saúde pública e um fator de preocupação para a sociedade (MATHURIN e DELTENRE, 2009).

A exposição excessiva ao EtOH tem impacto negativo mais acentuado no grupo de indivíduos jovens (ALFONSO-LOECHES e GUERRI, 2011). Dentre as consequências amplamente conhecidas do consumo excessivo de EtOH, destaque-se: danos não intencionais, acidentes de carro (MMWR, 2012; FELL et al. 2009), violência (REHM et al., 2009), suicídio (SHER e ZALSMAN, 2005), doenças sexualmente transmissíveis (FLORA e THORESEN, 1988; TAPERT et al. 2001; COOK et al. 2002) e gravidez indesejada (MATHURIN e DELTENRE, 2009).

Sendo esta droga uma grave ameaça médico-social, seu consumo precoce aumenta ainda mais os riscos de morbidade e gravidade de transtornos associados ao álcool (BEENSTOCK et al. 2010). Porém esta é uma situação ignorada pelos adolescentes, uma vez que o consumo excessivo, perigoso e prejudicial parece estar prevalente entre os mesmos (McALLISTER, 2003).

Em 2008, a OMS, por meio da *Global Survey on Alcohol and Health*, avaliou a tendência ao uso, em 73 países, de jovens com 5 anos abaixo da idade mínima permitida por lei para consumo do álcool, e constatou que 71% relataram aumento, 4% diminuição, 8% permaneceram estáveis e 16% com resultados inconclusivos no consumo desta EtOH.

Na América Latina e região do Caribe, o consumo desta droga é considerado o principal fator para aumento da mortalidade (OMS, 2011) e da diminuição do tempo de vida saudável perdidos por incapacitação, principalmente devido ao início precoce do consumo (GMEL et al. 2000). Dentre alguns países deste mesmo grupo, como Chile, Uruguai, Equador, Paraguai e Venezuela, o Brasil é o que apresenta maior consumo da droga (SILVA et al. 2011).

No primeiro levantamento domiciliar brasileiro sobre abuso de drogas, Galduróz et al. (2000) relataram que 6,6% eram dependentes de álcool, dois anos

depois a pesquisa foi refeita, com a mesma população novamente pesquisada, e contatou-se um aumento de aproximadamente 42%, num total de 9,4%. Ainda neste estudo, 48,3% dos jovens de 12 a 17 anos admitiram já ter consumido álcool.

Em uma pesquisa mais recente, 65,2% dos estudantes relataram uso na vida de álcool; 44,3% nos últimos 30 dias; 11,7% uso frequente (6 vezes ou mais no último mês) e 6,7% uso pesado (20 ou mais vezes nos últimos 30 dias) (CARLINI et al. 2005; VIEIRA et al. 2007). Constatou-se também que a maioria dos consumidores é do sexo masculino, no final da adolescência a adultos jovens, com taxas em torno de 78,6%. Todavia um fator de preocupação são adolescentes de 12 a 17 anos e níveis consideráveis de uso e dependência, com 54,3% e 7%, respectivamente (tabela 1) (CARLINI et al. 2005).

Faixa Etária (anos) / Gênero	Uso na vida (%)		Dependência (%)	
	2001	2005	2001	2005
12 - 17	48,3	54,3	5,2	7,0
Masculino	52,2	52,8	6,9	7,3
Feminino	44,7	50,8	3,5	6,0
18 - 24	73,2	78,6	15,5	19,2
Masculino	78,3	83,2	23,7	27,4
Feminino	68,2	72,6	7,4	12,1
25 - 34	76,5	79,5	13,5	14,7
Masculino	85,6	85,1	20,0	23,2
Feminino	67,6	73,0	7,1	7,7
<b>TOTAL</b>	66,0	70,8	11,4	13,6
Masculino	72,0	73,7	16,8	19,3
Feminino	60,1	65,4	6,0	8,6

**Tabela 1:** Prevalência de uso e dependência de álcool, por gênero e faixa etária, nos entrevistados do II Levantamento domiciliar do uso de drogas psicotrópicas no Brasil, 2005.

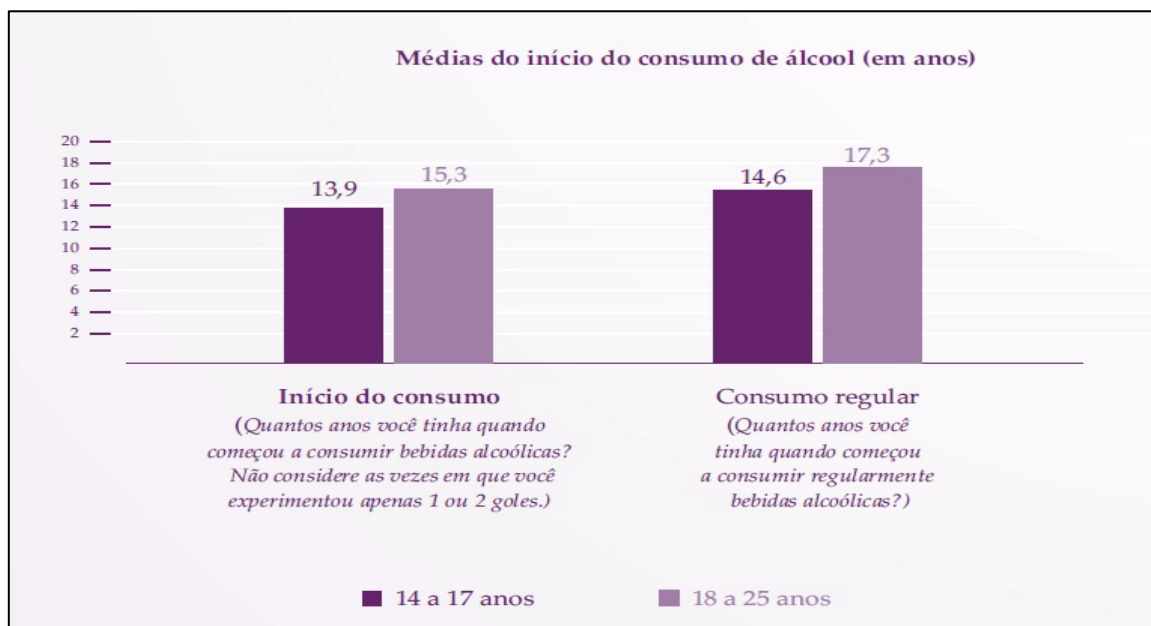
Fonte: Adaptado de Carlini e Galduróz, 2005.

O consumo em idade precoce não é preocupante apenas pelo fato de favorecer dependência alcoólica nesses jovens durante a fase adulta (KUNTSCHE et al. 2004), mas principalmente pelos agravos sociais como diminuição no desempenho escolar, reprovações, situações familiares e pessoais adversas (TAVARES et al. 2001; SILVEIRA et al. 2008)

Com o intuito de diminuir as complicações médico-sociais e todos os outros transtornos relacionados ao início precoce do consumo de álcool, vários estudos e

políticas de saúde são realizados para estabelecer leis de proibição ou aumento da dificuldade do acesso ao álcool por jovens (JERNIGAN et al. 2000; TAYLOR e CARROLL, 2001; MEASHAM e BRAIN, 2005). No Brasil, a Legislação vigente sobre o consumo de drogas psicotrópicas lícitas, tais como álcool e tabaco, determina que só a partir dos 18 anos (maioridade civil e penal) seu consumo seja permitido (CASTROAND et al. 2012), no entanto poucos são os empecilhos pra dificultar e/ou restringir a compra do EtOH (ROMANO et al. 2007).

Pesquisas para avaliar essa dificuldade de acesso ao álcool relatam que apenas 0,9% dos estudantes de escolas públicas, com idade inferior à permitida por lei, tiveram fracasso na compra de bebidas alcoólicas, segundo a Cartilha de Atenção Integral a Usuário de Álcool e Outras Drogas, publicada pelo Ministério da Saúde (MS), em 2004. Ao encontro dessa assertiva, estudos relatam que a idade média da iniciação do consumo é inferior à determinada pela lei em cerca de 3,5 anos (figura 2) (LARANJEIRA et al. 2007).



**Figura 2:** Média das idades, em anos, do início do consumo e uso regular de bebidas alcoólicas – 2004.

Fonte: Cartilha “I Levantamento Nacional sobre Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira” (GALDURÓZ et al. 2004).

Considerando o atual cenário epidemiológico nacional sobre a elevação das taxas do consumo de drogas, principalmente o álcool, associadas a crianças, adolescentes e jovens, o MS, através da Portaria Nº 1.190 de junho de 2009, instituiu o Plano Emergencial de Ampliação ao Acesso de Tratamento e Prevenção

em Álcool e outras Drogas (PEAD) no Sistema Único de Saúde (SUS) (Ministério da Saúde, 2004). Porém, ainda que no Brasil haja a tentativa de estabelecer Planos Políticos para contornar os problemas associados à ingestão de álcool por crianças e adolescentes, os níveis de consumo entre este grupo populacional continuam elevados e em crescimento (CASTROAND et al. 2012).

Em um estudo mais recente, Laranjeira (2013) afirma que as mulheres, principalmente as adolescentes, apresentam um padrão mais nocivo no consumo de álcool, devido às altas doses e frequência, podendo ser consideradas como um grupo de risco para esta droga. Não obstante, soma-se também a informação de que o consumo pesado de etanol na adolescência aumenta, subsequentemente, este padrão de ingestão na idade adulta, contribuindo para que o sexo feminino apresente maior consumo e suscetibilidade aos efeitos do etanol (STRONG et al. 2010).

Além disso, diferenças fisiológicas entre os gêneros reforçam a preocupação com as mulheres, seja pela menor quantidade da enzima álcool-desidrogenase e baixo volume de água no organismo, contribuindo para altas concentrações sanguíneas desta droga (OSHIMA et al. 2013; WOLLE et al. 2011); seja presença de hormônios femininos que, embora os estudos sejam pouco conclusivos, parecem acentuar o consumo de etanol na fase adulta, quando iniciado na adolescência (STRONG et al. 2010; MELÓN et al. 2013).

Por meio de vários estudos, pesquisadores entendem que o adolescente é um ser biopsicossocial em transformação, com alta suscetibilidade aos vícios e vulnerabilidade aumentada dos efeitos biológicos do álcool sobre o organismo em formação (STEINBERG, 2005; SHER, 2006; VIEIRA et al, 2007; CASTROAND et al. 2012 ), sendo, então, importante saber de que forma esta substância exerce seus efeitos deletérios, seja pra auxiliar o entendimento científico seja para orientar intervenções nos transtornos causados pelo etanol (ALLEN e BAYRAKTUTAN, 2008).

### 1.3 MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE DO EtOH

O EtOH é uma molécula fracamente carregada, movendo-se através das membranas com facilidade e atingindo equilíbrio de concentração sangue/tecidos de maneira rápida (SCHUKIT, 2004). Após administração oral, ele é prontamente absorvido pelo trato gastrointestinal (TGI) e 95-98% desta substância sofre metabolização pré-sistêmica ou de 1ª passagem (HOLFORD, 1987; NORBERG et al. 2010). Os efeitos observados nos vários órgãos e tecidos é causado pela concentração sanguínea do EtOH ao longo do tempo (MANZO-AVALOSS e SAAVEDRA-MOLINA, 2010).

Os sintomas característicos de intoxicação no SNC são decorrentes do consumo excessivo de álcool e, conseqüentemente, sua elevada concentração plasmática (GOHLKE et al. 2008). Estas alterações, por meio de mudanças comportamentais, coordenação motora insuficiente e danos às atividades cerebrais (ANDERSEN, 2004) estão associadas aos efeitos do álcool sobre a síntese (PIETRZYKOWSKI et al. 2008), liberação (ROBERTO et al. 2006) e sinalização (WILKIE et al. 2007) de neurotransmissores e seus receptores (VENGELIE, 2008).

Dentre os alvos farmacológicos do etanol, destacam-se: canais de  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  (MULHOLLAND, 2009; TREISTMAN e MARTIN, 2009), os receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glutamato (ADAMS, SHORT e LAWRENCE, 2010) e receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (LOVINGER, 1999),

#### 1.3.1. CANAIS IÔNICOS

Canais iônicos constituem um dos principais alvos do álcool, inibindo os canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L hidropiridina-sensíveis (VENGELIENE, 2008), comprovado pelo estudo de Wang et al (1994), em que esta interação álcool-canais de  $Ca^{2+}$  tipo-L é tão consistente quanto uma única molécula da droga agonista para este receptor. Outro importante canal são os de  $K^+$  retificadores internamente dirigidos e modificados pela proteína G, apresentando estruturas críticas para a ação do etanol (VENGELIENE, 2008; KOBAYASHI, 1999).

Ambos os tipos de canais representam uma família de receptores de neurotransmissores amplamente distribuídos no SNC, onde desempenham importante papel na transmissão sináptica e na regulação da excitabilidade neuronal, principalmente nos receptores do tipo GABA<sub>A</sub>, NMDA, glicina e 5-HT<sub>3</sub>. (WADLEIGH e VALENZUELA, 2011).

### 1.3.2 ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO (GABA)

O GABA é o mais importante neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos e representa um dos vários alvos de ação do etanol (BLOOM e IVERSEN, 1971; WEINER e VALENZUELA, 2006). Neurônios pré-sinápticos liberam este neurotransmissor que, por sua vez, liga-se ao GABA<sub>A</sub> (um dos receptores ionotrópicos pós-sinápticos), promovendo influxo de íons cloreto (KELM, CRISWELL e BREESE, 2010).

Alguns estudos tem considerado que, no consumo agudo, há aumento da atividade inibitória GABAérgica, uma vez que o álcool modula GABA<sub>A</sub> de maneira alostérica e facilita a liberação pré-sináptica do neurotransmissor (SIGGINS et al. 2005), promovendo efeitos comportamentais típicos do consumo da droga como sedação, hipnose e ataxia (MARTZ et al. 1983; KUMAR et al. 2009). Ao encontro desta afirmação, os efeitos da administração de etanol em ratos assemelham-se aos promovidos pelas drogas agonistas deste tipo de receptor (CAGETTI et al. 2003).

No consumo crônico, estudos relatam uma diminuição na densidade dos receptores GABA<sub>A</sub> cerebrais e uma regulação negativa (“*down-regulation*”) na expressão gênica de subunidade  $\alpha$  e  $\beta$ , em regiões específicas do SNC (GOLOVKO et al. 2002). As modificações estruturais causadas pela diminuição da expressão de mRNA codificador destas subunidades são uma das adaptações fisiológicas para tolerância à droga, garantindo um maior consumo de álcool (JUNE et al, 2007).

Por outro lado, os receptores metabotrópicos, GABA<sub>B</sub>, também apresentam um papel fundamental neste processo, embora não seja claramente entendido, estes parecem potencializar a capacidade de alterações alostéricas do etanol sobre GABA<sub>A</sub> e, conseqüentemente, seus potenciais inibitórios pós-sinápticos (WAN et al. 1995; WU et al. 2005). No entanto, vale ressaltar que não existe uma única via que,

por si só, justifique os efeitos das alterações sofridas no processo de sinalização sináptica deste neurotransmissor e seus receptores, eventos genéticos e não-genéticos também estão envolvidos (KUMAR, FLEMING e MORROW, 2004).

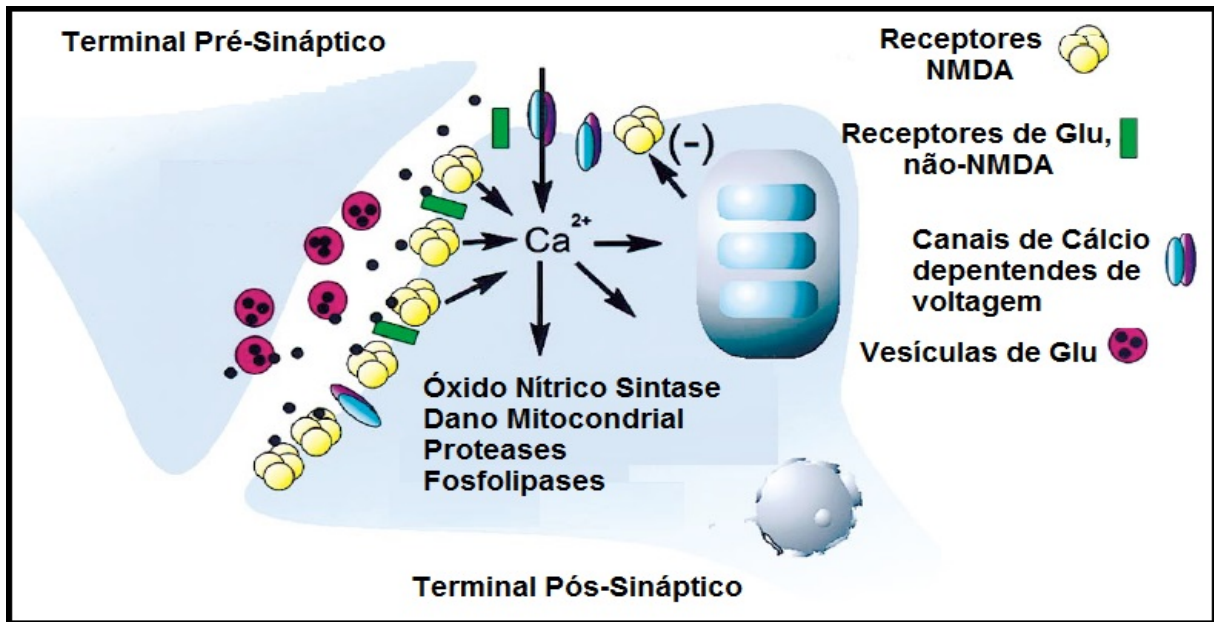
Todos esses receptores ionotrópicos de GABA fazem parte de uma super-família de canais iônicos dependentes de ligantes que inclui os receptores nicotínicos neuronais da Acetilcolina (nnAChR), serotoninérgicos do tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>) e glutamatérgicos, os quais também sofrem efeitos induzidos pelo EtOH (ORTELLS e LUNT, 1995).

### 1.3.3. GLUTAMATO e NMDA

O glutamato (Glu) é o principal neurotransmissor excitatório do SN, sendo suas respostas mediadas por 2 grandes grupos de receptores, os ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR), os quais geram potenciais pós-sinápticos, regulando uma ampla variedade de processos fisiológicos (CASILLAS-ESPINOSA, POWELL E O'BRIEN, 2012).

Dentro do grupo dos iGluRs, deve-se destacar o NMDA pela sua associação aos efeitos da intoxicação aguda e crônica do etanol, uma vez que dele resulta o processo de excitotoxicidade, como principal responsável pelas patologias do SNC e, principalmente, no cerebelo (HOFFMAN et al. 1995; SPANAGEL et al. 2002).

Na intoxicação crônica com EtOH, o processo excitotóxico ocorre a partir da exacerbação da via de sinalização excitatória comparada à via inibitória, ou seja, um excesso de ligação de Glu a receptores NMDA em detrimento à sinalização gabaérgica (VENGELINE et al. 2008). Essa superatividade de NMDA intensifica a abertura de canais de Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup> dependentes de ligante que alteram o potencial elétrico do neurônio e abrem também os canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem, promovendo intenso influxo desse íon para o citosol, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares, resultando em degeneração neuronal (figura 3) (NICOTERA E LEIST, 1998; JAATINEN E RINTALA, 2008). Este processo mediado por Glu tem íntima relação com danos mitocondriais e estresse oxidativo (NOVELLI et al. 1998).



**Figura 3: EtOH e Excitotoxicidade.** Modelo esquemático de estruturas ligadas ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , receptores NMDA, não-NMDA e canais de cálcio dependentes de ligante, bem como os efeitos associados a elevada concentração desse íon no citoplasma neuronal.  
Fonte: Adaptado de Nicotera e Leist, 1998.

A alta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol ultrapassa a capacidade de tamponamento pela mitocôndria, causando uma disfunção desta organela e uma superprodução de óxido nítrico sintase mitocondrial (mtNOS), bem como a ativação de NOS neuronal (nNOS) dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina, as quais gera quantidades tóxicas de óxido nítrico (BROOKES, 2004; MAIA et al. 2010; ZÁDORI et al. 2012;). Além disso, a elevada concentração do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina-dependente ativa processos biológicos como transcrição e ativação de enzimas proteolíticas e apoptose celular (RAJGOPAL, 2003).

Desta forma, a excitotoxicidade, pelo aumento da reatividade do NMDA ao Glu, gera uma cascata de eventos que vão desde danos mitocondriais à ativação de fosfolipases e proteases responsáveis pela neuropatologia associada ao EtOH, porém estes efeitos não são específicos a estrutura cerebelar, eles estendem-se à complexa circuitaria do SNC (ANKARCRONA et al. 1995; RAJGOPAL, 2003).

#### 1.4 ETANOL E SNC

Há algum tempo, estudos bem delineados correlacionam os efeitos deletérios da intoxicação crônica por etanol a problemas sistêmicos (GEORGE E FIGUEREDO,



2010; CEDERBAUM et al. 2009; SEITZ E BECKER, 2007), bem como danos ao SNC e intensificação de doenças (MARINHO et al. 2006; HARPER E MATSUMOTO, 2005; ZHONG et al. 2012) ou prejuízos em habilidades como cognição (OSCAR-BERMAN, 1993) e função motora (JONES, 1988; BASTIAN, 2011).

Dentre as estruturas relacionadas à função motora, destacam-se o córtex motor (CM) e cerebelo (GRAFTON E HAMILTON, 2007). O CM está relacionado à aprendizagem e modelagem motora, em que alguns neurônios, por meio de ramos corticais eferentes do centro motor, auxiliam também na força muscular e movimentos (EVARTS, 1968; FERZOU et al. 2007; SALINAS, 2009). Um estudo recente (BOURGUIGNON, 2013) elucidou que pequenas regiões do CM estão associadas à organização, de maneira hierárquica, dos movimentos dirigidos a alvos/tarefas. No entanto, pesquisas anteriores (PHILLIPS et al. 2009) relacionam essa hierarquização ao cerebelo, por meio do processamento temporizador dos movimentos, por meio de observação da ação, uma vez que neurônios de Purkinje projetam-se para o núcleo cerebelar profundo e, conseqüentemente, para áreas motoras, desempenhando papel fundamental no *loop* córtico-cerebelo-cortical para a orientação visual. (GALLESE, 1996; GLICKSTEIN, 2000). Assim, uma análise da complexa estrutura cerebelar se faz necessária para o entendimento do funcionamento e alterações provocadas pela intoxicação com etanol.

O cerebelo é uma pequena estrutura localizada na fossa craniana, representando cerca de 10% do volume cerebral, com uma ampla conexão de feixes de fibras nervosas, contendo aproximadamente 50% de todos os neurônios do encefálo (MARGOLIS et al. 2001), a qual comunica-se, através de fibras extrínsecas, com várias regiões do corpo, tais como: fusos musculares, labirinto e núcleos vestibulares (SARNA E HAWKES, 2003).

Assim sendo, danos ao cerebelo produzem erros no planejamento e na execução de movimentos em vez de paralisia ou movimentos involuntários (Fredericks, 1996). Uma grande variedade de pesquisas relata que disfunção cerebelar é associada com ataxia (incoordenação motora) (ZÁDORI et al. 2012; DIZON e KHODAKHAH, 2011), dismetria (uma tendência de movimentos para sob - ou além do alvo) (ZHR et al. 2010, PAINE et al. 2004) e disdiadococinesia

(problemas realizando movimentos rápidos e repetitivos) (PARKS et al, 2003; WEI et al. 2011; STOODLEY e SCHMAHMANN, 2010). Disfunção cerebelar também está associada a tremor intencional e hipotonia (LOUIS et al. 2011) e parece, também, interromper as quantidades relativas de aceleração e de duração, durante o movimento (HUBER et al. 2012).

Em uma divisão anatômica, ou parassagital, o cerebelo pode ser dividido em 3 zonas: vérmis (medial), paravermal (intermediária) e hemisférios cerebelares (lateral), e comunica-se com o encéfalo através de pares de feixes nervosos, os pedúnculos superior, médio e inferior (SCHMAHMAN et al. 1999). Todas as informações eferentes, a partir do córtex cerebelar, convergem para 3 pares de núcleos profundos do cerebelo: o denteado, o interpósito e fastigial, responsáveis, respectivamente, pelo planejamento do movimento, controle dos membros e equilíbrio motor (FITZPATRICK et al. 2008), onde este último núcleo projeta feixes para o núcleos vestibulares e reticulares (VOOGD e RUIGROK, 2004).

O cerebelo é ligado ao córtex cerebral, através de duas vias, a de recompensa e a por "*feedback*". Feixes aferentes do córtex cerebral terminam em pontos do núcleo da base, o que por sua vez transmitem fibras musgosas ao cerebelo. Projeções do tipo "*feedback*" percorrem o córtex cerebelar através núcleos profundos do cerebelo e terminam no núcleo contralateral do tálamo ventrolateral, que envia projeções volta para o córtex cerebral (FITZPATRICK et al. 2008).

Do ponto de vista histológico, o córtex cerebelar divide-se em 3 camadas distintas, da mais externa para mais interna: camada molecular, de células de Purkinje e granular. A primeira é composta basicamente por células estreladas e em cesto, bem como por fibras paralelas e dendritos de células de Purkinje (CP) (BOTTA et al. 2007); a camada de neurônios ou células de Purkinje, que constituem os maiores neurônios do SNC, ramificando-se através da camada molecular e chegando até a superfície do córtex, constituindo a única via eferente do córtex cerebelar, tornando-se o meio integrativo primário desta estrutura (VOOGD e GLICKSTEIN, 1988; O'HEARN e MOLIVER, 2001; VOOGD e RUIGROK, 2004) e a camada granular ou granulosa, com grande quantidade de células granulosas (excitatórias), que se ramificam e originam as fibras paralelas, as células de Golgi

(inibitórias) e as fibras musgosas (excitatórias) (FITZPATRICK et al. 2008; O'HEARN e MOLIVER, 2001;).

Baseado nisso, a plasticidade do córtex cerebelar deve-se, fundamentalmente, às sinapses das células granulares sobre as células de Purkinje. O sistema de células granulosas e musgosas condificam o contexto em que ocorrem os movimentos (a), as fibras trepadeiras sinalizam às células de Purkinje a necessidade de refinamento do movimento (b) e este potencial das fibras trepadeiras induz a plasticidade da sinapse entre células granulosas e de Purkinje – potencial de longa duração (c), melhorando o desempenho e aprendizado do movimento (MAUK 1997, SALIN et al. 1996; DE ZEEUW e YEO, 2005).

Devido a sua estrutura complexa e uma elevada quantidade de células ricas em canais de cálcio, principalmente as células de Purkinje (SASTRY et al. 1997; PENTNEY e DUGLOS, 2000; WEI et al. 2011), o cerebelo é o principal alvo da degeneração induzida por intoxicação por etanol, principalmente pelos efeitos secundários da excitotoxicidade (THAN e SZABO, 2002; HARVEY e STEPHENS, 2004)

No entanto, essa janela de vulnerabilidade torna-se ainda mais ampla no desenvolvimento embrio-fetal e períodos pós-natal, os quais geram efeitos mais acentuados no SCN e, principalmente, no cerebelo (HASEBE et al. 2008; GOUDARZI et al. 2008). Uma variedade substancial de características de modelos animais envolvidos nesses estudos, de suscetibilidade a drogas, faz com que se utilizem ratos e/ou camundongos para entender o processo de degeneração e atrofia cerebelar de organismos em desenvolvimento (CONRY, 1990; PIERCE et al. 1999; TARANUKHIN et al. 2010, HUANG et al. 2012).

Por meio de estudos comparando a cronologia do desenvolvimento neurocomportamental e neuroquímico entre humanos e modelos animais (MOORE et al. 2010, HUANG et al. 2012; HEATON et al. 2012), foi proposto que esta janela de suscetibilidade da adolescência, em ratos, esteja por volta do 27<sup>o</sup> dia pós-natal ao 42<sup>o</sup>, podendo expandir-se ao 60<sup>o</sup> no caso de estudos com tratamentos farmacológicos, a fim de englobar tanto as maturações precoces em fêmeas, quanto as tardias em machos (SPEAR, 2000; BAVA et al. 2010, DIZON e KHODAKHAH, 2011).

Desta forma, o presente estudo utilizou animais do gênero feminino, do 35º ao 90º dia pós-natal, para avaliar os efeitos da intoxicação crônica por etanol, da adolescência ao início da fase adulta, para avaliar danos correlacionados à estrutura cerebelar.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar os efeitos motores, associados ao cerebelo, em ratas intoxicadas cronicamente por etanol da adolescência à fase adulta.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar locomoção espontânea e forçada;
- Avaliar bradicinesia;
- Avaliar equilíbrio motor.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

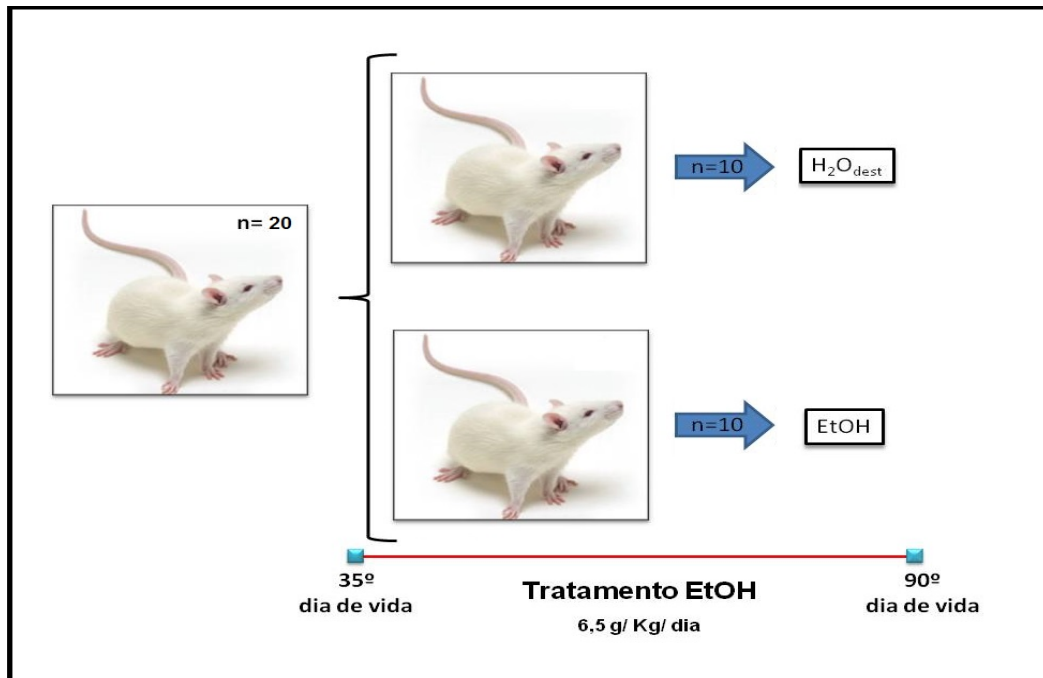
Para o presente estudo, foram utilizadas 20 ratas da linhagem *Wistar* com 35 dias de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram encaminhados à Faculdade de Farmácia/UFPA e mantidos em uma sala de manutenção em condições padronizadas de temperatura (25°C), exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum*.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisas envolvendo animais da UFPA, sob o parecer CEPAE-UFPA: BIO 043-12 (ver comprovante na página 72), e obedeceu aos critérios e as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (LAFICO), da Faculdade de Farmácia, do Instituto de Ciências da Saúde; e no Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE), do Instituto de Ciências Biológicas, ambos na UFPA.

#### 3.2. INTOXICAÇÃO COM EtOH

Foi administrado EtOH (22,5 p/v) 6,5g / kg / dia às ratas, por via oral (gavagem), através de cânula orogástrica (Insight, Brasil), do 35º ao 90º dia, o que corresponde ao final da adolescência e início da fase adulta neste modelo animal (SPEAR, 2000; 2004). Os grupos experimentais foram divididos de acordo com a substância administrada (figura 4), onde:



**Figura 4:** Divisão dos grupos experimentais de acordo com a substância utilizada no processo de gavagem, do 35º ao 90º dia de vida pós-natal.

- **GRUPO I** (Grupo Controle): fêmeas tratadas apenas com água destilada.
- **GRUPO II** (Grupo EtOH): fêmeas intoxicadas com etanol (ControlLab, Brasil).

A dose de EtOH foi baseada em estudos anteriores (MAIER e WEST, 2001; MAIA et al. 2009a, 2009b) e a pesagem dos animais foi realizada semanalmente para o reajuste de dose, com média de 220g de massa corpórea.

### 3.3. TESTES COMPORTAMENTAIS

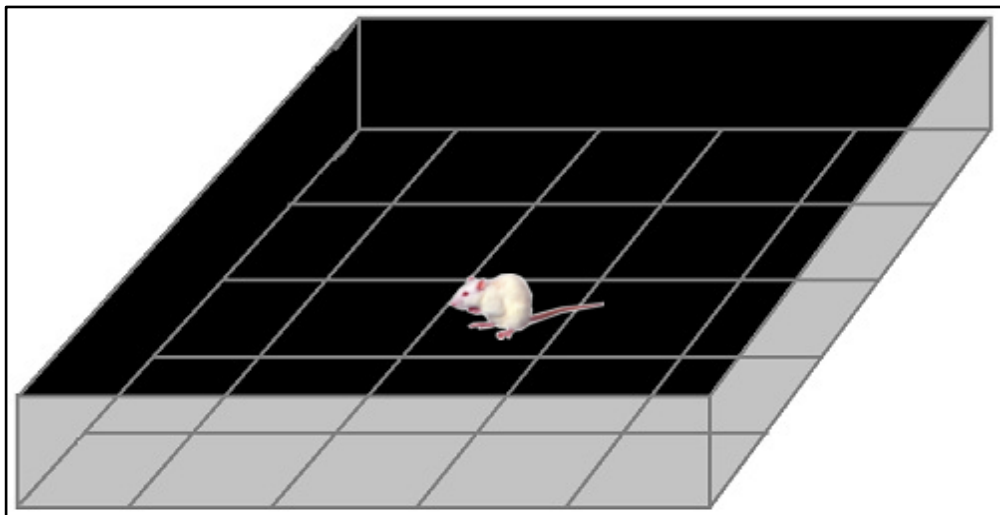
Vinte e quatro horas após o último dia de intoxicação (90º dia pós-natal), os animais foram encaminhados ao LAFICO para realização dos testes comportamentais. Ambos os grupos foram mantidos na sala de experimento por um período de 1 hora para aclimação e habituação, sendo a mesma iluminada com lâmpadas fluorescentes e controlada quanto à temperatura (25°C), odores e ruídos. Os testes foram realizados na ordem a seguir para evitar cansaço e estresse dos animais.

### 3.3.1. TESTE DA ATIVIDADE EM CAMPO ABERTO (*Open-Field Test*)

O teste do campo aberto foi desenvolvido para avaliar emocionalidade de animais (HALL, 1934), uma vez que um ambiente não habituado, com abertura superior e fechado lateralmente, induz ao animal o instinto exploratório, traduzido como locomoção, levantamento e farejamento, ou pode ser interpretado como aversivo, por meio de micções e defecações (NAHAS, 2001).

Atualmente é considerado como teste padrão pra uma grande variedade de estudos, principalmente àqueles relacionados aos efeitos de uma droga sobre a atividade locomotora de roedores (MENARD e TREIT, 1999; CHOLERIS et al. 2001).

O aparato consiste em uma arena de madeira (100 x 100 cm) dividida em 25 quadrantes (20 x 20 cm), com paredes de 40 cm de altura, pintado com material impermeabilizante, de cor escura, sem odores pós-secagem, como tinta ou esmalte (figura 5).



**Figura 5:** Figura do “*Open-Field Test*”.

Neste experimento, cada animal foi colocado individualmente no quadrante central da arena e foi-lhe permitido um tempo máximo de 300 segundos para locomover-se livremente e explorar o espaço. Para determinar a locomoção total, foi contabilizado o número de quadrantes cruzados, com as 4 patas, por cada animal. Não foram contabilizados quadrantes explorados com até 3 patas, com retorno ao quadrante original. Fez-se, também, a somatória o número de vezes em que o

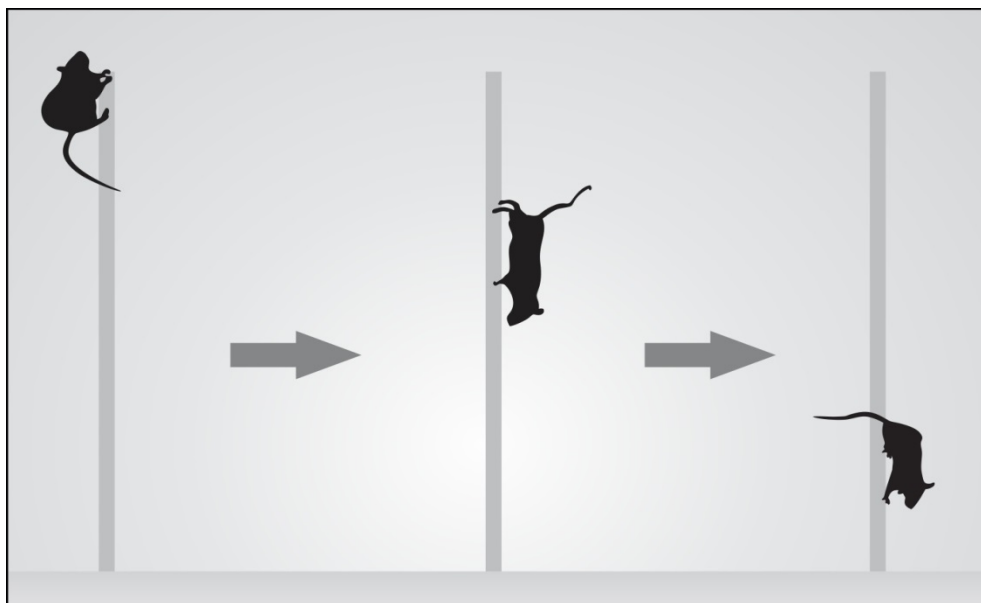


animal levantava-se, apoiado apenas pelas patas traseiras (“*rearing*”). Após este teste, os animais foram submetidos ao *Pole Test*.

### 3.3.2. TESTE DE DESCIDA EM VIGA VERTICAL (*Pole Test*)

O *Pole Test*, descrito inicialmente por Owaga et al. (1985), é um experimento utilizado para avaliar distúrbios de movimento, em especial a bradicinesia (MATSUURA et al. 1997; ANTZOULATOS et al. 2010).

De acordo com o protocolo adotado (ANTZOULATOS et al. 2010), este equipamento consiste em uma viga vertical áspera (2 x 50 cm) apoiada em uma plataforma circular (1 cm; r = 25 cm), onde animais são colocados no topo da viga, de cabeça para cima, e o objetivo era a virada de cabeça para baixo e descida até a plataforma (figura 6).



**Figura 6:** Figura esquemática da tarefa a ser realizada pelos grupos no *Pole Test*. A primeira haste ilustra como o animal era posicionado sobre o aparelho. Na segunda, observa-se a inversão do eixo e (a terceira) a descida até a plataforma do aparato.

O experimento foi realizado após aclimação inicial de 300 segundos e os escores anotados ao longo de 5 ensaios, limitados a 120 segundos cada, com intervalo de 60 s entre eles. O tempo em que os animais efetuaram corretamente a

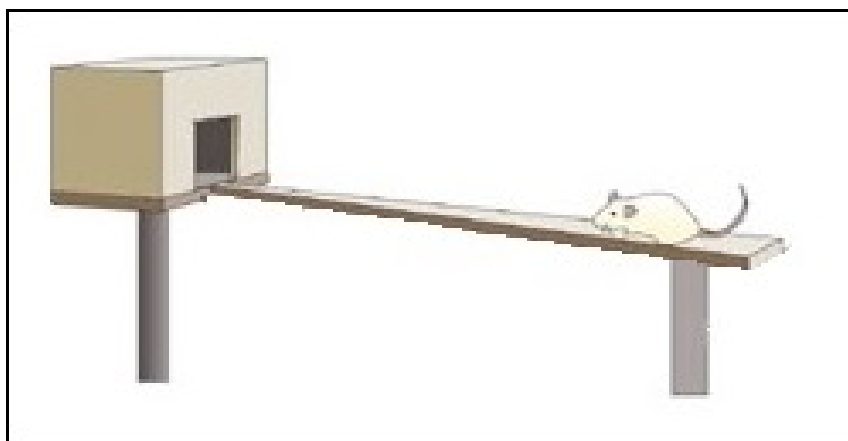
tarefa foi contabilizado. Aos animais que não conseguiram virar, ou seja, deslizaram pela viga na mesma posição em que foram colocados no equipamento; ou caíram, ainda que já tivessem virado de cabeça pra baixo, foi atribuído o tempo máximo (120 s). A média foi calculada com os 3 melhores tempos de cada animal.

Após esta avaliação, os animais seguiram para o *Beam Walking Test*.

### 3.3.3. TESTE DE EQUILIBRIO EM VIGAS GRADUADAS (*Beam Walking Test - BWT*)

O *BWT* foi desenvolvido, a princípio, para avaliar deficiências motoras em ratos e camundongos (GOLDSTEIN E DAVIS, 1990). Atualmente é utilizado para avaliar a coordenação motora e equilíbrio através da medição da capacidade dos animais em atravessar uma série graduada de vigas estreitas até alcançar uma plataforma segura (STANLEY et al, 2005; PERRY et al. 1995).

O aparato, construído em madeira, consistiu em 2 extremidades suspensas a 50 cm, distanciadas por 1 metro. Em uma extremidade fica o início, onde os animais foram colocados e na outra extremidade é uma plataforma segura, com caixa fechada (20 cm), para qual o animal poderia escapar (figura 7). As vigas de madeira (1 m) apresentavam 2 tipos de secção transversal: quadrada (28, 12 e 5 mm) e circular (28, 17 e 11 mm), e eram posicionadas entre as duas extremidades para que o animal transpassasse e cumprisse a tarefa (CARTER et al. 1999).



**Figura 7:** Figura esquemática da tarefa a ser realizada pelos grupos no *BWT*. Os animais eram colocados na extremidade de início e deveriam percorrer a viga para chegar à plataforma segura (caixa fechada).

Os animais foram colocados sobre a viga (extremidade de início) e tinham um tempo máximo de 60 segundos para atravessá-la e chegar à caixa, sendo 2 tentativas por viga, com intervalo de 60 s. Utilizou-se primeiro as quadradas e em seguida as circulares, sempre da maior para a menor secção. Para os animais que caíssem do equipamento, a contagem era interrompida e os mesmos eram recolocados no início da viga e continuava a contagem a partir do tempo marcado na queda, até que se completasse o tempo máximo de cada tentativa.

Neste experimento, foi contabilizada a latência de travessia de cada uma das vigas e o número de vezes em que pelo menos uma das patas traseiras escorregava. Escorregão das duas patas traseiras de uma só vez era contabilizado como 2 escorregadas.

Após o término deste teste, os animais foram submetidos ao *Rotarod*.

#### 3.3.4. TESTE DE LOMOCOÇÃO FORÇADA EM CILINDRO GIRATÓRIO (*Rotarod test*)

O *Rotarod* é um dos testes mais utilizados para avaliar a coordenação motora de membros anteriores e posteriores, e equilíbrio de roedores, sendo um dos mais sensíveis para isto (CARTER et al, 1999). Trata-se de um equipamento com protocolo de validação e manuseio simples, fornecendo resultados consistentes (MARTIN et al, 2003).

O aparelho automatizado (Insight, Brasil) consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8 cm de diâmetro instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm da base do equipamento, e que é mantido em rotação através de um motor. A caixa é dividida em 4 baias, de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo a análise de 4 animais simultaneamente (figura 8). Para o teste, cada animal era colocado sobre o cilindro giratório e media-se a latência de permanência do animal sobre o cilindro.



**Figura 8:** Figura do *Rotarod*.  
Fonte: Insight Brasil

Segundo adaptação do protocolo de Sharma et al. (2009), os animais foram colocados no aparelho, a uma velocidade constante de 16 rotações por minuto, durante 120 segundos. Os animais foram avaliados ao longo de 5 seções, com intervalo de 60s entre elas. O desempenho *Rotarod* (DTR) para cada grupo foi calculado em cima do traçado da média de latência em cada velocidade,

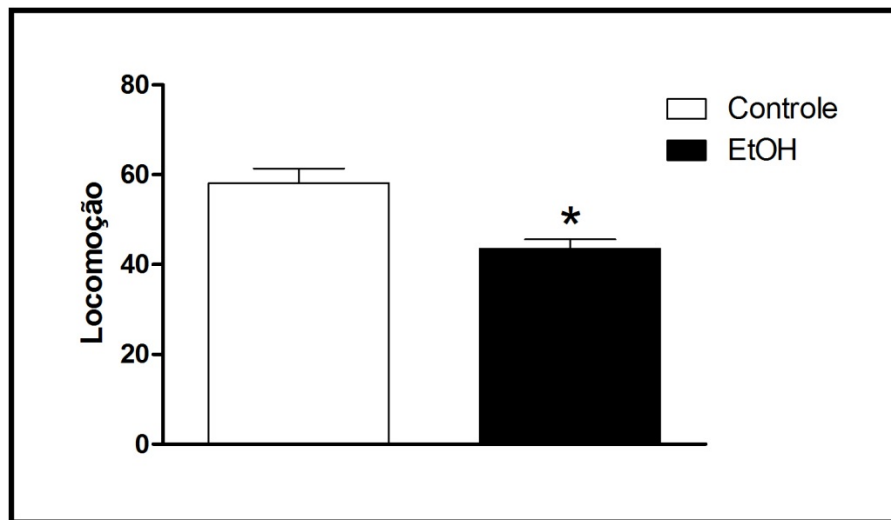
### 3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos dos testes comportamentais foram avaliados pelo teste estatístico *T Student* de dados não pareados. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) de 10 animais de cada grupo experimental. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de  $p < 0,05$ . A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0.

## 4. RESULTADOS

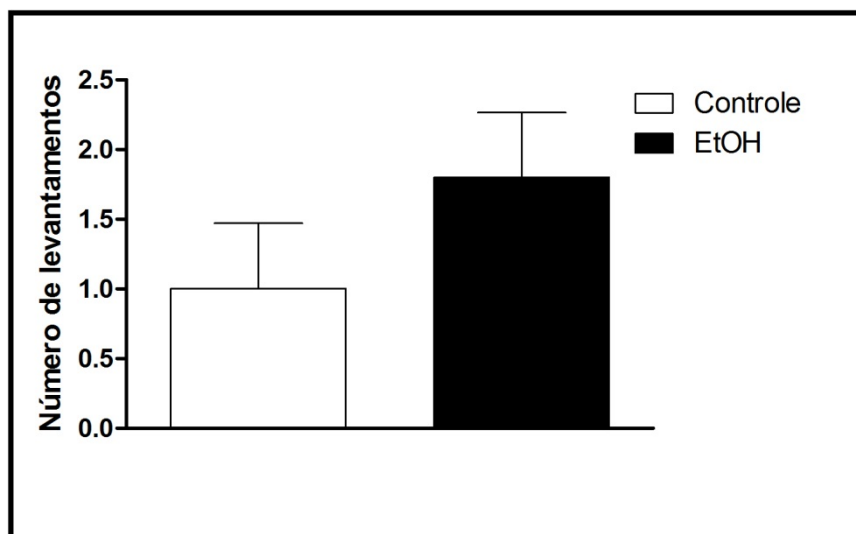
### 4.1. TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA

De acordo com o observado na figura 9, demonstrou-se diminuição da atividade locomotora pelo grupo EtOH em comparação ao seu controle ( $*p < 0,01$ ).



**Figura 9:** Efeito do EtOH na atividade locomotora de ratas intoxicadas, da adolescência à fase adulta. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do número total de quadrantes cruzados durante 300 segundos, com 10 animais por grupo.  $*p < 0,01$  diferença significativa em relação ao grupo controle. *T Student Test* de dados não pareados.

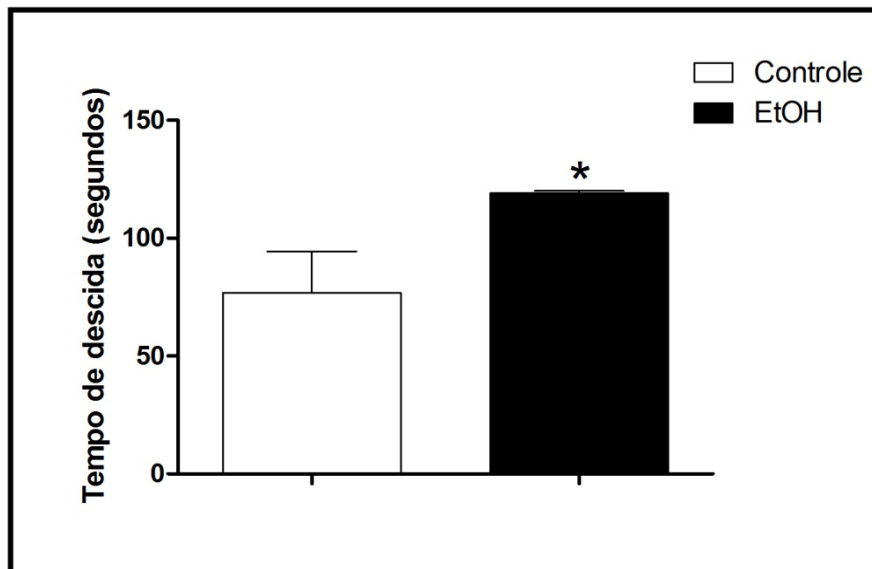
A figura 10 ilustra o número total de levantamentos exploratórios (“*rearings*”), demonstrando ausência de diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 10:** Efeito do EtOH no número de “*rearings*” de ratas intoxicadas, da adolescência à fase adulta. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do número de *rearings*, durante 300 segundos, com 10 animais por grupo.  $p > 0,5$  diferença significativa em relação ao grupo controle. *T Student Test* de dados não pareados.

#### 4.2. TESTE DE DESCIDA EM VIGA VERTICAL (*Pole Test*)

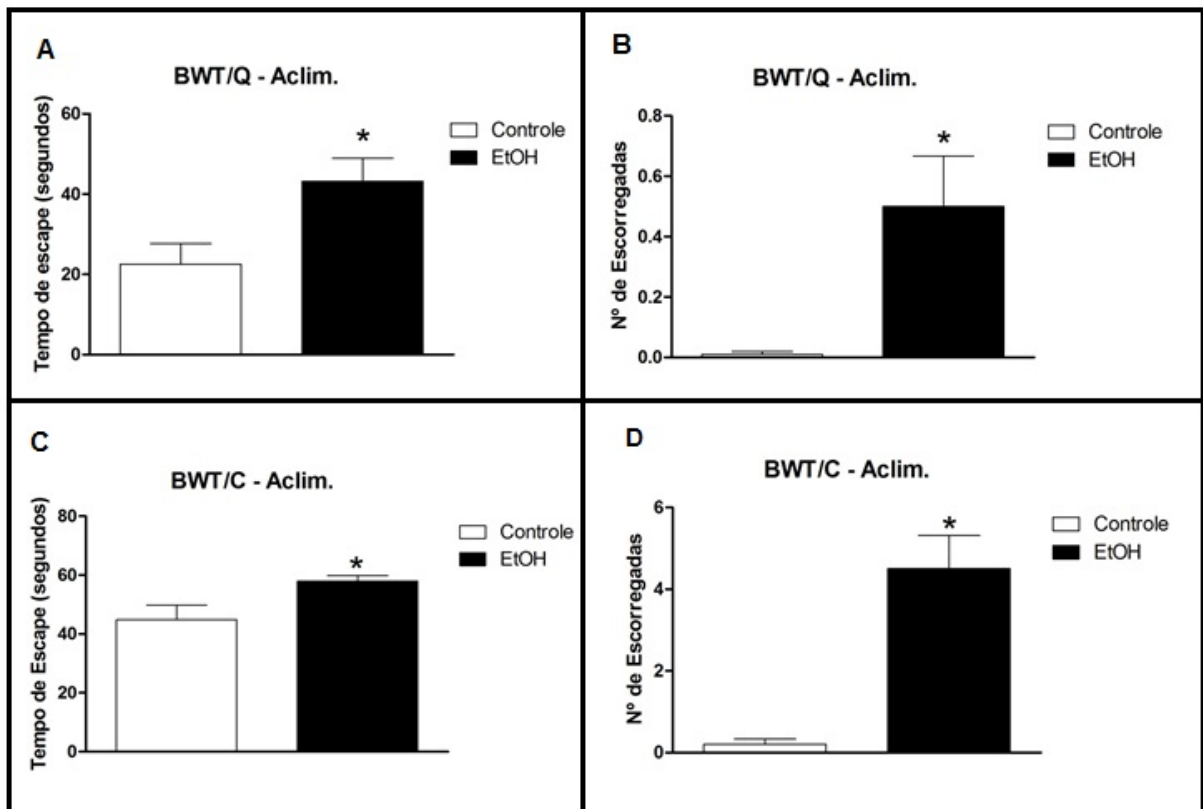
Para este teste, a figura 11 apresenta os resultados do tempo de descida, a qual representa um tempo maior para realização da prova pelo grupo Etanol, observando-se diferença estatística ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11:** Efeito do EtOH no tempo de descida do *Pole Test* de ratas intoxicadas, da adolescência à fase adulta. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do número de *rearings*, durante 300 segundos, com 10 animais por grupo.  $p < 0,05$  diferença significativa entre os grupos. *T Student Test* de dados não pareados.

#### 4.3. TESTE DE EQUILIBRIO EM VIGAS GRADUADAS

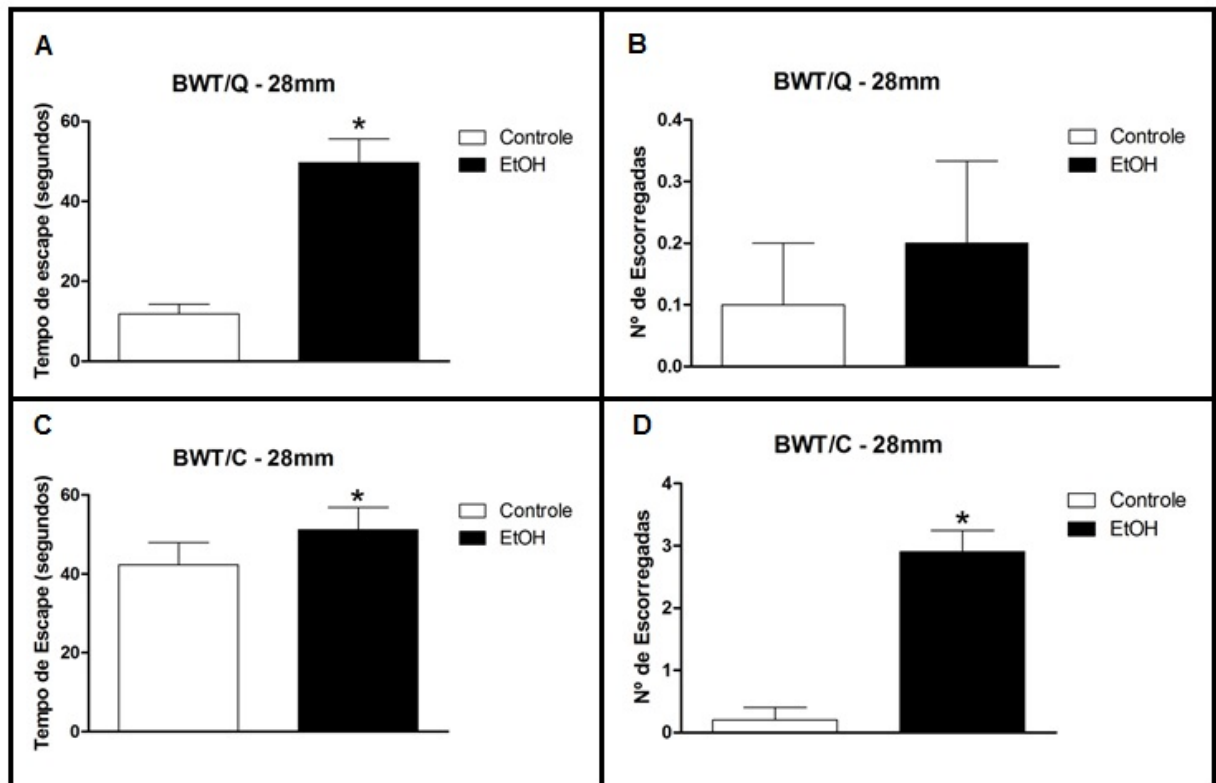
A figura 12, apresenta 2 parâmetros avaliados na aclimação em ambas as secções: quadrada (BWT/Q) para os painéis A e B; e circular (BWT/C) para C e D. No painel A observa-se o aumento do tempo de escape pelo grupo EtOH, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e o painel B demonstra o número de escorregadas superior do grupo EtOH em relação ao seu controle ( $p < 0,01$ ). Os painéis C e D, apresentam um tempo aumentado para escape e número superior de escorregadas, respectivamente, pelo grupo EtOH ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12:** Efeitos do EtOH sobre o tempo de escape e o número de escorregadas em ratos intoxicados, da adolescência à fase adulta, no período de aclimatação, em ambas as secções. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do tempo de escape (Painéis A e C) e o número de escorregadas (Painéis B e D), no *Beam Walking Test*, durante 120 segundos, com 10 animais por grupo. Houve diferença significativa para o tempo de escape ( $*p < 0,05$ ) e o número de escorregadas ( $*p < 0,01$ ), entre os grupos, para ambas as secções. *T Student Test* de dados não pareados.

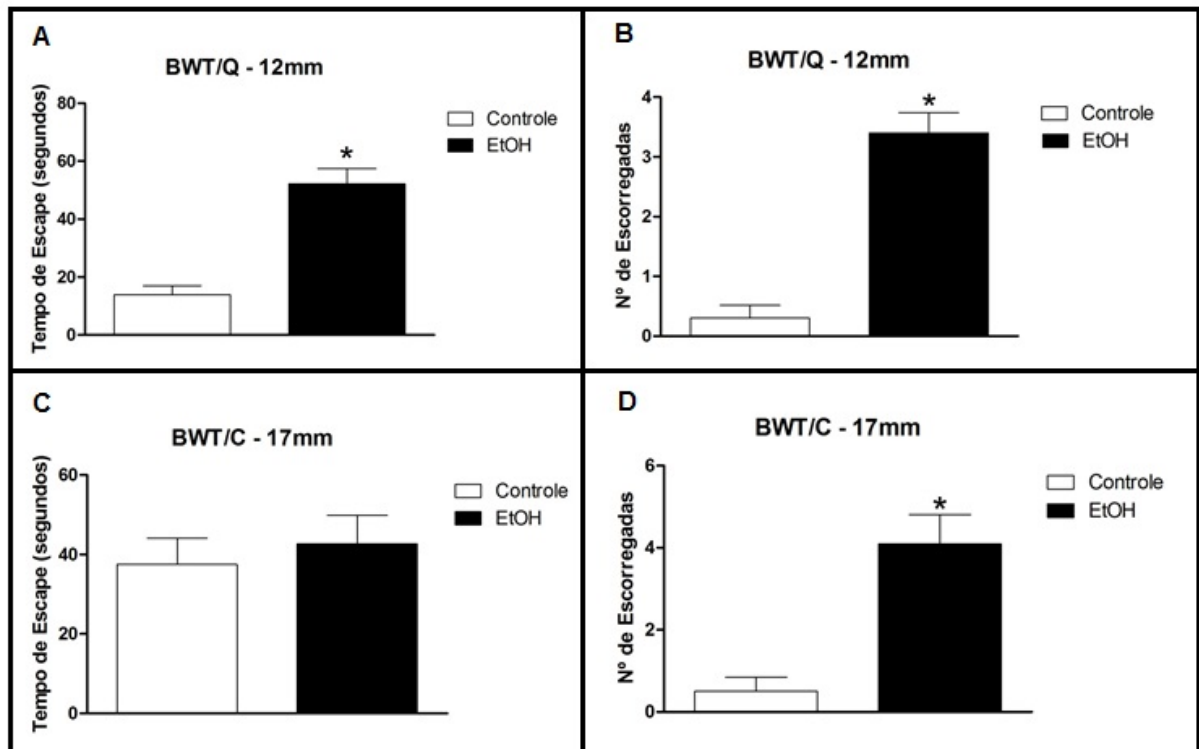
A figura 13 demonstra os resultados obtidos nas vigas mais largas (28 mm) nos dois tipos de secções. No painel A, nota-se o tempo aumentado para o escape no grupo EtOH, com diferença significativa ( $p < 0,001$ ), porém para os números de escorregadas (Painel B), não houve diferença significativa em relação ao seu controle ( $p > 0,05$ ), nas vigas quadradas. Para as vigas de secção circular, os dados expostos demonstram um aumento tanto do tempo de escape (Painel C) quanto o aumento do número de escorregadas (Painel D) pelo grupo EtOH, em relação ao seu controle; para ambos os resultados do BWT/C há diferença significativa ( $p < 0,001$ ).





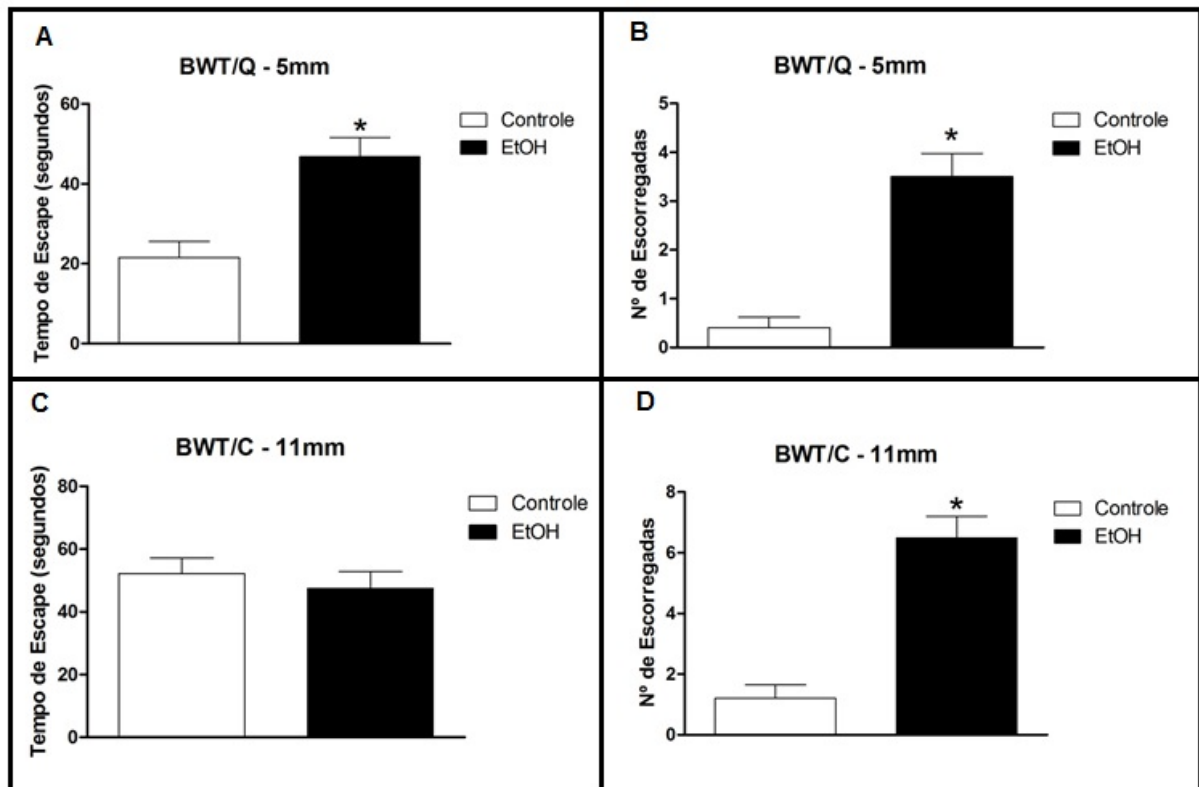
**Figura 13:** Efeitos do EtOH sobre o tempo de escape e o número de escorregadas em ratos intoxicados, da adolescência à fase adulta, sobre vigas de 28 mm. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do tempo de escape (Painéis A e C) e o número de escorregadas (Painéis B e D), no *Beam Walking Test*, durante 120 segundos. Para a secção quadrada, o tempo de escape foi significativamente maior pelo grupo EtOH (\* $p < 0,05$ ), porém não houve diferença significativa no número de escorregadas (\* $p > 0,05$ ). Para a secção circular, os 2 parâmetros avaliados foram maiores para o grupo EtOH, com diferença significativa ( $p < 0,001$ ) para ambos. *T Student Test* de dados não pareados.

A figura 14 demonstra os resultados obtidos nas vigas de espessura média: 11mm para a quadrada e 17mm para a circular. Para as quadradas, observa-se o tempo aumento para o escape no grupo EtOH (Painel A), bem como a quantidade aumentada do número de escorregadas (Painel B), para ambos ( $p < 0,001$ ). Na secção circular, houve ausência de diferença significativa no tempo de escape para os 2 grupos ( $p > 0,05$ ) (Painel C), entretanto o número de escorregadas foi significativo pelo grupo EtOH ( $p > 0,001$ ), como apresentado no painel D.



**Figura 14:** Efeitos do EtOH sobre o tempo de escape e o número de escorregadas em ratos intoxicados, da adolescência à fase adulta, sobre as vigas de espessura média. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do tempo de escape (Painel A e C) e o número de escorregadas (Painel B e D), no *Beam Walking Test*, durante 120 segundos, com 10 animais por grupo. Para o tempo de escape, houve diferença significativa na viga de secção quadrada pelo grupo EtOH ( $p < 0,001$ ) (Painel A), mas para a secção circular, no painel C, não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Para o número de escorregadas, para ambas as secções (Painel B e D), o grupo EtOH escorregou mais, com diferença significativa ( $p < 0,001$ ). *T Student Test* de dados não pareados.

Na figura 15, os dados expostos referem-se aos testes realizados nas vigas de fina espessura: 5 mm para a secção quadrada e 11mm para a secção circular. Na viga de 5 mm (BWT/Q), demonstra-se um aumento tanto do tempo de escape quanto o aumento do número de escorregadas pelo grupo EtOH, painéis A e B respectivamente, para ambos os resultados há diferença significativa ( $p < 0,001$ ). Para a viga de 11 mm (BWT/C), no painel C, há ausência de diferença significativa para o tempo de escape ( $p < 0,05$ ), porém, no painel D, verifica-se uma quantidade aumentada no número de escorregadas pelo grupo EtOH ( $p < 0,001$ ).



**Figura 15:** Efeitos do EtOH sobre o tempo de escape e o número de escorregadas em ratos intoxicados, da adolescência à fase adulta, sobre as vigas de menor espessura. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do tempo de escape (Painel A e C) e o número de escorregadas (Painel B e D), no *Beam Walking Test*, durante 120 segundos, com 10 animais por grupo. Para o tempo de escape, houve diferença significativa na viga de secção quadrada pelo grupo EtOH ( $p < 0,001$ ) (Painel A), mas para a secção circular, no painel C, não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Para o número de escorregadas, para ambas as secções (Painel B e D), o grupo EtOH escorregou mais, com diferença significativa ( $p < 0,001$ ). *T Student Test* de dados não pareados.

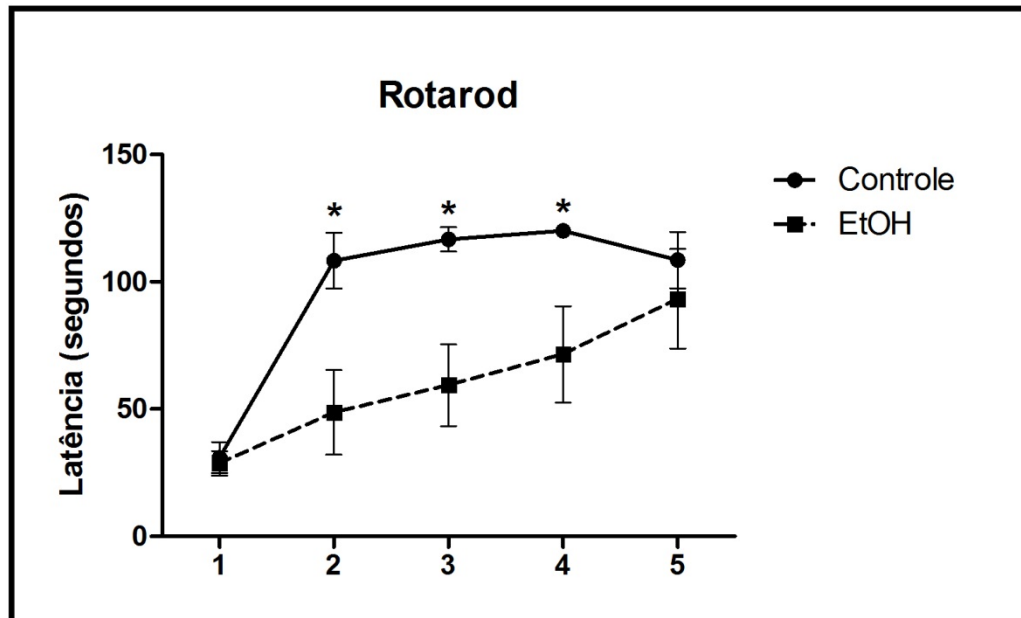
#### 4.4. TESTE DA LOCOMOÇÃO FORÇADA EM CILINDRO GIRATÓRIO (*Rotarod test*)

Para esse teste, os animais foram expostos 4 vezes ao cilindro giratório, com velocidade constante de 16 rpm em cada avaliação, com intervalo de 60 segundos entre elas.

O tempo de cada animal, nas 4 seções avaliadas, foi somado e encontrou-se uma média por grupo.

A figura 16 apresenta os resultados da latência dos animais sobre o aparato, onde o grupo EtOH permaneceu menos tempo no cilindro giratório, nas seções 2, 3

e 4 em comparação ao seu controle ( $p < 0.05$ ); enquanto que para as seções 1 e 5 não houve diferença entre os grupos.



**Figura 16:** Efeitos do EtOH sobre a latência em ratos intoxicados, da adolescência à fase adulta, no *Rotarod*. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do tempo de latência no *Rotarod Test*, em 5 seções, durante 120 segundos, a uma velocidade constante de 8rpm, com 10 animais por grupo. Há diferença estatística entre os grupos para as seções de número 2, 3 e 4 ( $p < 0,005$ ). *T Student Test* de dados não pareados.

## 5. DISCUSSÃO

Nesta investigação, os dados obtidos sugerem que o etanol produz efeitos deletérios nos padrões de coordenação motora, força muscular e equilíbrio, em ratas intoxicadas cronicamente com etanol, possivelmente via cerebelo, uma vez que os testes utilizados são sensíveis para avaliação dessa estrutura.

Para entender os resultados encontrados neste estudo, deve-se ressaltar que o cerebelo é vulnerável à exposição crônica ao etanol, sendo as células de Purkinje seu principal alvo (PIERCE, WILLIAMS e LIGHT, 1999;), por meio da cascata de excitotoxicidade do Glu/NMDA (LOVINGER, 1999; MARTY e SPIGELMAN, 2012).

Porém, outro alvo bem reconhecido são as fibras olivares trepadeiras (PIERCE, 2010). Estas se originam do complexo olivar inferior contralateral e, ao penetrarem o cerebelo, enviam ramos colaterais para os núcleos cerebelares, antes de chegarem ao córtex; por sua vez, os ramos terminais dividem-se e se enrolam em torno dos dendritos das células de Purkinje (SUGIHARA, 2005; 2006; UUSISAARI e KNÖPFEL, 2011).

Paralelo às fibras musgosas, as fibras trepadeiras e suas sinapses com as células de Purkinje constituem as únicas 2 vias aferentes do cerebelo, sendo estas últimas as mais intensas e extremamente importantes para o correto funcionamento da circuitaria cerebelar (STRATA e ROSSI, 1998; KOSHIMOTO et al, 2002; WATANABE, 2008).

Estudos comprovam que a exposição crônica ao etanol produz alterações no desenvolvimento de fibras olivares trepadeiras, levando a uma inervação deficiente das células de Purkinje, resultando em significativa ataxia, disdiadococinesia e incoordenação motora (ICHISE, 2000; WATANABE, 2008; PIERCE, 2011; ).

Dentro da análise comportamental, a redução da locomoção total dos animais intoxicados apresenta-se como um dos principais achados após o consumo crônico de etanol, uma vez que a exposição crônica a esta substância por si só produz prejuízo motor e degeneração cerebelar pela perda das células de Purkinje (DUCKETT E SCHOEDLER, 1991; SULLIVAN, 2003), intensificados pelo fato do cerebelo jovem ser mais suscetível aos efeitos negativos do etanol (CREWS et al. 2000; CLARK et al. 2008).

Em termos de desenvolvimento cerebelar, embora a morfologia celular e conectividade sináptica estejam maduras até o final da 4ª semana pós-natal (28º dia), certo refinamento da rede dendrítica das células de Purkinje pode acontecer até o final do 3º mês (90º dia) (McKAY e TURNER, 2005), tornando-se uma janela de vulnerabilidade celular para ação de drogas, como o etanol (IDRUS e NAPPER, 2012).

Além disso, morte das células de Purkinje, associada à exposição crônica do etanol, relaciona-se evidenciadamente à elevada produção e atividade de um fator apoptótico chave, a Caspase-3, no cerebelo de ratos (LI et al. 2002; LIGHT et al. 2002; RAJGOPAL et al. 2003) através de excitotoxicidade induzida por Glutamato/NMDA, e degeneração de células da camada granulosa (JAATINEN e RINTALA, 2008). Tais eventos promovem diminuição do volume da rede dendrítica das células de Purkinje na camada molecular (ANDERSEN, 2004), favorecendo distúrbios nas tarefas motoras, como a locomoção (THOMAS et al. 1998; MITRA e NAGARAJA, 2008).

Corroborando os resultados encontrados, um estudo recente realizado com camundongos, Bahi (2013) demonstra que animais com consumo pesado de álcool apresentam uma menor locomoção no *Open Field Test* (OFT) em comparação aos animais que não consumiram álcool ou que consumiram em baixa quantidade; em contrapartida, a menor locomoção implicou em níveis de ansiedade elevados, externalizados como comportamentos exploratórios.

Ainda de acordo com Bahi (2013), o alto nível ansiogênico dos animais intoxicados com etanol leva à exploração da arena do OFT. Porém na presente investigação, ainda que quantidade elevada de *rearings* (levantamentos exploratórios) por esse grupo seja não estatisticamente significativa, esse resultado não nos remete a ausência de danos no cerebelo, uma vez que o consumo crônico de etanol promove aumento da ansiedade e estresse no animal (STRINGARI et al. 2006; JAATINEN e RINTALA, 2008; MAIA et al. 2009; LEITE e NOBRE, 2012), levando-o às paredes do aparato e realizando a exploração apoiado sobre as mesmas, com as duas patas dianteiras (IVINKSKIS, 1976; JACKSON e NUTT, 1992; CHOLERIS et al. 2001; PANDOLFO et al. 2007) podendo mascarar sintomas de prejuízos no SNC.

Bradicinesia e diminuição do tônus muscular são também efeitos encontrados em processos degenerativos no SNC, evidenciadamente no cerebelo (FREDERICKS, 1996; PALLARES, 2001; PHILLIPS, OGEIL e MÜLLER, 2009). Para analisar estes critérios, o *Pole Test* (PT) avaliou a capacidade de o animal inverter seu eixo e descer até a plataforma. De acordo com o que foi observado, o grupo intoxicado apresentou tempo de descida elevado, em relação ao grupo controle, porém é válido salientar que este resultado deveu-se primordialmente ao fato de eles caírem da viga vertical, antes mesmo de iniciar a tarefa proposta pelo teste, dando-lhes o tempo máximo de 120 segundos.

Ao encontro dos resultados obtidos, estudos comprovam que a diminuída quantidade de dopamina, num período igual ou superior a 24 horas após o último consumo de determinada droga, promovem elevação do tempo de escape no PT (ANTZOULATOS et al. 2010). Não obstante, para entender o elevado número de quedas do grupo EtOH, outro estudo comprova que a intoxicação crônica por esta droga, leva à degeneração das células de Purkinje, resultando em diminuição do tônus muscular e tremor intencional (LORENZ e DELSCHL, 2007; LOUIS, FAUST E VONSATTEL, 2011).

Em períodos crônicos de intoxicação por etanol, há também uma supressão da atividade GABAérgica, pela diminuição na densidade dos receptores GABA<sub>A</sub> cerebrais, por uma regulação negativa na expressão gênica de subunidade  $\alpha$  e  $\beta$ , tornando os animais acentuadamente atáxicos (GOLOVKO et al. 2002; BOTTA et al. 2007(a); 2007(b)).

Esta assertiva, juntamente com estudos associados à ocupação de receptores GABA (VOSS et al. 2003;) que propõe que a baixa inatividade destes receptores promove deficiências motoras, (VOSS et al. 2003) corrobora os resultados encontrados no *BWT* desta investigação, uma vez que os animais intoxicados apresentaram um número acentuado de escorregadas em uma tarefa que necessitava de, além de equilíbrio, coordenação motora para percorrer as vigas de secções transversais mais estreitas.

Para avaliar características atáxicas e distônicas, o *BWT* é amplamente utilizado, conjuntamente com o *Rotarod*, para avaliar a coordenação e refinamento

motor, através da dificuldade do animal em transpassar as vigas de diferentes formas e de áreas de secção transversal (CARTER et al. 1999).

Ao encontro dessa assertiva, os animais do grupo EtOH escorregaram mais vezes nas vigas de espessura mais finas, com diferença significativa, independente do tipo de secção. No entanto, os animais do grupo controle, mesmo com seu número de escorregadas inferior, obtiveram um tempo aumentado nas vigas de secção circular, provavelmente devido à forma arredondada somada fina espessura, aumento da avaliação de risco por este grupo, traduzido pela exploração e cruzamento cauteloso da viga (GRAEFF et al. 1998).

Um estudo parecido, para validação do protocolo do *BWT* e análise de ataxia, confirma que quanto menor o número de receptores ocupados por GABA, maiores eram os números de escorregadas e o tempo utilizado pelo animal para percorrer a haste e alcança o objetivo do teste, tornando este teste mais sensível às alterações motoras em animais (STANLEY et al. 2005).

Além disso, recentemente Oleas *et al.*(2013) propõem protocolos de distonia em modelos animais. Segundo este estudo, animais com danos na estrutura cerebelar, seja em células de Purkinje seja na comunicação do cerebelo com outras regiões, apresentam aumento de prejuízos nas atividades motoras, como aumento do número de escorregadas e diminuição da latência pra queda no BWT e Rotarod, respectivamente (OLEAS et al. 2013)

Por outro lado, o *Rotarod*, também é um equipamento útil para avaliar distúrbios de marcha, bem como incoordenação motora e, em velocidades elevadas, avalia prejuízos disdiadococinéticos (ROZAS et al. 1997). E, ao encontro do que era esperado, haja vista todos os possíveis danos associados à estrutura cerebelar, os animais EtOH apresentaram uma menor latência sobre o equipamento, em todas as velocidades utilizadas.

Em 2007, Pascual *et al.*, propuseram que o consumo pesado de etanol na adolescência/periadolescência promove a formação de mediadores inflamatórios e apoptóticos, levando a alterações na função motora, como baixo desempenho no *Rotarod* e *Beam Walking*, testes comumente utilizados para avaliar a função do cerebelo, também em conformidade com Yamamoto *et al.* (2003)



Diversos estudos, com resultados semelhantes ao encontrado nesta pesquisa, para latência sobre o aparelho, associam esses danos a coordenação motora e equilíbrio, testados no *Rotarod*, a várias estruturas e alteração da circuitaria e comunicação cerebelar com outras áreas (ROZAS, 1997; STANLEY et al. 2005; BASTIAN, 2011; RAMEZANI, 2011; ROGERS et al. 2012).

Haja vista células do córtex cerebelar também são alvos do etanol e a sinalização eferente cerebelo é influenciada por potenciais excitatórios diretos de fibras musgosas e trepadeiras, bem como modulada pela entrada de inibição do córtex cerebelar, evidenciam-se danos às atividades cerebelares, como incoordenação motora e alterações no padrão de aprendizado motor (MAUK, 1997; MEDINA et al. 2000).

Em condições normais, a plasticidade sináptica associada ao aprendizado motor se dá de forma bidirecional nas sinapses das células de Purkinje e as granulares e trepadeiras; e controlada pelas concentrações de  $Ca^{2+}$  intracelular e sensibilidade ao Glu (ITO, 2006); sugerindo que após consumo crônico do etanol, há uma intensificação glutamatérgica nas CP, intensificação do influxo de  $Ca^{2+}$ , modificação da plasticidade sináptica e, conseqüentemente, diminuição do aprendizado motor (ITO, 2006, DE ZEEUW e YEO, 2005), como observado no *Rotarod* (RAMEZANI et al. 2011).

Contudo, embora todos os resultados encontrados estejam de acordo com outras pesquisas, é válido ressaltar que existe resposta diferenciada, para intoxicação crônica com EtOH, entre machos e fêmeas, principalmente no que diz respeito aos processos farmacocinéticos da droga e diferenças hormonais entre os gêneros (BARAONA, 2001; ANTZOULATOS, 2011).

Desta forma, as alterações motoras observadas no dimorfismo sexual estão associadas fundamentalmente à presença de estrogênio, uma vez que este hormônio apresenta ação neuroprotetora, relacionada a diminuição da peroxidação lipídica, induzida pelo EtOH, bem como efeitos deletérios do estresse oxidativo, protegendo neurônios, mitocôndrias e diversas vias de sinalização. (DLUZEN, 2000; TARANUKHIN et al. 2009; ANTZOULATOS, 2011).

Entretanto, o consumo pesado de etanol gera uma alteração do padrão de liberação dessa substância no organismo feminino, o que pode reforçar a ação do EtOH deletéria sobre os órgãos e sistemas, explicitadas como respostas com grande diferença entre as fêmeas intoxicadas e não intoxicadas (BARAONA et al. 2001; RAMEZANI et al. 2011).

## **5. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que todos os animais submetidos à intoxicação crônica por etanol apresentaram déficits motores nos testes comportamentais utilizados.

Todavia, o conjunto de resultados apresentados evidencia a necessidade de estudos complementares para avaliar possíveis patologias morfo-funcionais nas células cerebelares, uma vez que há uma grande diversidade de células e mecanismos associados à degeneração desta estrutura.

Desta forma, torna-se necessário o estudo bioquímico e imunoistoquímico do cerebelo para identificar ou esclarecer os resultados encontrados nesta investigação.

## 6. REFERÊNCIAS

ADAMS, C. L.; SHORT, J. L.; & LAWRENCE, A. J. **Cue-conditioned alcohol seeking in rats following abstinence: involvement of metabotropic glutamate 5 receptors.** *Brit J Pharmacol.* 159: 534 – 542, 2010.

ALLEN, C.L.; BAYRAKTUTAN, U. **Risk factors for ischaemic stroke.** *Int. J. Stroke.* 3(2): 105 – 16, 2008.

ALFONSO-LOECHES, S.; GUERRI, C. **Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain.** *Critical Rev. Clin. Lab. Sci.* 48(1): 19 – 47, 2011.

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

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S.N.P. **Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function.** *Neuron.* 15: 961 ±973.

ANTZOULATOS, E.; JAKOWEC, M.W.; PETZINGER, G.M.; WOOD, R.I. **Sex differences in motor behavior in the MPTP mouse model of Parkinson's disease.** *Pharma, Biochem and Behav.* 95(4): 466 – 472, 2010.

BAHI, A. **Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 105: 83-88. 2013

BALDAÇARA, L.; NERY-FERNANDES, F.; ROCHA, M.; QUARANTINI, L.C.; ROCHA, G.G.; GUIMARÃES, J.L.; ARAÚJO, C.; OLIVEIRA, I.; MIRANDA-SCIPPA, A.; JACKOWSKI, A. **Is cerebellar volume related to bipolar disorder?.** *Journal of Affective Disorders.* 135: 305 – 309, 2011.

BARAONA, E.; ABITTAN, C.S.; DOHMEN, K.; MORETTI, M.; POZZATO, G.; CHAYES, Z.W.; LIEBER, C.S. **Gender differences in pharmacokinetics of alcohol.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research,* 25(4), 502-507. 2001

BASTIAN, A.J. **Moving, sensing and learning with cerebellar damage.** *Curr Opin Neurobiol.* 21(4): 596-601. 2011

BAVA, S.; THAYER, R.; JACOBUS, J.; WARD, M.; JERNIGAN, T.L.; TAPERT, S.F. **Longitudinal characterization of white matter maturation during adolescence.** *Brain Res.* 1327: 38–46, 2010.

BECKER, H.C.; LOPEZ, M.F.; DOREMUS-FITZWATER, T.L. **Effects of stress on alcohol drinking: a review of animal studies.** *Psychopharmacology.* 218: 131 – 156, 2011.

BEENSTOCK, J.; ADAMS, J.; WHITE, M. **The association between time perspective and alcohol consumption in university students: cross sectional study.** European Journal of Public Health. 21(4): 438 – 443.

BELLIS, M.A.; HUGHES, K.; CALAFAT, A., JUAN, M.; RAMON, A.; RODRIGUEZ, J.A.; MENDES, F.; SCHNITZER, S.; PHILLIPS-HOWARD, P. **Sexual uses of alcohol and drugs and the associated health risks: A cross sectional study of young people in nine European cities.** BMC Public Health. 8: 155, 2008.

BLOOM, F. E.; & IVERSEN, L. L. **Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography.** Nature. 229: 628 – 630, 1971.

BOURGUIGNON, M.; DE TIÈGE, X.; DE BEECK, M.O.; BOGAERT, P.V.; GOLDMAN, S.; JOUSMÄKI, V.; HARI, R. **Primary motor cortex and cerebellum are coupled with the kinematics observed hand movement.** Neuroimage. 66: 500-507. 2013.

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

CAETANO, R.; CUNRADI, C. **Alcohol dependence: a public health perspective.** Addiction. 97: 633 – 645, 2002.

CAGETTI, E.; LIANG, J.; SPIGELMAN, I.; OLSEN, R.W. **Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABA<sub>A</sub> receptors.** Mol Pharmacol. 63: 53 -64; 2003.

CARLINI, E.A.; GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO A.R.; NAPPO, A.S. **I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil.** Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID). Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD); 2002.

CARLINI, E.A.; GALDUROZ, J.C.F. **II Levantamento domiciliar do uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país.** São Paulo: CEBRID/UNIFESP; 2005.

CARLINI, E.A. – **V Levantamento Nacional sobre consumo de drogas Psicotrópicas entre estudantes do Ensino Fundamental e Médio na Rede Pública de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras, 2004.** Centro Brasileiro sobre Informações de Drogas Psicotrópicas [http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/levantamento\\_brasil2/index.htm](http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/levantamento_brasil2/index.htm)

CARLINI-COTRIM, B. **Country profile on alcohol in Brazil.** World Health Organization .13 – 35, 1999.

CARLINI-MARLATT, B.; GAZAL-CARVALHO, C.; GOUVEIA, N.; SOUZA, M.F.M. **Drinking practices and other health-related behaviors among adolescents of Sao Paulo City, Brazil.** Subst Use Misuse. 38: 905 – 932, 2003.

CARRERAS, M.C.; FRANCO, M.C.; FINOCCHIETTO, P.V.; CONVERSO, D.P.; ANTICO, A.V.G.; HOLOD, S.; PERALTA, J.G.; PODEROSO, J.J. **FRONT BIOSCI. The biological significance of mtNOS modulation.** Jan 1; 12: 1041- 8, 2007.

CARTER, R.J.; LIONE, L.A.; HUMBY, T.; MANGIARINI, L.; MAHAL, A.; DUNNETT, S.B.; MORTON, A.J. **Characterization of Progressive Motor Deficits in Mice Transgenic for the Human Huntington's Disease Mutation.** Journal of Neuroscience. 19(8): 3248-3257. 1999

CASEY, B.J.; JONES, R.M, AND HARE, T.A. **Adolescent Brain.** Ann N Y Acad Sci. March, 1124: 111 – 126, 2008.

CASILLAS-ESPINOSA, P. M.; POWELL, K. L. AND O'BRIEN, T. J. **Regulators of synaptic transmission: Roles in the pathogenesis and treatment of epilepsy.** Epilepsia. 53: 41–58, 2012.

CASTROAND, D.S.; SANCHEZ, Z.M.; ZALESKI, M.; ALVES, H.N.P.; PINSKY, I.; CAETANO, R.; LARANJEIRA, R.R. **Sociodemographic characteristics associated with binge drinking among Brazilians.** Drug and Alcohol Dependence. ISSN. 0376 - 8716, 2012.

CEDERBAUM, A.I.; LU, Y.; WU, D. **Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury.** Arch. Toxicol. 83: 519 – 548, 2009.

CHAMBERS, R.A.; TAYLOR, J.R.; POTENZA, M.N. **Developmental Neurocircuitry of Motivation in Adolescence: A Critical Period of Addiction Vulnerability.** Am J Psychiatry. June, 160(6): 1041 – 1052, 2003.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. **A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 25(3): 235-260. 2001

CHOUDHRY, M.A.; LI, X.; CHAUDRY, I.H. **A role for corticosterone in impaired intestinal immunity and barrier function in a rodent model of acute alcohol intoxication and burn injury.** J. Neuroimmune Pharmacol. 1: 428 – 434, 2006.

CLARK, D.B.; THATCHER, D.L.; TAPERT, S.F. **Alcohol, psychological dysregulation, and adolescent brain development.** Alcohol Clin Exp Res. 32: 375 – 385, 2008.

CONRY, J. **Neuropsychological deficits in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects.** Alcohol Clin Exp Res. 14: 650–5, 1990.

COOK, R.L.; POLLOCK, N.K.; RAO, A.K.; CLARK, D.B. **Increased prevalence of Herpes Simplex Virus Type 2 among adolescent women with alcohol use disorders.** J. Adolesc Health. 30: 169 – 174, 2002.

COTTLER, L.B.; SCHUCKIT, M.A.; HELZER, J.E.; CROWLEY, T.; WOODY, G.; NATHAN, P.; HUGHES, J. **The DSM-IV field trial for substance use disorders: Major results.** Drug and Alcohol Dependence. 38: 59 - 69, 1995.

CRABBE, J.C.; METTEN, P.; YU, C.H.; SCHLUMBOHM, J.P.; CAMERON, A.J.; WAHLSTEN, D. **Genotypic differences in ethanol sensitivity in two tests of motor incoordination.** Journal of Applied Physiology, 95. pp. 1338–1351, 2003.

CREWS, F.; HE, J.; HODGE, C. **Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction.** Pharm Biochem Behav. 86: 189 – 199, 2007.

CREWS, F.T.; BECHARA, R.; BROWN, L.A.; GUIDOT, D.M.; MANDREKAR, P.; OAK, S.; QIN, L.; SZABO, G.; WHEELER, M.; ZOU, J. **Cytokines and alcohol Alcoholism.** Clinical and Experimental Research. 30: 720 – 730; 2006.

CREWS, F.T.; BRAUN, C.J.; HOPLIGHT, B.; SWITZER, R.C.; KNAPP, D.J. **Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats.** Alcohol Clin Exp Res. 24: 1712 –1723, 2000.

CREWS, F.T.; COLLINS, M.A.; DLUGOS, C.; LITTLETON, J.; WILKINS, L.; NEAFSEY, E. J.; PENTNEY, R.; SNELL, L. D.; TABAKOFF, B.; ZOU, J.; NORONHA, A. **Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why?** Alcohol Clin Exp Res. 28: 350 – 64, 2004.

CREWS, F.T.; NIXON, K. **Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism.** Alcohol and Alcoholism. 44: 115–127, 2009.

CYR, MG.; MCGARRY, K.A. **Alcohol use disorders in women, screening methods and approaches to treatment.** Postgrad Med J. 112: 31 – 2, 2002.

DAWSON, D.A. **Alcohol Consumption, Alcohol Dependence, and All-Cause Mortality.** Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 24: 72–81, 2000.

DE BRUIN, E.A.; HULSHOFF POL, H.E.; SCHNACK, H.G.; JANSSEN, J.; BIJL, S.; EVANS, A.C.; KENEMANS, J.L.; KAHN, R.S.; VERBATEN, M.N. **Focal brain matter differences associated with lifetime alcohol intake and visual attention in male but not in female non-alcohol-dependent drinkers.** Neuroimage. 26(2): 536–545. 2005.

DIZON, M.J.; KHODAKHAH, K. **The role of interneurons in shaping Purkinje Cells responses in the Cerebellar Cortex.** Journal of Neuroscience. 31(29): 10463-10473. 2010

DLUGOS, C.A.; PENTNEY R.J. **Quantitative immunocytochemistry of glia in the cerebellar cortex of old ethanol-fed rats.** Alcohol. 23: 63 – 69, 2001.

DLUZEN, D.E. **Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system.** Journal of Neurocytology. 29:387-399. 2000

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

DUCKETT, S.; SCHOEDLER, S. **Nutritional disorders and alcoholism.** In: **Duckett S, editor. The pathology of the aging human nervous system.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1991.

DUMONT, I.P.; OLSON, A.L. **Primary Care, Depression, and Anxiety: Exploring Somatic and Emotional Predictors of Mental Health Status in Adolescents.** *J Am Board Fam Med* May-June, vol. 25 no. 3: 291 – 299, 2012.

EDWARDS, G. **Alcohol policy and the public good.** *Addiction.* 92: S73–S79, 1997.

EDWARDS, G.; GROSS, M.M. **Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome.** *British Medical Journal.* 1: 1058 - 1061, 1976.

ELLIOTT, E.J.; BOWER, C. **Alcohol and pregnancy: the pivotal role of the obstetrician.** *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 48: 236 - 239; 2008.

EM, H.; CHOW K. **Life-history theory and risky drinking.** *Addiction,* 97: 401-413, 2002.

ERNST, M.; PINE, D.S.; HARDIN, M. **Triadic model of the neurobiology of motivated behavior in adolescence.** *Psychol Med.* 36(3): 299 – 312, 2006.

EVARTS, E. V. **Relation of pyramidal tract activity to force exerted during voluntary movement.** *J. Neurophysiol.* 31: 14–27, 1968.

EXNER, C.; WENIGER, G.; IRLE, E. **Cerebellar lesions in the PICA but not SCA territory impair cognition.** *Neurology.* 63: 2132–2135, 2004.

FEHR, C.; SANDER, T.; TADIC, A.; LENZEN, K.P.; ANGHELESCU, I.; KLAWE, C.; DAHMEN, N.; SCHMIDT, L.G.; SZEGEDI, A. **Confirmation of association of the GABRA2 gene with alcohol dependence by subtype-specific analysis.** *Psychiatr Genet.* 16: 9-17, 2006.

FEREZOU, I. ET AL. **Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice.** *Neuron* 56: 907–923, 2007.

FERIGOLO, M.; BARBOSA, F.S.; ARBO, E.; MALYSZ, A.S.; STEIN, A.T.; BARROS, H.M.T. **Drug prevalence at Febem, Porto Alegre.** *Rev. Bras. Psiquiatria.* 26(1): 9 - 15, 2004.

FELL, J.C.; TIPPETTS, A.S.; VOAS R.B. **53rd Annual Conference Annals of Advances in Automotive Medicine** (in press). 53: 63 - 76, 2009.

FISHER, S.J.; LEE, I.J.; SWAAN, P.W.; EDDINGTON, N.D. **Evaluation of the effect of ethanol's toxic metabolite acetaldehyde on the gastrointestinal oligopeptide**



**transporter, PEPT1: In vitro and in vivo studies.** Alcohol Clin. 32: 162 – 170, 2008.

FLORA, J.A.; THORESEN, C.E. **Reducing the risk of AIDS in adolescents** American Psychologist. 43(11): 965 – 970, 1988.

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

GALLESE, V.; FADIGA, L.; FOGASSI, L.; RIZZOLATTI, G. **Action recognition in the premotor cortex.** Brain, 119. 593–609, 1996.

GALDURÓZ, J.C.F.; CAETANO, R. **Epidemiologia do uso de álcool no Brasil.** Rev Bras Psiquiatr. 26(S1): 3 – 6, 2004.

GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; NAPPO, S.A.; CARLINI, E.A. **I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas. Parte A: estudo envolvendo as 24 maiores cidades do Estado de São Paulo – 1999.** Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina. P. 143, 2000.

GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO A.E.; FONSECA, A.M.; CARLINI, E.R. **V levantamento sobre consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras.** Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas. São Paulo, 2004.

GEORGE, A.; FIGUEREDO, V.M. **Alcohol and arrhythmias: A comprehensive review.** J. Cardio. Med. (Hagerstown). 11: 221 – 228, 2010.

GILLIGAN, C.; KYPRI, K. **Parent attitudes, family dynamics and adolescent drinking: qualitative study of the Australian parenting guidelines for adolescent alcohol use.** BMC Public Health. 12: 491, 2012.

GLICKSTEIN, M. **How are visual areas of the brain connected to motor areas for the sensory guidance of movement?** Trends Neurosci., 23, pp. 613–617, 2000.

GMEL, G.; REHM, J.; ROOM, R.; GREENFIELD, T.K. **Dimensions of alcohol-related social and health consequences in survey research** J Subst Abuse. 12: 113 – 138, 2008.

GOLDSTEIN, L.B.; DAVIS, J.N. **Beam-walking in rats: studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury.** J Neurosci Meth. 31: 101–107. 1990

GOLOVKO, A.I.; GOLOVKO, S.I.; LEONTIEVA, L.V.; ZEFIROV, S.Y. **The Influence of Ethanol on the Functional Status of GABA<sub>A</sub> Receptors.** Biochem. 67(7): 719-729. 2002

GUILAMO-RAMOS, V.; JACCARD, J.; TURRISI R.; PHD, JOHANSSON M. **Parental and school correlates of binge drinking among middle school students.** Am J Public Health. 95(5): 894 – 9, 2005.

GUO, J.; HAWKINS J.D.; HILL K.G.; ABBOTT R.D. **Childhood and adolescent predictors of alcohol abuse and dependence in young adulthood.** J Stud Alcohol. 62(6): 754 – 62, 2001.

GOHLKE, J.M.; GRIFFITH, W.C.; FAUSTMAN, E.M. **Computational models of ethanol-induced neurodevelopmental toxicity across species: Implications for risk assessment.** Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol. 83: 1 – 11, 2008.

GRAEFF, F.G.; NETO, C.F.; ZANGROSSI, Jr. H. **The elevated T-maze as an experimental model of anxiety.** Neurosci Biobeh Rev. 23: 237-246. 1998

GRAFTON, S.T.; Hamilton, A.F. **Evidence for a distributed hierarchy of action representation in the brain.** Hum. Mov. Sci. 26: 590–61, 2007.

HAPPEL, K.I.; RUDNER, X.; QUINTON, L.J.; MOVASSHAGHI, J.L.; CLARK, C.; ODDEN, A.R.; ZHANG, P.; BAGBY, G.J.; NELSON, S.; SHELLITO, J.E. **Acute alcohol intoxication suppresses the pulmonary ELR-negative CXC chemokine response to lipopolysaccharide.** Alcohol. 41: 325 – 333, 2007.

HARPER, C. **The Neuropathology of Alcohol-Related Brain Damage.** Alcohol & Alcoholism. 44(2): 136 – 140, 2009.

HARVEY, V.L.; STEPHEN S, G.J. **Mechanism of GABA<sub>B</sub> receptor-mediated inhibition of spontaneous GABA release onto cerebellar Purkinje cells.** European Journal of Neuroscience. 20: 684-700. 2004.

HASEBE, M.; MATSUMOTO, I.; IMAGAWA, T.; UEHARA, M. **Effects of an anti-thyroid drug, methimazole, administration to rat dams on the cerebellar cortex development in their pups.** Int J Dev Neurosci. 26: 409–14, 2008.

HEATON, M.B.; PAIVA, M.; KUBOVIC, S.; KOTLER, A.; ROGOZINSKI, J.; SWANSON, E.; MADORSKY, V.; POSADOS, M. **Differential effects of ethanol on c-jun N-terminal kinase, 14-3-3 proteins, and Bax in postnatal day 4 and postnatal day 7 rat cerebellum.** Brain Research. 1432: 15-27. 2012.

HERTTUA, K.; MÄKELÄ, P.; MARTIKAINEN, P. **Changes in alcohol-related mortality and its socioeconomic differences after a large reduction in alcohol f** Epidemiology, 168: 1110–1118, 2008.

HOLFORD, N.H.G. **Clinical pharmacokinetics of ethanol.** Clin. Pharmacokinet. 13: 273 – 292, 1987.

HOFFMAN, P.L. IORIO, K.R.; SNELL, L.D.; TABAKOFF, B. **Attenuation of glutamate-induced neurotoxicity in chronically ethanol exposed cerebellar**

- granule cells by NMDA receptor antagonists and ganglioside GM1.** *Alcohol Clin Exp Res.* 19: 721–6, 1995.
- HOMMER, D.W. **Male and female sensitivity to alcohol-induced brain damage.** *Alcohol ResHealth.* 27: 181–185, 2003.
- HORE, J.; WILD, B.; & DIENER, H.-C. **Cerebellar dysmetria at the elbow, wrist, and fingers.** *Journal of Neurophysiology.* 65: 563–57, 1991.
- ICHISE, T., KANO, M., HASHIMOTO, K., YANAGIHARA, D., NAKAO, K., SHIGEMOTO, R., KATSUKI, M., AIBA, A. **mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination.** *Science.* 288: 1832–1835, 2000.
- IDRUS, N. M. AND NAPPER, R. M. A. **Acute and Long-Term Purkinje Cell Loss Following a Single Ethanol Binge During the Early Third Trimester Equivalent in the Rat.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research,* 36: 1365–1373. 2012. doi: [10.1111/j.1530-0277.2012.01743.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01743.x)
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos não Transmissíveis. Brasil, 15 capitais e Distrito Federal 2002–2003.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/inquerito/docs/consumoalcool.pdf>. Acessado em: 14 ago. 2012.
- IVINSKIS A. **A study of validity of open-field measures.** *Austr J Psychol .* 22:175-183. 1976
- JAATINEN, P.; RINTALA, J. **Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum.** *The Cerebellum.* 332 - 347, 2008.
- JACKSON, H.C.; NUTT, D.J. **Effects of benzodiazepine receptor inverse agonists on locomotor activity and exploration in mice.** *Eur J Pharmacol.* 221: 199±203, 1992.
- JAFFE, J.H. **The concept of dependence: Historical Reflections.** *Alcohol Health and Research World.* 17: 188 – 190, 1993.
- JERNIGAN, D.H.; MONTEIRO, M.; ROOM, R.; SAXENA, S. **Towards a global alcohol policy: alcohol, public health and the role of WHO.** 78 (4), 2000.
- JOHNSON, T.J.; STAHL, C. **Sexual experiences associated with participation in drinking games.** *J. Gen. Psychol.* 131: 304 – 320, 2004.
- JONES, D.G. **INFLUENCE OF ETHANOL ON NEURONAL AND SYNAPTIC MATURATION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM - MORPHOLOGICAL INVESTIGATIONS.** *Progress in Neurobiology.* 31: 171 - 197, 1988.
- JUNE, S. RH. L.; FOSTER, K.L.; EILER, II W.J.; GOERGEN, J.; COOK, J.B.; JOHNSON. N. **Dopamine and benzodiazepine-dependent mechanisms regulate**

**the EtOH-enhanced locomotor stimulation in the GABAA alpha1 subunit null mutant mice.** *Neuropsychopharmacology*. 32: 137 – 152, 2007.

KARINCH, A.M.; MARTIN, J.H.; VARY, T.C. **Acute and chronic ethanol consumption differentially impact pathways limiting hepatic protein synthesis.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295: E3 - E9, 2008.

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

KOOB, G.; KREEK, M.J. **Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence.** *Am J Psychiatry*. 164: 1149 – 1159, 2007.

KUMAR, S.; FLEMING, R.L.; MORROW, A.L. **Ethanol regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors: genomic and nongenomic mechanisms.** *Pharmacol Ther.* 101: 211 – 226, 2004.

LANCET. **Calling time on young people's alcohol consumption.** 371: 871, 2008.  
Disponível em: [thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673608603864](http://thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673608603864)  
Acessado em: 17 ago, 2012.

LARANJEIRA, R.; PINSKY, I.; ZALESK, M.; CAETANO, R. **I levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira.** Centro Brasileiro de Informações sobre drogas Psicotrópicas (CEBRID). Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD), 2007.

LEDOUX, S.; PATRICK, M.P.; CHOQUET, M.; PLANT, M. **Family structure, parent-child relationships, and alcohol and other drug use among teenagers in France and the United Kingdom.** *Alcohol*. 37(1) :52 – 60, 2002.

LEE, H.Y.; NAHA, N.; KIM, J.H.; JO, M.J.; MIN, K.S.; SEONG, H.H.; SHIN, D.H.; KIM, M.O. **Age- and area-dependent distinct effects of ethanol on Bax and Bcl-2 expression in prenatal rat brain.** *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1590–1598, 2008.

LEITE, L.E.; NOBRE, M.J. **The negative effects of alcohol hangover on high-anxiety phenotype rats are influenced by the glutamate receptors of the dorsal midbrain.** *Neuroscience*. 213: 93-105. 2012.

LEON, D.A.; McCAMBRIDGE, J. **Liver cirrhosis mortality rates in Britain from 1950 to 2002: an analysis of routine data.** *Lancet*. 367: 52 – 6, 2006.

LIGHT, K.E.; BELCHER, S.M.; PIERCE, D.R. **Time course and manner of Purkinje neuron death following a single ethanol exposure on postnatal day 4 in the developing rat.** *Neuroscience*. 114: 327 – 337, 2002.

LI, Y.; FRASER, A.M.; IDRUS, N.M.; LOUGHNAN, A-K.; NAPPER, R.M.A. **Morphological features of apoptotic Purkinje cell death are visible soon after**

**binge exposure to ethanol on post-natal day four: a transmission electron microscopy study.** *Alcohol Clin Exp Res.* 26: 96A, 2002.

LOUIS, E.D.; FAUST, P.L.; VONSATTEL, J.P.G. **Purkinje cell loss is a characteristic of essential tremor.** *Parkinsonism & Related Disorders.* 17(6): 406-409. 2011

LOVINGER, D.M. **5-HT<sub>3</sub> receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic.** *Neurochem Int.* 35: 125 –130, 1999.

LOVINGER, D.M. **Excitotoxicity and alcohol-related brain damage.** *Alcohol Clin Exp Res.* 17: 19–27, 1993.

LORENZ, D.; DEUSCHL, G. **Update on pathogenesis and treatment of essential tremor.** *Curr Opin Neurol.* 20: 447 e 52, 2007.

MAIA, C.S.F.; FERREIRA, V.M.M.; KAHWAGE, R.L.; AMARAL, M.N.; SERRA, R.B.; NORO DOS SANTOS, S.; DO NASCIMENTO, J.L.M.; RODRIGUES, L.G.; TRÉVIA, N.; DINIZ, C.W.P. **Adult brain nitrenergic activity after concomitant prenatal exposure to ethanol and methyl mercury.** *Acta Histochemica.* 112(6): 583 – 591, 2009.

MAIA, C.S.F.; LUCENA, G.M.R.S.; CORRÊA, P.B.F.; SERRA, R.B.; MATOS, R.W.M.; MENEZES, F.C.; SANTOS, S.N.; SOUSA, J.B. COSTA, E.T.; FERREIRA, V.M.M. **Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system.** *Neurotoxicology.* 30: 23 – 30, 2009.

MAIA, C.S.F.; FERREIRA, V.M.M.; DINIZ, J.S.V.; CARNEIRO, F.P.; DE SOUSA, J.B.; DA COSTA, E.T.; TOMAZ, C. **Inhibitory avoidance acquisition in adult rats exposed to a combination of ethanol and methylmercury during central nervous system development.** *Behavioural Brain Research.* 211: 191 - 197, 2010.

MAIER, S.E.; WEST, J.R. **Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat.** *Alcohol* 2001; 23: 49-57.

MACKENBACH, J.P. **Socioeconomic inequalities in health in 22 European countries.** *The New England Journal of Medicine.* 358: 2468 – 2481, 2008.

MANZO-AVALOS, S.; SAAVEDRA-MOLINA, A. **Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption.** *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7: 4281 - 4304, 2010.

MARGOLIS, R.L. **Cerebellum and psychiatry.** *International Review of Psychiatry* 13, 229–231, 2001.

MARINHO, V.; LAKS, J.; ENGELHARDT, E.; CONN, D. **Alcohol abuse in an elderly woman taking donepezil for Alzheimer disease.** *J. Clin. Psychopharmacol.* 26: 683 – 685, 2006.

MARTIN, J.R.; SCHOCH, P.; JENCK, F.; MOREAU, J.L.; HAEFELY, W.E. **Pharmacological characterization of benzodiazepine receptor ligands with intrinsic efficacies ranging from high to zero.** *Psychopharmacology (Berl)*. 111: 415 – 422, 1993.

MARTY, V.N.; SPIGELMAN, I. **Long-Lasting Alterations in Membrane Properties, K<sup>+</sup> Currents, and Glutamatergic Synaptic Currents of Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons in a Rat Model of Alcohol Dependence.** *Front Neurosci*. 6 (86): 1-15. 2012.

MARTY, V.N.; SPIGELMAN, I. **Effects of alcohol on the membrane excitability and synaptic transmission of medium spiny neurons in the nucleus accumbens.** *Alcohol*. 46(4): 317-327. 2012.

MARTZ, A.; DEITRICH, R. A.; & HARRIS, R. A. **Behavioral evidence for the involvement of g-aminobutyric acid in the actions of ethanol.** *Eur J Pharmacol*. 89: 53 – 62, 1983.

MARYLKA UUSISAARI & THOMAS KNÖPFEL. **Functional Classification of Neurons in the Mouse Lateral Cerebellar Nuclei.** *Cerebellum*. 10: 637–646, 2011.

MATHIJSSSEN, J.; JANSSEN, M.; BON-MARTENS, M.V.; GOOR, I.V. **Adolescents and alcohol: an explorative audience segmentation analysis.** *BMC Public Health*. 12: 742, 2012.

MATHURIN, P.; DELTENRE, P. **Effect of binge drinking on the liver: an alarming public health issue?** *Gut*. 58: 613 – 617, 2009.

MATSUURA, K.; KABUTO, H.; MAKINO, H.; OGAWA, N. **Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion.** *J Neurosci Methods*. 73: 45 – 8, 1997.

McALLISTER, I. **Alcohol consumption among adolescents and young adults.** Melbourne, Victoria, Report commission by the Distilled Spirits Industries Council of Australia, 2003.

MCCORMICK, C.M.; SMITH, C.; MATHEWS, I.Z. **Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats.** *Behavioural Brain Research*. 187: 228 – 238. 2008.

MCKAY, B.E.; TURNER, R.W. **PHYSIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL DEVELOPMENT OF THE RAT CEREBELLAR PURKINJE CELL.** *J Physiol*. 567: 829 – 50, 2005.

MEASHAM, F.; BRAIN, K. **'Binge' drinking, British alcohol policy and the new culture of intoxication.** *Crime, Media, Culture Int J*. 1: 262 – 283, 2005.

MELONI, J.N.; LARANJEIRA, R. **Custo Social e de Saúde do Consumo do Alcool**. Revista Brasileira Psiquiátrica, 26 (supl. I): 7 – 10, 2004.

MERCER, D.F. **Animal models for studying hepatitis C and alcohol effects on liver**. World J Gastroenterol. 17(20): 2515 – 2519, 2011.

MENARD, J.; TREIT, D. **Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety**. Neurosci Biobehav Rev. 23: 591 – 613, 1999.

MOORE, E.M.; MARIANI, J.N.; LINSENBARDT, D.N.; MELON, L.C.; BOEHM, S.L. II. **Adolescent mice consume greater amounts of limited-access ethanol compared to adults and display continued elevated ethanol intake into adulthood**. Alcohol Clin Exp Res. 34: 1–9, 2010.

MULHOLLAND, P. J.; HOPF, F. W.; BUKIYA, A. N.; MARTIN, G. E.; LIU, J.; DOPICO, A. M. **Sizing up ethanol-induced plasticity: the role of small and large conductance calcium-activated potassium channels**. Alcoholism: Clinical & Experimental Research. 33: 1125 – 1135, 2009.

NASCIMENTO, E. C.; JUSTO, J. S. **Vidas Errantes e alcoolismo: uma questão social**. Psicologia: Reflexão e Crítica, v. 13, n. 3, p. 529-538, 2000.

NARAHASHI, T.; AISTRUP, G.L.; MARSZALEC, W.; NAGATA, K. **Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new target site of ethanol**. Neurochem Int. 35: 131–141, 1999.

NOLL, R.B.; ZUCKER, R.A.; GREENBERG, G.S. **Identification of alcohol by smell among preschoolers: evidence for early socialization about drugs occurring in the home**. Child Dev. 61: 1520 – 1527, 1990.

NORBERG, A.; JONES, A.W.; HAHN, R.G.; GABRIELSSON, J.L. **Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: Research and forensic applications**. Clin. Pharmacokinet. 42: 1 – 31, 2003.

NOVELLI, A.; REILLY, J.A.; LYSKO, P.G.; HENNEBERRY, R.C. **Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced**. Brain. 451: 205–12, 1988.

OGAWA, N.; HIROSE, Y.; OHARA, S.; ONO, T.; WATANABE, Y. **A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice**. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 50: 435 – 441, 1985.

O'HEARN, E.; MOLLIVER, M.E. **Organizational principles and microcircuitry of the cerebellum**. International Review of Psychiatry. 1: 232–246, 2001.

OLEAS, J.; YOKOI, F.; DE ANDRADE, M.P.; PISANI, A.; LI, Y. **Engineering animal models of dystonia**. *Movement Disorders*, 28(7), 990-1000. 2013



ORTELLS, M.O.; LUNT, G.G.. **Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors.** *Trends Neurosci.* 18: 121–127, 1995.

PAINE, R. W.; GROSSBERG, S.; & VAN GEMMERT, A. W. A. **A quantitative evaluation of the AVITEWRITE model of handwriting learning.** *Human Movement Science.* 23: 837–860, 2004.

PANDOLFO, P.; PAMPLONA, F.A.; PREDIGER, R.D.S.; TAKAHASHI, R.N. **Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2.** *European Journal of Pharmacology.* 563(3): 141-148. 2007

PARKS, M. H.; MORGAN, V. L.; PICKENS, D. R.; PRICE, R. R.; DIETRICH, M. S.; NICKEL, M. K. **Brain fMRI activation associated with self-paced finger tapping in chronic alcohol-dependent patients.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 27: 704–711, 2003.

PASCUAL, M.; BLANCO, A. M.; CAULI, O.; MIÑARRO, J.; & GUERRI, C. **Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats.** *European Journal of Neuroscience,* 25(2), 541-550. 2007

PERRY, T.A.; TORRES, E.M.; CZECH, C.; BEYREUTHER, K.; RICHARDS, S.; DUNNETT, S.B. **Cognitive and motor function in transgenic mice carrying excess copies of the 695 and 751 amino acid isoforms of the amyloid precursor protein gene.** *Alzheimer's Res.* 1: 5 – 14, 1995.

PENTNEY, R. J.; & DLUGOS, C. A. **Cerebellar Purkinje neurons with altered terminal dendritic segments are present in all lobules of the cerebellar vermis of ageing, ethanol-treated F344 rats.** *Alcohol Alcohol.* 35: 35± 43, 2000.

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

PIERCE, D.R.; HAYAR, A.; WILLIAMS, D.K.; LIGHT, K.E. **Olivary climbing fiber alterations in PN40 rat cerebellum following postnatal ethanol exposure.** *Brain Research.* 1378: 54-65. 2012

PIERCE, D.R.; WILLIAMS, D.K.; LIGHT, K.E. **Purkinje Cell Vulnerability to Developmental Ethanol Exposure in the Rat Cerebellum.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research,* 23: 1650–1659. 1999. doi: [10.1111/j.1530-0277.1999.tb04057.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1999.tb04057.x)

PIETRZYKOWSKI, A.Z.; FRIESEN, R.M.; MARTIN, G.E.; PUIG, S.I.; NOWAK, C.L.; WYNNE, P.M.; SIEGELMANN, H.T.; TREISTMAN, S.N. **Posttranscriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol.** *Neuron.* 59: 274 – 287, 2008.



PINE, D.S.; COHEN, P.; BROOK, J.S. **Emotional reactivity and risk for psychopathology among adolescents.** *CNS Spectr.* 6(1): 27–35, 2001.

RAJGOPAL, Y.; CHETTY, C.S.; VEMURI, M.C. **Differential modulation of apoptosis-associated proteins by ethanol in rat cerebral cortex and cerebellum.** *Eur J Pharmacol.* 470: 117–124, 2003.

RAMEZANI, A.; GOUDARZI, I.; LASHKARBOLOUKI, T.; GHORBANIAN, M.T.; SALMANI, M.E.; ABRARI, K. **Neuroprotective effects of the 17 $\beta$ -estradiol against ethanol-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: Biochemical, histological and behavioral changes.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 100: 144-151. 2011

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

REINHOLDZ, H.K.; BENDTSEN, P.; SPAK F. **Different Methods of Early Identification of Risky Drinking: A Review of Clinical Signs.** *Alcohol and Alcoholism* Vol. 46, No. 3, pp. 283–291, 2011.

ROBERTO, M.; TREISTMAN, S.N.; PIETRZYKOWSKI, A.Z.; WEINER, J.; GALINDO, R.; MAMELI, M.; VALENZUELA, F.; ZHU, P.J.; LOVINGER, D.; ZHANG, T.A.; HENDRICKSON, A.H.; MORRISETT, R.; SIGGINS, G.R. **Actions of acute and chronic ethanol on presynaptic terminals.** *Alcohol Clin. Exp. Res.* 30: 222 – 232, 2006.

ROGERS, B.P.; PARKS, M.H.; NICKEL, M.K.; KATWAL, S.B.; MARTIN, P. R. **Reduced Fronto-Cerebellar Functional Connectivity in Chronic Alcoholic Patients.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 36(2): 294–301. 2012. doi: [10.1111/j.1530-0277.2011.01614.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01614.x)

ROMANO, M.; DUAILIBI, S.; PINSKY, I.; LARANJEIRA, R. **Alcohol purchase survey by adolescents in two cities of State of São Paulo, Southeastern Brazil.** *Rev Saude Publica.* 41: 495 – 501, 2007.

ROOM, R.; BABOR T.; REHM, J. **Alcohol and public health.** *Lancet*; 365: 519–30, 2005.

ROOM, R.; JERNIGAN, D.; CARLINI-MARLATT B.; et al. **Alcohol and developing societies: a public health approach.** Helsinki: Finnish Foundation for Alcohol Studies and Geneva: World Health Organization; 2002.

ROZAS, G.; GUERRA, M.J.; LABANDEIRA-GARCIA, J.L. **An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of Parkinsonism.** *Brain Res Brain Res Protoc.* 2: 75 – 84, 1997.

ROZAS, G.; LOPEZ-MARTIN, E.; GUERRA, M.J.; ABANDEIRA-GARCIA, J.L. **The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism.** J Neurosci Methods. 83: 165 –75, 1998.

SALINAS, E. **Rank-order-selective neurons form a temporal basis set for the generation of motor sequences.** J. Neurosci. 29, 4369–4380, 2009.

SANCHIS-SEGURA, C.; CORREA, M.; MIQUEL, M.; ARAGON, C.M.G. **Catalase inhibition in the Arcuate nucleus blocks ethanol effects on the locomotor activity of rats.** Neuroscience Letters, 376. pp. 66–70, 2005.

SANCHEZ, Z.M.; MARTINS, S.S.; OPALEYE, E.S.; MOURA, Y.G.; LOCATELLI, D.P.; NOTO, A.R. **Social factors associated to binge drinking: a cross-sectional survey among Brazilian students in private high schools.** BMC Public Health. 11: 201, 2011.

SARNA, J.R.; HAWKES, R. **Patterned Purkinje cell death in the cerebellum.** Progress in Neurobiology, 2003.

SCHUCKIT, M. A. **Was it worth all the fuss?** Alcohol and Alcoholism. (Supp.). 2: 459 - 469, 1994.

SCHUCKIT, M. **Alcohol and alcoholism.** In Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. Kasper, D.L. et al., Eds. McGraw Hill, New York, 2004.

SEITZ, H.K.; BECKER, P. **Alcohol metabolism and cancer risk.** Alcohol Res. Health. 30: 38 – 47, 2007.

SHER, L. **Alcohol and suicide: neurobiological and clinical aspects.** The Scientific World Journal 6, 700 – 706. DOI 10.1100/tsw.2006.146, (2006).

SHER, L.; ZALSMAN, G. **Alcohol and adolescent suicide.** Int J Adolesc Med Health. Volume 17, Issue 3, Pages 197–204, 2005.

SILVA, J.V.; CASTRO, V.; LARANJEIRA, R.; FIGLIE, N.B. **High mortality, violence and crime in alcohol dependents: 5 years after seeking treatment in a Brazilian underprivileged suburban community.** Rev. Bras. Psiquiatria. 34(2): 193-200, 2012.

SIGGINS, G. R.; ROBERTO, M.; NIE, Z. . **The tipsy terminal: presynaptic effects of ethanol.** Pharmacol Ther. 107: 80 – 98, 2005.

SILVEIRA, C.M.; SILVEIRA, C.C.; SILVA, J.G.; SILVEIRA, L.M.; ANDRADE, A.G., ANDRADE, L.H.S.G. **Epidemiologia do beber pesado e beber pesado episódico no Brasil: uma revisão sistemática da literatura.** Rev. Psiq Clín. 35: 31-38, 2008.

SILVERI, MM.; TZILOS, G.K.; PIMENTEL, P.J; YURGELUN-TODD DA. **Trajectories of adolescent emotional and cognitive development: effects of sex and risk for drug use.** Ann N Y Acad Sci. 1021: 363 – 370, 2004.

SISK, C.L.; FOSTER, D.L. **The neural basis of puberty and adolescence.** Nature Neuroscience. 7: 1040 – 1047, 2004.

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

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

SPANAGEL, R.; SIGMUND, S.; COWEN, M.; SCHROFF, K.C.; SCHUMANN, G.; FISEROVA M, E.T. **The neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene is critically involved in neurobehavioral effects of alcohol.** J Neurosci. 22: 8676 – 8683, 2002.

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

STANLEY, J.L.; LINCOLN, R.J.; BROWN, T.A.; McDONALD, L.M.; DAWSON, G.R.; REYNOLDS, D.S. **The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines.** J Psychopharmacol. 19(3): 221-227. 2005

STEINBERG, L. **Pubertal maturation and parent-adolescent distance: An evolutionary perspective.** Advances in adolescent development. 1: 82-114. 1989.

STEINBERG, L. **Cognitive and affective development in adolescence.** Trends Cogn Sci. 9 (2): 69–74, 2005.

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

STRINGARI, J.; MEOTTI, F.C.; SOUZA, D.O.; SANTOS, A.R.; FARINA, M. **Postnatal methylmercury exposure induces hyperlocomotor activity and cerebellar oxidative stress in mice: dependence on the neurodevelopmental period.** Neurochem Res. 31:563–569. 2006.

SULLIVAN, E.V. **Compromised pontocerebellar and cerebellothalamocortical systems: speculations on their contributions to cognitive and motor impairment in nonamnesic alcoholism.** Alcohol Clin Exp Res. 27: 1409 – 1419, 2003.

SUGIHARA, I. **Microzonal projection and climbing fiber remodeling in single olivocerebellar axons of newborn rats at postnatal days 4 – 7.** J. Comp. Neurol. 487: 93–106, 2005.

SUGIHARA, I. **Organization and remodeling of the olivocerebellar climbing fiber projection.** Cerebellum. 5: 15 – 22, 2006.

SUMNALL, H.R.; BEYNON, C.M.; CONCHIE, S.M.; RILEY, S.C.E.; COLE, J.C. **An investigation of the subjective experiences of sex after alcohol or drug intoxication.** *J. Psychopharmacol.* 21: 525 – 537, 2007.

TAPERT, S.F.; AARONS, G.A.; SEDLAR, G.R.; BROWN, S.A. **Adolescent substance use and sexual risk-taking behavior.** *J. Adolesc Health.* 28: 181 – 189, 2009.

TARANUKHIN, A.G.; TARANUKHINA, E.Y.; SARANSAARI, P.; PODKLETNOVA, I.M.; PELTO-HUIKKO, M.; OJA, S.S. **Neuroprotection by taurine in ethanol-induced apoptosis in the developing cerebellum.** *J Biomed Sci;* 17(Suppl. 1): S12, 2010.

TAVARES, B.F.; BÉRIA, J.U.; SILVA DE LIMA, M. - **Drug use prevalence and school performance among adolescents.** *Rev. Saúde Pública,* 35(2): 150 -158, 2001.

TAYLOR, J.; CARROLL, T. **Youth Alcohol Consumption: Experiences and Expectations.** In **Alcohol, young persons and violence.** Australian Institute of Criminology. 35, 2001.

TERRY, R.D.; DETERESA, R. **The importance of video editing in automated image analysis in studies of the cerebral cortex.** *J Neurol Sci.* 53:413-21. 1982

THAN, M. & SZABO, B. **Analysis of the function of GABAB receptors on inhibitory afferent neurons of Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat.** *Eur. J. Neurosci.* 15: 1575 – 1584, 2002.

THOMAS, J.D.; GOODLETT, C.R.; WEST, J.R. **Alcohol-induced Purkinje cell loss depends on developmental timing of alcohol exposure and correlates with motor performance.** *Brain Res Dev Brain Res.* 105: 159 – 166, 1998.

TING, J.W.; LAUTT, W.W. **The effect of acute, chronic, and prenatal ethanol exposure on insulin sensitivity.** *Pharmacol. Ther.* 111: 346 – 373, 2006.

TREISTMAN, S. N.; MARTIN, G. E. **BK Channels: mediators and models for alcohol tolerance.** *Trends in Neurosciences.* 32: 629 – 637, 2009.

UHART, M.; WAND, G.S. **Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research.** *Addict Biol.;* 14: 43-64, 2009.

U.S. Department of Health and Human Services. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR).** U.S.A. 28: 517 – 544, 2012.

UUSISAARI, M.; KNÖPFEL, T. **Functional Classification of Neurons in the Mouse Lateral Cerebellar Nuclei.** *Cerebellum.* 10: 637 – 646, 2011.

VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; MOLANDER, A.; SPANAGEL, R. **Neuropharmacology of alcohol addiction.** *British Journal of Pharmacology.* 154: 299 –315, 2008.

VIEIRA, D.L.; RIBEIRO, M.; ROMANO M; LARANJEIRA, R.R. **Álcool e adolescentes: estudo para implementar políticas municipais.** Rev. Saúde Pública. 41(3): 396 – 403, 2007.

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

VOOGD J, RUIGROK TJ. **The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis: the congruence of projection zones and the zebrin pattern.** J Neurocytol. 33(1): 5 - 21, 2004.

VOSS, J.; SANCHEZ, C.; MICHELSEN, S.; EBERT, B. **Rotarod studies in the rat of the GABA<sub>A</sub> receptor agonist gaboxadol: lack of ethanol potentiation and benzodiazepine cross-tolerance.** European Journal of Pharmacology. 482(3): 215-222. 2003

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

WEINER, J. L.; & VALENZUELA, C. F. **Ethanol modulation of GABAergic transmission: the view from the slice.** Pharmacology & Therapeutics. 111: 533 – 554, 2006.

WILKIE, M.B.; BESHEER, J.; KELLEY, S.P.; KUMAR, S.; O'BUCKLEY, T.K.; MORROW, A.L.; HODGE, C.W. **Acute ethanol administration rapidly increases phosphorylation of conventional protein kinase C in specific mammalian brain regions in vivo.** Alcohol Clin. Exp. Res. 31: 1259 – 1267, 2007.

WITT, E.D. **Puberty, hormones, and sex differences in alcohol abuse and dependence.** Neurotoxicol. Teratol. v. 29, p. 81 – 95, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global status report on alcohol and health.** Geneva. 2004.

YAMAMOTO, M.; WADA, N.; KITABATAKE, Y.; WATANABE, D.; ANZAI, M.; YOKOYAMA, M.; NAKANISHI, S. **Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain.** *The Journal of neuroscience*, 23(17), 6759-6767. 2003

YANG, A.L.; VADHAVKAR, S.; SINGH, G.; O'MARY, M.B. **Epidemiology of alcohol-related liver and pancreatic disease in the United States.** Arch. Intern. Med. 168: 649 – 656, 2008

ZARZAR, P.M.; JORGE, K.O.; OKSANEN, T.; VALE, M.P.; FERREIRA, E.F.; KAWACHI, I. **Association between binge drinking, type of friends and gender:**

**A cross-sectional study among Brazilian adolescents.** BMC Public Health. 12: 257, 2012.

ZHONG, Y.; DONG, G.; LUO, H.; CAO, J.; WANG, C.; WU, J.; FENG, Y.Q.; YUE, J. **Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem.** Toxicology. 302(3): 275-284. 2012

## 7. ANEXOS



### PARECER BIO042-12

**Projeto:** Alterações do Sistema Nervoso Central, Sistema Reprodutor e Aparelho Estomatognático em Ratos Tratados Cronicamente com Etanol da Adolescência à Fase Adulto”

**Coordenador:** Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

**Área Temática:** Biologia

**Vigência:** 11/2011 a 11/2013

**Nº no CEPAE-UFPA:** BIO043-12

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 é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação 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, 10 outubro de 2011

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Presidente CEPAE-UFPA