



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

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CEREBELARES
DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL DA
ADOLESCÊNCIA A FASE ADULTA.**

Polyane Alencar Cunha

Belém-PA

2014

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

**AVALIAÇÃO AS ALTERAÇÕES CEREBELARES
DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL DA
ADOLESCÊNCIA A FASE ADULTA.**

Autor: Polyane Alencar Cunha

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Co-orientador: Prof^oDr^o. Rafael Rodrigues Lima

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

Polyane Alencar Cunha

Avaliação as alterações cerebelares decorrentes da exposição ao etanol da adolescência à fase adulta.

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.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora

Prof^a. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia (UFPA)

Banca examinadora:

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aprovado em:

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela minha vida e por ter me dado forças e sabedoria para a realização deste trabalho.

À minha família, por sempre estarem do meu lado.

À orientadora, Prof^a. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia, serei profundamente grata por ter me aceitado em um momento tão difícil da minha jornada e ter acreditado em mim!

Ao professor Dr. Rafael Lima, por toda atenção dedica a mim. Sem o seu apoio esse momento não seria possível!

Ao professor Msc. Enéas Fontes, que com sua paciência não se estressou comigo!

As minhas melhores amigas nessa jornada, Luanna Fernandes e Luana Santana, que ficarão pra sempre no meu coração. Amizade é quando você encontra uma pessoa que olha na mesma direção que você, compartilha a vida e te respeita como você é.

A todos os colegas do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial a Ana Carolina, Thyago Vilhena, Tiago Leite e Eliana por sorrisos e conversas de corredor, aliviando o estresse do estudo.

As minhas queridas, Cliciane e D. Brasília, secretárias do PPGCF, que com tanta paciência me ajudaram e torceram por mim desde o inicio dessa jornada.

Ao meu melhor amigo/irmão Loris Neves e as minhas amigas Rafaela Miranda, Dheborá Sales, Larissa Chada, Nubia Vilhena e Sabrina Sabóia que sempre me incentivaram e entenderam minhas ausências quando tinha que “sacrificar” alguns trabalhos, finais de semana. Tenho sorte de poder contar com tamanha cumplicidade, entendimento, carinho, além de toda diversão proporcionada por vocês quando estamos juntos.

A agência financiadora CAPES.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

RESUMO

Avaliação as alterações cerebelares decorrentes da exposição do etanol da adolescência a fase adulta.

O abuso de álcool tem alcançado proporções massivas, associado a uma série de consequências adversas, transformando-se num dos fenômenos mais generalizados das últimas décadas sendo, portanto o álcool, agente da doença alcoólica, um problema de saúde pública. Os jovens estão em fase de transição fisiológica e social, sendo a curiosidade, a pressão do grupo social, o modelo familiar, a propaganda e a falta de políticas públicas, os principais fatores de riscos que os conduzem para o consumo precoce de álcool. O adolescente uma vez que se encontra em fase de maturação apresenta seu sistema nervoso central (SNC) vulnerável às agressões causadas pelo consumo dessa droga. Sabe-se que o álcool promove uma série de alterações motoras do ponto de vista clínico e concomitantemente fisiológico. Estas alterações são consequentes da ação do álcool sobre o SNC, mais especificamente sobre o Cerebelo, e que mediante uso crônico da droga sofre (como os demais órgãos do SNC) algumas alterações. O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações cerebelares decorrentes da exposição ao etanol da adolescência à fase adulta em ratos, sobre os padrões morfométricos observados no órgão, investigação da resposta tecidual e balanço oxidativo do órgão frente à injúria causada pelo tóxico. Ratos receberam a partir do 35º dia de vida pós-natal (período de puberdade), por gavagem, EtOH na dose de 6,5 g/kg/dia até completar 90 dias (fase adulta). Para visualização da injúria causada ao tecido, foi feita investigação morfométrica e análise bioquímica através de estresse oxidativo. Os resultados encontrados mostram que a massa cerebelar não é alterada, porém há uma redução no tamanho do órgão e houve aumento na densidade da população celular nas camadas molecular e granular. No entanto ocorreu uma diminuição de células neuronais, contudo as alterações morfohistológicas não foram acompanhadas de alterações na bioquímica oxidativa.

Palavras-chave: etanol, cerebelo, comportamento motor, injúria tecidual.

ABSTRACT

Evaluation cerebellar changes resulting from exposure of ethanol from adolescence to adulthood.

Alcohol abuse has reached massive proportions, associated with a number of adverse consequences, becoming one of the most widespread phenomena of recent decades and therefore alcohol, alcoholic disease agent of a public health problem. Young people are under physiological and social transition, with the curiosity, the pressure of the social group, the family model, propaganda and lack of public policies, the main risk factors which lead to early alcohol consumption. The teenager once is maturing presents its central nervous system (CNS) vulnerable to aggression caused by the consumption of this drug. It is known that alcohol promotes a series of motor change the point of view of clinical and physiological concurrently. These amendments are consequential action of alcohol sore CNS, specifically on the Cerebellum, and by chronic use of the drug suffer (like other organs of the CNS) some changes. The aim of this study was to evaluate the cerebellar changes resulting from exposure to ethanol from adolescence to adulthood in rats, on the morphometric patterns observed in the organ, tissue response and investigation of oxidative balance the body against the injury caused by toxic. Mice received from the 35th day of postnatal life (puberty period) by gavage at a dose of EtOH 6.5g/kg/day for 90 days (adulthood). To view the injury caused to the fabric was made morphometric biochemical research and analysis through oxidative stress. The results show that cerebellar mass is not changed, but there is a reduction in organ size and an increase in the density of the cell population in the molecular and granular layers, however a decrease in neuronal cells, with all the changes occurred were not morphohistologics accompanied by alterations in the biochemical oxidation. Keywords: ethanol, cerebellum, motor behavior, tissue injury.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Molécula do Etanol	13
Figura 02	Figura Anatômica do Cerebelo	18
Figura 03	Corte histológico transversal do Cerebelo	19
Figura 04	Efeito da intoxicação do etanol sobre a massa cerebelar em gramas	31
Figura 05	Mensuração do Cerebelo	32
Figura 06	Análise das secções coradas pela violeta de cresila	33
Figura 07	Análise das secções marcadas por imunohistoquímica corte histológico transversal do Cerebelo	35
Figura 08	Efeito da intoxicação crônica com etanol sobre a concentração de nitritos em tecido cerebelar	36
Figura 09	Efeito da intoxicação do etanol sobre o estresse oxidativo cerebelar	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT	Sistemas Serotoninérgicos
ADH	Ácooldesidrogenase
CYP2E1	Citocromo P450
EO	Estresse Oxidativo
ETOH	Etanol
G	Gramas
GABA	Receptor Gabaérgico
GSH-Px	GlutathionaPeroxidase Selênio Dependente
MEOS	<i>MicrosomalEthanolOxydizing System</i>
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotódio
NMDA	Receptor Glutamatérgico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PIB	Produto Interno Bruto
RE	Reticulo Endoplasmático
ROS	<i>ReactiveOxygenSpecies</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TIQs	Tetrahidroisoquimolinas
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1.	O álcool e a Saúde Pública	11
2.	Metabolismo do álcool	13
3.	Álcool e adolescência	16
4.	Cerebelo	18
5.	Álcool e cerebelo	20
6.	Estresse Oxidativo	21

OBJETIVOS

2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25

METODOLOGIA

3.1.	Animais e Tratamento	26
3.2.	Investigação Morfométrica e Imunohistoquímica	26
3.2.1.	PERFUSÃO, PESAGEM E MENSURAÇÃO MESOSCÓPICA	26
3.2.2.	PROCESSAMENTO TECIDUAL	27
3.2.3.	COLORAÇÃO PELA VIOLETA DE CRESILA	27
3.2.4.	PROCEDIMENTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	28
3.2.5.	ANÁLISE QUANTITATIVA TECIDUAL	28
3.3.	Estresse Oxidativo	29
3.3.1.	PREPARO DAS AMOSTRAS	29
3.3.2.	AVALIAÇÃO DOS NITRITOS	29
3.3.3.	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	30
3.3.4.	CONCENTRAÇÃO PROTEICA	30
3.4.	Análise Estatística	30

RESULTADOS	31
-------------------	----

DISCUSSÃO	37
------------------	----

CONCLUSÃO	41
------------------	----

REFERÊNCIAS	
--------------------	--

ANEXOS	
---------------	--

INTRODUÇÃO

1. O álcool e a Saúde Pública.

O uso abusivo de bebidas alcoólicas é um sério problema de saúde pública que acomete o mundo inteiro. O alcoolismo é conceituado como a ingestão de bebidas alcoólicas de forma continuada provocando prejuízo psicológico, social e físico ao ser humano. É uma doença de caráter crônico e progressivo, sendo um transtorno de alta prevalência (TWERSKI, 1987; CARLINI, GALDURÓZ e NOTO, 2001), constituindo fator de risco para outras doenças, como, por exemplo, câncer de boca, esôfago, fígado e pulmão, depressão maior, epilepsia, hipertensão e problemas cardíacos (REHM, SEMPOS e TREVISAN, 2003), assim como comportamentos violentos, tais como agressões físicas, verbais e problemas com o sistema judiciário (ZHANG, WELTE e WIECZOREK, 2002).

Nas últimas três décadas, o consumo de álcool sofreu um aumento significativo e, segundo estudos da Organização Mundial de Saúde (OMS), a população mundial consome a substância em intensidade diversa, desde os que bebem com o menor efeito tóxico possível aos que bebem de forma problemática e abusiva. Dentre os consumidores abusivos, os grupos mais preocupantes são as grávidas, crianças e adolescentes (TWERSKI, 1987; OLIVEIRA e ARNAUTS, 2011). De acordo com a OMS, o alcoolismo consiste em uma doença de natureza complexa, na qual o álcool atua como fator determinante sobre razões psicossomáticas preexistentes no indivíduo e o tratamento requer uma busca a processos profiláticos e terapêuticos de grande amplitude (TWERSKI, 1987).

No Brasil, o primeiro contato da população com o álcool se dá na adolescência por volta dos 12 anos (CEBRID, 2010). Legalmente, o consumo de bebidas alcoólicas é proibido para menores de 18 anos no país, segundo a Lei nº 8.069/90, art. 243 - Estatuto da Criança e do Adolescente, no entanto, os obstáculos são pequenos para que os adolescentes adquiram a droga lícita iniciando seu consumo de forma precoce (ROMANO et al. 2007). Desta forma, em um universo de adolescentes representativo das várias regiões do País e de áreas urbanas e rurais, aproximadamente 35% dos jovens consomem bebidas alcoólicas ao menos uma vez no ano. Da mesma maneira, o fato de que 24% destes adolescentes consumirem álcool pelo menos uma vez no mês merece atenção (BRASIL, 2007). Além disso, constatou-se por estudo epidemiológico nacional sobre a ingestão diária de etanol

(EtOH), que Belém foi apontada como a 12ª capital brasileira em quantidade de consumo da droga, com 31% dos entrevistados afirmando ter ingerido o equivalente a uma dose de álcool no último mês da pesquisa, situando a capital no 9º lugar em incidência de consumo (INCA, 2003).

Segundo dados da OMS (2011), 2,5 milhões de mortes por ano são causados pelo consumo nocivo do álcool, em que uma proporção considerável de jovens, entre 15 e 29 anos, morre por causas relacionadas à sua ingestão. As bebidas alcoólicas são as substâncias psicotrópicas mais utilizadas por adolescentes (FADEN, 2005; GALDURÓZ et al. 2005). Este consumo pode ter consequências negativas tão diversas como déficit no aprendizado, problemas sociais, prática de sexo sem proteção e/ou sem consentimento, maior risco de suicídio ou homicídio e acidentes relacionados ao uso abusivo (FADEN, 2005).

Para tratamento, grande parte dessa população recorre ao auxílio do Sistema Único de Saúde (SUS) gerando um custo social, pois grande parte do atendimento primário é realizada nos postos de saúde, gerando ônus para o Estado equivalente a 7,3% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro (GALLASSI et al. 2008). Nos Estados Unidos da América, cerca de 14% da população pode ser considerada dependente de álcool, segundo o *National Institute on Drug Abuse* (NIDA, 1998) e o *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA, 1998), em que o alcoolismo provocou um prejuízo de 166 bilhões de dólares aos cofres públicos norte-americanos nesse ano.

Segundo o DATASUS, em 2001 foram realizadas 388.722 internações por transtornos mentais e comportamentais devido ao uso de álcool, e este consumo se encontra como a segunda causa de morbidade. Todas as internações custaram ao SUS neste ano R\$ 488,4 milhões, sendo que R\$ 60,1 milhões (12,31%) foram gastos com as internações por transtornos devido à sua utilização (BRASIL, 2002).

Quanto mais cedo se inicia o uso do álcool, maior a vulnerabilidade ao abuso e à dependência, podendo ser o início para o uso de drogas ilícitas. Desta forma, o consumo precoce é considerado fator de risco para a dependência na vida adulta, sendo a adolescência a porta de entrada para esse vício (LARANJEIRA, 2002; PECHANSECKY, 2004).

2. Metabolismo do Álcool.

O EtOH é formado de uma pequena molécula apolar solúvel em água e em lipídios, de fórmula química (C₂H₅OH) (Figura 1). Apresenta-se no estado líquido, variando de cor transparente a escuro quase opaco, sendo a sua via de administração a oral (LIEBER e ABITTAN, 1999).

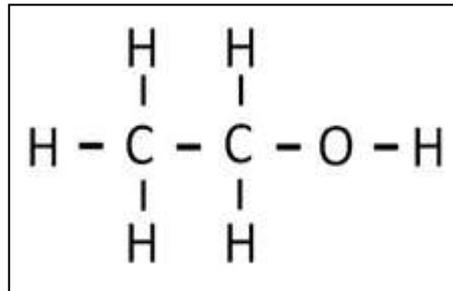


Figura 1 - Molécula de etanol.

Quando ingerido, a absorção do álcool no estômago e nas primeiras porções do intestino delgado é bastante rápida, principalmente na ausência do bolo alimentar, pois este fato aumenta a superfície de mucosa livre para absorção (HOFFMANNI et al.,1996). A droga é diretamente absorvida no tubo digestivo, sendo 30% no estômago, 65% no duodeno e o restante no cólon (MELLO et al. 2001).

A absorção se dá pela livre passagem do EtOH pela mucosa digestiva sem sofrer prévia digestão, inversamente ao que ocorre com os alimentos, e a velocidade absorptiva no estômago vai depender do tipo de bebida, da concentração do EtOH, do pH do meio e do estado de vacuidade ou repleção do estômago (HOFFMANNI et al., 1996; MELLO et al., 2001). No intestino delgado, este fenômeno é extremamente rápido, completo e independe de concentração da droga ou da presença de alimentos (HOFFMANNI et al.,1996).

O EtOH atinge os tecidos do organismo e afeta a maioria das funções vitais (JÚNIOR et al.,1998). É uma molécula psicotrópica e necessita de algumas gramas para produzir efeito, com consequências bastante complexas sobre o Sistema Nervoso. Transita facilmente entre os obstáculos biológicos, equilibrando-se rapidamente entre o sangue e os tecidos (ROBERTS e KOOB, 1997).

A excreção de 10% do total da droga ingerida é realizada pelos pulmões (o que permite o doseamento da alcoolemia pela sua pesquisa no ar expirado), pelo suor e pela urina. O restante (90%) é metabolizado no fígado, quase na sua totalidade nos hepatócitos (MELLO et al. 2001). No hepatócito, o EtOH é oxidado no citoplasma por três vias: a álcool desidrogenase (ADH), a catalase e o citocromo P4502E1 (CYP 2E1), anteriormente designado como MEOS (do inglês *microsomal ethanol oxidizing system*) (MANSO, 1985; JÚNIOR et al. 1998).

Na primeira fase de biotransformação, a ADH age sobre o EtOH em uma reação de oxidação com formação de acetaldeído, que posteriormente é oxidado pela aldeído desidrogenase. No entanto, o acetaldeído não é o único produto formado nesta reação, ocorre também à formação de um mol de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) para cada mol de etanol oxidado. Como representado na reação a seguir:



Porém, NADH não é reoxidada em taxa suficiente para repor o NAD, desta forma há uma considerável produção de NADH e um aumento do NAD + H⁺ livre. Como consequência do aumento da relação NADH₂/NAD, observa-se uma série de alterações metabólicas decorrentes do consumo do EtOH, tais como, o aumento da α-glicerofosfato hepática e o estímulo à síntese de ácidos graxos com concomitante diminuição da oxidação normal dos ácidos graxos (KITSON e WEINER, 1996; JÚNIOR et al. 1998).

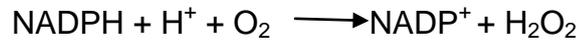
Em indivíduos que possuem o consumo do tipo crônico, a atividade de oxidação por via microssomal (MEOS) apresenta-se aumentada (MOAK e ANTON, 1999). Nesta via, a CYP 2E1 age como principal enzima na transformação do EtOH em acetaldeído levando também à produção de peróxido de hidrogênio, como na reação abaixo:



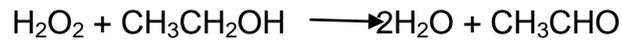
Com a formação de peróxido de hidrogênio, a via da catalase é ativada, ocorrendo à oxidação do NADPH através da NADPH-oxidase na presença da catalase, leva a oxidação do EtOH. Neste processo, tem-se como consequência a

formação de radicais de oxigênio tóxicos, que podem induzir a formação de lipoperóxido, advindos das reações demonstradas abaixo:

NADP-oxidase



Catalase



Independentemente do sistema enzimático, ADH, MEOS ou catalase, a primeira etapa do metabolismo do EtOH leva à produção de hidrogênio e acetaldeído. Seguindo o processo de oxidação do EtOH, a segunda etapa se dá a partir da formação do acetaldeído catalizado pela aldeíddesidrogenase, com a formação de acetil-COA e acetato, sendo esta uma reação irreversível. O acetaldeído pode interagir com aminoácidos como lisina, serina e cisteína (KITSON e WEINER, 1996).

Os aldeídos e as catecolaminas e indolaminas formam produtos de condensação no cérebro, resultando respectivamente tetrahydroisoquimolinas (TIQs) e B-carbolinas. Estes compostos se ligam a receptores opióides e são possivelmente responsáveis pela dependência ao álcool. Com efeito, a administração destes compostos em animais induzem ao auto-consumo voluntário da droga (MANSO, 1985).

Alguns estudos demonstram a importância da catalase na metabolização do EtOH no SNC. Homogenatos de cérebro de rato foram incubados com EtOH e medido o acetaldeído formado. Juntando um inibidor de ADH, o pirazol, ou um inibidor do MEOS, a metirapona, a produção de acetaldeído não foi afetada, porém a adição de inibidores de catalase (azida, cianamida, aminotriazol) promoveu bloqueio da produção de acetaldeído. Por outro lado, quando os homogenatos foram submetidos ao sistema glucose e glucose oxidase houve aumento na produção de acetaldeído. Estes dados sugerem a importância da catalase no SNC como importante metabolizador do EtOH (MIRA e MANSO, 1993).

Dentre seus efeitos, o álcool pode agir como reforço positivo quando acrescenta algo desejável como a sensação de euforia, e como reforço negativo

quando elimina algo desagradável como, por exemplo, quando reduz a ansiedade, causado pela abstinência, que é dependente do período e do tempo de exposição à droga (ROBERTS e KOOB, 1997).

3. Álcool e adolescência

O período da juventude é uma fase de transição fisiológica e social, sendo a curiosidade, a pressão do grupo social (ROSSOW e ROMELSJÖ, 2006), o modelo familiar (HABIB et al. 2010), a propaganda (VENDRAME e PINSKY, 2011) e a falta de políticas públicas (DIEHL et al. 2011) os principais fatores de riscos que os conduzem para o consumo precoce do álcool. Exemplificando uma situação de consumo, em festas observa-se que o jovem, para se sentir integrado ao ambiente, consome a droga de forma abusiva, caracterizando o consumo em forma de pileques (*binge*), ou seja, um padrão de consumo nos finais de semana e em quantidade excessiva (LARANJEIRA, 2007), induzindo à intoxicação.

Entende-se por intoxicação o contato de um indivíduo, por ingestão, injeção ou inalação, a uma ou mais substâncias que, associadas ou não, têm um elevado potencial para ocasionar efeitos adversos no organismo, sendo diagnosticada por sinais e sintomas ou dados laboratoriais. Pode ocorrer de forma aguda, caracterizada pela única ou múltipla exposição de curta duração (prazo de 24h), havendo uma absorção rápida da substância tóxica, o qual foi administrado em uma ou diversas doses, conduzindo a efeitos que se manifestam de forma imediata ou no decorrer de alguns dias, podendo resultar em morte, caso a intervenção curativa não seja precisa e efetiva. Por fim, a intoxicação crônica resulta de uma exposição repetida ao tóxico durante um longo período de tempo, levando a um efeito cumulativo no organismo, ocorrendo aumento da concentração nos tecidos, que, ao atingir determinado limite, origina lesões orgânicas. Este efeito também pode ser observado nas exposições sucessivas sem ocorrência de acumulação (OGA, 2008).

Neste sentido, os jovens ao reproduzirem um perfil de consumo de álcool sem um padrão regular promovem uma intoxicação aguda orgânica, apresentando sinais e sintomas caracterizados por níveis crescentes da depressão do Sistema Nervoso Central (SNC) como euforia leve, seguido de tontura, ataxia e incoordenação motora, evoluindo para confusão, desorientação e atingindo níveis de anestesia, entre eles o estupor e o coma (ALMEIDA, 2006). Estas respostas variam de acordo

com o nível de alcoolemia no organismo (APA, 2002; CRMESP, 2003) manifestando uma condição clínica transitória.

A intoxicação crônica induzida pelo uso crônico do álcool altera a memória, o controle dos impulsos, a análise, a aprendizagem, a síntese visuo-espacial, a velocidade psicomotora, as funções executivas, a tomada de decisões, além de transtornos persistentes e demência alcoólica (MESQUITA, 2008). Além disso, o usuário crônico apresenta manifestações psiquiátricas e alterações da estrutura celular do SNC (BAE et al. 2005).

Outros efeitos observados no uso prolongado dessa droga estão a desnutrição causada por um consumo de grande quantidade de calorias vazias, gerando diminuição de calorias proteicas, que a longo prazo causa deficiência de tiamina, ácido nicotínico, vitaminas do complexo B e ácido fólico, aumentando o risco de doenças neurológicas em associação a síndrome de Wernicke-Korsakoff, degeneração cerebelar, ambliopia, polineuropatias e pelagra (BRUST, 2009).

Estudos demonstram que muitas estruturas do SNC são acentuadamente afetadas pelo consumo de álcool, dentre estas é possível perceber alterações estruturais, fisiológicas e funcionais no cerebelo (NASCIMENTO e MOARES, 2009).

4. Cerebelo

O Cerebelo está localizado na caixa craniana em sua porção posterior, em repouso sobre a fossa cerebelar do osso occipital, posicionado dorsalmente ao bulbo e à ponte (Figura 2), apresenta circunvoluções e está dividido em dois hemisférios ligados pelo vérmis (VOOGD e GLICKSTEIN, 1998; BUGALHO et al. 2006). Este órgão do SNC é sensível à exposição ao EtOH e apresenta respostas difusas frente ao dano recebido (NASCIMENTO e MOARES, 2009; SASAKI et al. 1995; HARD et al. 2005; SCHUCKIT, 2005; BOYCE-RUSTAY et al. 2006; VASCONCELOS et al. 2004; VASCONCELOS, 2001; PRANT et al. 2008).

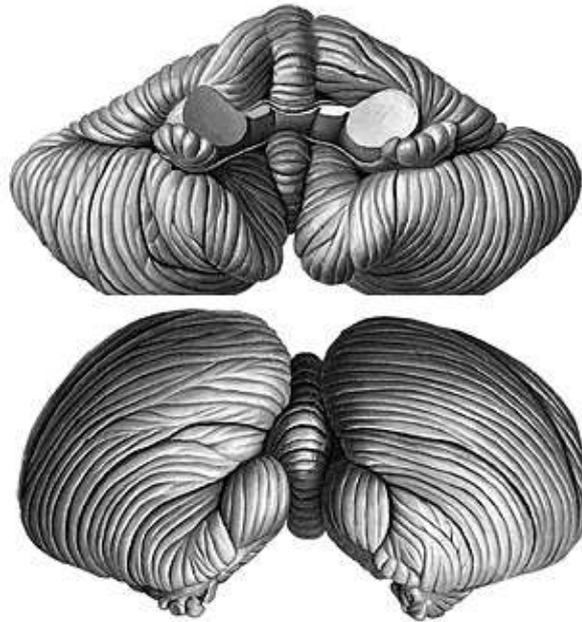


Figura 2 - Figura Anatômica do Cerebelo.

Fonte: Sobotta, 2013

Estudos demonstram que o cerebelo apresenta conexões com outras áreas do SNC como córtex pré-frontal (SCHMAHMANN, 1995), córtex parietal posterior, temporal superior, região occipito-temporal (SCHMAHMANN, 1992), assim como regiões límbicas (VILENSKY e VAN HOESEN, 1981), o que explicaria a participação deste órgão em múltiplas funções cerebrais, tais como funções executivas, áreas multimodais, de associação implicadas na integração de informação sensitiva e sensorial, organização visuo-espacial, memória visual e controle do comportamento e da motivação, respectivamente. Ainda podemos associar esse órgão à função cognitiva (BUGALHO et al. 2006) e motora (HOSP e LUFT, 2011).

A citoarquitetura do cerebelo é composta por três camadas que se dispõem uniformemente da porção mais exterior à interior, tais como molecular, células de Purkinje e a granular (VOOGD, 2003). Na camada molecular encontram-se as células estreladas localizadas superficialmente e dendritos das células de Purkinje, sendo estas responsáveis pelo processamento da informação cerebelar, uma vez que lançam seus axônios para o exterior do córtex cerebelar, realizando sinapses com outras áreas do SNC, tendo função integradora entre as camadas (APFEL et al. 2002; ROPPER e BROWN, 2005; VOOGD e GLICKSTEIN, 1998; O'HEARN e MOLLIVER, 2001; HIRANO et al. 1986). A camada granular apresenta células

granulares pequenas, células de Golgi maiores e fibras musgosas (FERNANDES, 1988; SULTAN et al. 2000) que correspondem a aproximadamente 95% das células do cerebelo maduro (ECCLES, 1970; KRYSTOSEK e SEEDS, 1981) (Figura 3).

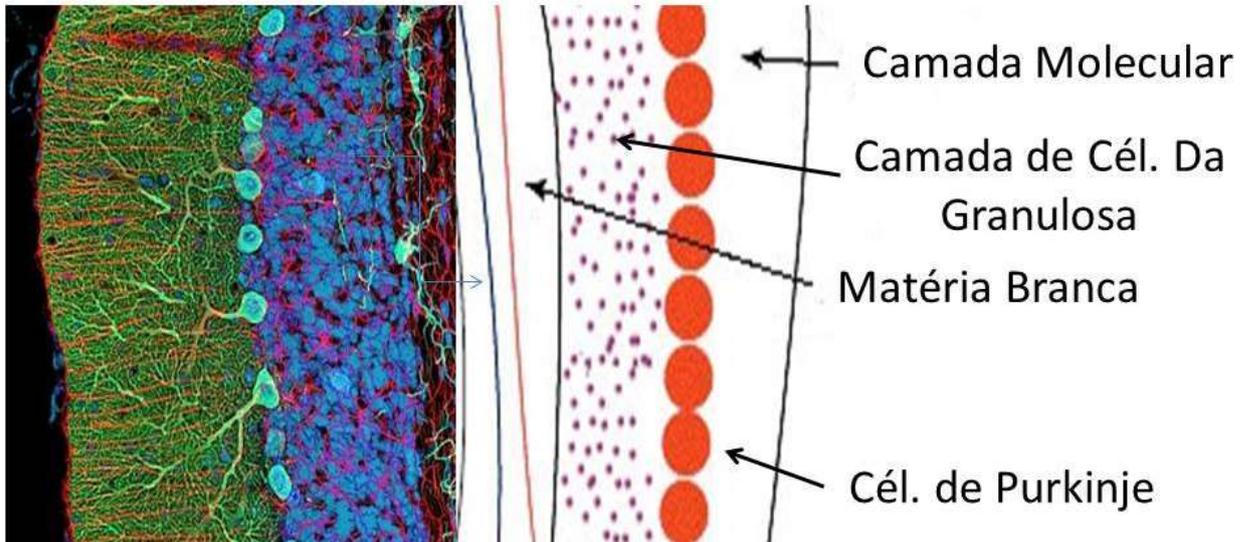


Figura 3 – Corte histológico transversal do Cerebelo (esquerda) em que é possível observar a camada de Células da Molecular (verde), camada de Células da Granulosa (azul), Matéria Branca (vermelho) e as células de Purkinje (posicionadas na porção intermediária entre as duas camadas), como representado no diagrama (direita). (Fonte: modificado de <http://www.cerebronosso.bio.br/galeria-imagens/cerebelos/>; http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=1&materia_id=364&materiaver=1&imprimir=1)

Vários autores relataram os efeitos da exposição crônica do EtOH em cerebelos de animais mamíferos, contudo somente alguns poucos estudos têm investigado os efeitos decorrente do uso em grandes quantidades do álcool sobre esse órgão (AVERSI-FERREIRA et al. 2004; AVERSI-FERREIRA e PENHA-SILVA, 2005a, AVERSI-FERREIRA et al. 2005b, AVERSI - FERREIRA et al. 2006; FIÚZA e MORAIS, 2005, GREEN, 2004; WANG et al. 1999).

5. Álcool e Cerebelo

Em geral, o uso abusivo de álcool induz a perturbações funcionais em diferentes sistemas orgânicos, por exemplo, no trato gastrointestinal, nos órgãos hematopoiéticos, no sistema imune e no SNC (ZHOU et al. 2003; SCHUCKIT, 2005; FISHER et al. 2008; HAPPEL et al. 2007).

O conjunto de lesões ocorridas no cerebelo devido à intoxicação alcoólica recebe o nome de degeneração cerebelar alcoólica (ANDERSEN, 2004; TIMMANN-BRAUN e DIENER, 2000) caracterizada por sinais e sintomas motores como ataxia de postura e marcha (VICTOR et al. 1958; ANDERSEN, 2004; TIMMANN-BRAUN e DIENER, 2000), alteração dos movimentos oculares (MAURITZ et al. 1979; WOBER et al. 1999), disdiadococinesia, dismetria e decomposição de movimentos (DECKER et al. 1959), alterações na fala, ocorrendo de modo lento e arrastado, variando em altura e intensidade (VICTOR et al. 1958).

Farmacologicamente, o álcool é um depressor do SNC, provocando uma desorganização geral na transmissão dos impulsos nas membranas excitáveis. Possivelmente, alguns dos seus efeitos são mediados por um mecanismo mais específico, envolvendo receptores glutamatérgicos do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e GABAérgicos, relacionados ao neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) (SCHUCKIT, 2005), sistemas serotoninérgicos (5-HT) (BOYCE-RUSTAY et al. 2006), opióides e dopaminérgicos (VASCONCELOS et al. 2004; VASCONCELOS, 2001).

O álcool também pode causar atrofia cerebelar, em que estudos de autópsia revelam que indivíduos alcoólatras crônicos têm o cerebelo menor, mais leve e atrofiado (LINDBOE e LOBERG, 1988; TORVIK et al. 1982). Em estudos por tomografia computadorizada, verificou-se que em 29% dos alcoólatras crônicos estudados apresentaram atrofia cerebelar (DIENER et al. 1986; HAUBEK e LEE, 1979) que também está presente nos pacientes com síndrome de Wernicke-Korsakoff (Antunez et al. 1998).

O consumo do EtOH causa desnutrição por vários mecanismos, sendo uma droga hipercalórica, porém sem vitaminas e sais minerais, suas calorias vazias parecem não ser aproveitadas para o crescimento corporal (LIEBER, 1976). A deficiência de tiamina merece atenção por ser considerada por alguns autores como um dos principais contribuintes para degeneração alcoólica cerebelar, porém o mecanismo pelo qual a ausência dessa vitamina regula a degeneração continua pouco estudada (BAKER et al. 1999; LANGOHR et al. 1981; MARTIN et al. 2003; PHILLIPS et al. 1987). Contudo, a tiamina exerce uma importante função nos processos metabólicos do cerebelo e em concentrações reduzidas no organismo

parece afetar negativamente o órgão (LANGOHR et al. 1981; POLONI et al. 1992; KRIL, 1996; MIWA et al. 2004). Outros mecanismos que poderiam contribuir com a neurodegeneração ocasionada pelo álcool, tais como o estresse oxidativo, também estão sendo investigados.

6. Estresse Oxidativo (EO)

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS- do inglês *Reactive Oxygen Species*) podem contribuir para o aparecimento de doenças ou estarem presentes em situações de toxicidade, como, por exemplo, diante do consumo de EtOH. A célula apresenta alguns mecanismos próprios que a auxiliam a reagir aos processos oxidantes consequentes dos radicais livres produzidos durante o próprio metabolismo através da cadeia respiratória mitocondrial. Este radical pode causar danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA, o ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O estresse oxidativo é responsável por diferentes tipos de danos, incluindo a peroxidação lipídica de membranas, a oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, apoptose e necrose, sendo definido como um desequilíbrio intracelular entre a produção de ROS e as vias antioxidantes (LIMA-VERDE et al., 2007). De acordo com Durukan e Tatlisumak (2007), as ROS reagem irreversivelmente com vários constituintes celulares, tais como proteínas, ligações duplas de fosfolípidos (ou seja, as membranas de organelas ou da própria célula), e DNA nuclear, e consequentemente induzem a aberrações na homeostase de íons, a sinalização celular e expressão gênica.

Além disso, essas lesões podem resultar em uma produção excessiva de ROS que supera uma capacidade antioxidante endógena composta de água ou moléculas lipossolúveis antioxidantes e enzimas de reparação. Contudo, a baixa concentração de ROS podem ter papéis fisiológicos e patológicos, influenciando as redes de transdução de sinal que regulam a expressão do gene eucariótico, função esta conhecida como "regulação redox" e que pode implicar na manifestação de uma resposta adaptativa e sobrevivência (RYTER; CHOI, 2005).

Um dos sistemas de regulação da concentração de ROS intracelular é o sistema enzimático e inclui as enzimas Superóxido Dismutase 1 (SOD1), enzimas glutaciona peroxidase selênio dependente (GSH-Px) e a catalase. As enzimas SOD agem sobre radical superóxido (O_2^-) que é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez é convertido em água pelas duas últimas enzimas (GSH-Px e catalase) (MOREIRA, 2010). O selênio, por sua vez age como um cofator da GSH-Px (ALVAREZ; MORAES, 2006), se comportando como um carreador temporário de oxigênio (LIMA-VERDE et al., 2007) e estimulando a ação de enzimas antioxidantes (CHEN et al., 2009).

A GSH-Px atua na matriz do citosol e das mitocôndrias, enquanto a vitamina E age nas membranas celulares. Juntamente com o tocoferol, o selênio atua interceptando radicais livres antes que eles possam danificar as membranas celulares, protegendo as membranas e organelas de danos oxidativos, facilitando a união entre o oxigênio e hidrogênio no final da cadeia metabólica (VIARO; VIARO; FLECK, 2001).

De acordo com Zhang e Richardson (2011), quando uma célula é exposta a situações que induzem seu estresse (radiação, homocisteína, dopamina ou EtOH) ocorre um aumento acentuado na expressão da Proteína do Retículo Endoplasmático 29 (Erp29 - do inglês *Endoplasmic Reticulum Protein 29*), uma proteína localizada na porção luminal do Retículo Endoplasmático (RE), que na sua expressão em situações de estresse podem indicar um potencial papel protetor contra estresse celular. No entanto, esta proteína também é apontada por Bambang et al. (2009) como sendo um regulador negativo da proliferação celular e/ou tumorigenese, uma vez que é expressa em maior quantidade por tumores de crescimento lento.

Assim como a Erp29, a Erp60 (também conhecida como Calreticulina) é uma proteína presente no RE e mitocôndrias e está relacionada com a homeostase da concentração de íons cálcio (Ca^{2+}) pelo seu transporte para o interior destas organelas. Assim sendo, alterações como a superexpressão deste gene aumenta o influxo de Ca^{2+} em todo o RE, mas diminui na mitocôndria, alterando o potencial de membrana. Esta alteração no fluxo de Ca^{2+} entre as duas organelas pode danificar as mitocôndrias, representando o aumento da susceptibilidade das células que

expressam níveis elevados de calreticulina a estímulos apoptóticos (ARNAUDEAU et al. 2002).

Outro mecanismo de proteção fisiológico contra a ação dos radicais livres é o sistema antioxidante de moléculas pequenas. Nesta via, moléculas de baixo peso molecular, tais como a vitamina A, E e C, o beta caroteno e o ácido úrico, reagem diretamente com os radicais livres diminuindo sua reatividade (MOREIRA, 2010). Este sistema distribui-se em ambas as fases da bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação (BARCLAY; ARTZ; MOWAT, 1995).

Sendo as mitocôndrias o principal local de produção de ROS, estas conseqüentemente necessitam de uma defesa antioxidante bem eficaz para evitar danos às funções das proteínas, da integridade membrana e ao DNA mitocondrial, preservando sua homeostase. Desta forma, alterações em sua expressão podem levar à perda significativa de potencial de membrana mitocondrial, diminuição dos níveis de Adenosina trifosfato (ATP) e aumento da produção de ROS (CARRÌ; COZZOLINO, 2011).

O estresse oxidativo induzido pela exposição crônica de álcool causa modificação de lipídios, proteínas e outras importantes macromoléculas e podem resultar em danos irreversíveis gliais e neuronais (SUN e SUN, 2001). Esses danos são consequência do metabolismo do EtOH e sua oxidação em acetaldeído. No entanto, sabe-se que os neurônios não são as únicas células do SNC a serem afetadas pelo álcool ou seus metabólitos. Ocorre também alterações sobre as células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e micróglia), o que pode interferir severamente na interação entre as células que compõe o SNC, eventualmente provocando degeneração devido a prejuízos no funcionamento glial. Estes prejuízos incluem alterações na produção de fatores de crescimento, nutrição, manutenção da homeostase da água, absorção de neurotransmissores e também na formação da barreira hemato-encefálica (JAATINEN e RINTALA, 2008).

Considerando os diversos estudos realizados sobre as alterações causadas pelo EtOH no cerebelo e o início precoce no consumo desta droga, observou-se que há uma lacuna relacionada aos danos decorrentes do uso crônico de álcool da

adolescência à fase adulta e suas consequências sobre este órgão no âmbito tecidual e no balanço oxidativo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as alterações teciduais e no balanço oxidativo no cerebelo de ratos intoxicados cronicamente com EtOH da adolescência à fase adulta.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos do EtOH sobre os aspectos anatômicos do cerebelo;
- Avaliar a possível alteração na densidade populacional celular cerebelar por meio de análise imunohistoquímica nas camadas molecular e granular;
- Verificar a influência do consumo crônico do EtOH sobre o balanço oxidativo.

METODOLOGIA

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E TRATAMENTO

Ratos Wistar, fêmeas, n=40, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará (UFPA), foram mantidos em condições padronizadas de temperatura, exatidão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, com comida e água *ad libitum*. Ao completar 35 dias de idade (período de puberdade) os animais receberam, por gavagem, EtOH na dose de 6,5 g/kg/dia até completar 90 dias (fase adulta). As doses utilizadas foram adaptadas de protocolos utilizados por Maier e West (2001); Tang et al. (2009) e Oliveira et al. (2014). Os animais controle receberam água destilada, também por gavagem. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPA (CEPAE-UFPA) recebendo aprovação (Parecer BIO 043-12).

3.2. INVESTIGAÇÃO MORFOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

O Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE), do Instituto de Ciências Biológicas, na UFPA foi sede da investigação morfométrica e imunohistoquímica.

3.2.1. Perfusão, pesagem e mensuração mesoscópica.

Após a fase de intoxicação, os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (9 mg/Kg) e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com solução salina a 0,9% heparinizada, seguida de paraformaldeído a 4%.

Após a perfusão dos animais, os cerebelos foram removidos da caixa craniana, pesados em balança de precisão (Gehaka BG 200). Em seguida, foi realizada a mensuração mesoscópica utilizando paquímetro digital (Mitutoyo Corp., CD 56" CT) nas dimensões antero-posterior, dorso-ventral e latero-lateral.

3.2.2. Processamento tecidual

Após as mensurações, os cerebelos foram pós-fixados no mesmo fixador usado na perfusão por 12h. Em seguida, os cerebelos foram crioprotetidos em soluções com concentrações crescentes de sacarose e glicerol, sendo posteriormente embebidos em Tissue Tek, congelados em câmara de criostato (Carl Zeiss, Mícron, Alemanha), com efeito, Peltier (- 55 °C).

Secções coronais com 50 µm e 20 µm de espessura foram obtidas para análise morfométrica e imunohistoquímica, respectivamente. De cada animal foram coletadas secções de toda a extensão rostro-caudal do cerebelo, seguindo a ordem de 2 secções de 100 µm, intercaladas por área de 200 µm, dos quais foram obtidas secções de 50 µm e 20 µm. Para a análise imunohistoquímica, foram eleitas apenas as lâminas com secções da região anterior do cerebelo, devido à maior e mais completa representatividade das estruturas de interesse para este trabalho.

Todas as secções foram coletadas em poças individuais, contendo tampão fostato salina (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*), devidamente identificadas e, posteriormente, montadas em lâminas gelatinizadas. Para aumento da aderência das secções, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo 24h antes de qualquer outro procedimento histológico. Após este período, as mesmas foram conservadas à temperatura de -20°C aguardando imunohistoquímica e coloração com violeta de cresila.

3.2.3. Coloração por Violeta de Cresila e densidade celular

Secções de 50µm foram coradas com violeta de cresila, desidratadas em bateria de concentração crescente de álcool e xilol e montadas utilizando-se Entellan®. Foram contabilizados os corpos celulares corados, não distinguindo-se glia e população neuronal.

3.2.4. Procedimentos imunohistoquímicos

Para análise imunohistoquímica foi utilizado o anticorpo Anti-NeuN (1:100, Chemicon), que é um marcador para corpos neurais maduros, e que se liga a

uma proteína nuclear específica de neurônios, o qual indica as modificações de densidade/sobrevivência neuronal (MULLEN et al, 1992; SILVA et al., 2012).

Seguindo protocolo de Gomes-Leal et al. (2004) e Silva et al. (2013) as secções de 20 µm foram removidas do congelador, mantidas em estufa a 37°C durante 30 minutos e lavadas em solução salina tampão de fosfato 0,1 M (PBS) durante 5 minutos. Para melhorar a intensidade da marcação, as secções foram tratadas com ácido bórico (2 M, pH 9,0), previamente aquecido a 65°C, durante 25 minutos. A temperatura foi mantida constante durante o período de tratamento. As secções foram deixadas arrefecer durante 20 minutos e incubou-se sob agitação constante, em uma solução de peróxido de hidrogénio a 1% em metanol durante 20 minutos. As secções foram lavadas três vezes em solução a 0,05% de PBS/Tween durante 5 minutos cada e, em seguida, incubadas com 10% de soro normal de cavalo (NeuN) em PBS durante 1h (Companhia Sigma, EUA). Sem posterior enxague, as secções foram então incubadas em PBS durante a noite com o anticorpo primário NeuN (1:500, Miliporere, EUA). As secções foram então lavadas três vezes em solução de PBS/Tween durante 5 minutos cada e incubou-se com *biotinylated horse anti-mouse* (Vector Laboratories, EUA), diluído a 1:500 em PBS, durante 2h. Como controle negativo, soros normais, em vez de os anticorpos primários, foram usadas em algumas secções.

3.2.5. Análise quantitativa tecidual

Para a avaliação quantitativa da densidade celular revelada pela violeta de cresila e das marcações imunohistoquímicas, foi utilizado o microscópio binocular Nikon Eclipse E200, através de uma gradícula de contagem de 0,00625 mm² acoplada a uma das oculares, em objetiva 40x (adaptado de Oliveira et al, 2014).

Foi mensurado 3 secções por animal, sendo 5 animais do grupo EtOH e 6 animais do grupo controle, nas áreas de camada molecular e granulosa (Mohideen et al. 2012). As médias das contagens e o erro padrão obtidos foram plotados em coordenadas cartesianas.

Imagens de secções com campos mais ilustrativos foram obtidas com um sistema de fotomicroscopia digital utilizando-se o programa de computador Moticom 2500® acoplado ao fotomicroscópio Nikon 50i.

3.3. ESTRESSE OXIDATIVO

3.3.1. Preparo das amostras

Para a coleta das amostras para análise bioquímica, os animais foram anestesiados e depois do estado de anestesia foi retirado o cerebelo, que após lavagem em soro fisiológico, foi congelado em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Para as análises, as amostras foram submetidas a degelo lento, com posterior obtenção de lisado, em TRIS-HCL (≈ 1 g/mL), por desagregação sônica.

3.3.2. Avaliação dos níveis de nitritos

Os lisados dos cerebelos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi submetido a mensuração da concentração de nitritos. Esta análise é fundamentada na formação de compostos azoicos de cor azulada pela reação do nitrito com o reagente de Griess (Naftil-etileno-diamina 0,1% e Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% - 1:1). A intensidade da cor é proporcional à concentração do cromógeno, sendo verificado por leitura espectrofotométrica em um $\lambda = 550$ nm (Green et al. 1981). Os resultados foram expressos como micromoles de nitritos para cada miligrama de proteínas.

3.3.3. Ensaio de Peroxidação Lipídica

O nível de peroxidação lipídica foi determinado por meio do método proposto por Esterbauer e Cheeseman (1990), baseado na reação dos metabólitos de ácidos graxos poliinsaturados, malonaldeído (MDA) e 4-hidroxicenonas (4-HA), com o N-metil-2-fenilindol (NMF1) em presença de ácido metanosulfônico. A reação produz um cromóforo estável, cuja coloração é proporcional à concentração de lipídios oxidados, podendo ser mensurado por espectrofotometria ($\lambda = 570$ nm). Para tanto,

os lisados foram centrifugados a 5600 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante submetido a análise. Os resultados expressos como picomoles de MDA por miligrama de proteína.

3.3.4. Concentração de Proteína

Para esta análise, utilizou-se o método proposto por Bradford (1976) adaptado para leitor de ELISA em que 100µL da amostra de tecido são misturados com 100 µL do reagente de Bradford. A concentração de proteína foi medida espectrofotometricamente ($\lambda=595\text{nm}$) e os resultados expressos como mg de proteínas.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados morfométricos e imunohistoquímicos utilizou-se o software GraphPad Prism 5.0. A normalidade (i.e. distribuição gaussiana) de cada grupo foi testada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Os dados obtidos pelas avaliações imunohistoquímicas se mostraram homogêneos, sendo escolhido o teste t-Student. Foi considerado como diferença estatística quando $p<0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. O ETANOL NÃO ALTEROU A MASSA CEREBELAR NA JANELA/DOSE DE INTOXICAÇÃO ADOTADA.

O resultado ilustrado na figura 4 demonstra que a massa cerebelar dos animais expostos ao EtOH da adolescência à fase adulta não apresentou diferenças quando comparado ao grupo controle.

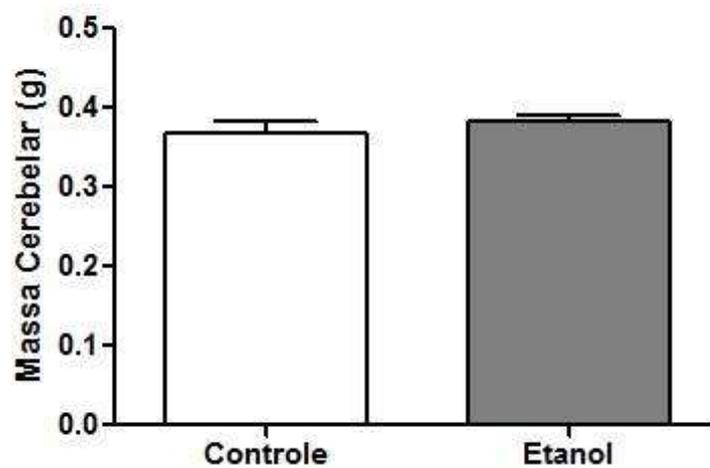


Figura 4 – Efeito da intoxicação do etanol sobre a massa cerebelar em gramas. Os resultados estão expressos como a média \pm E.P.M de 5-6 animais por grupo. Student-t test.

4.2. O EtOH PROMOVE, NA JANELA/DOSE DE INTOXICAÇÃO ADOTADA, DIMINUIÇÃO DAS DIMENSÕES CEREBELARES.

Na mensuração do cerebelo, nos planos anatômicos ântero-posterior, dorso-ventral e látero-lateral dos animais tratados com EtOH, foi possível observar que houve diminuição das dimensões avaliadas quando comparados aos cerebelos dos animais do grupo controle ($p < 0,05$; Figura 5).

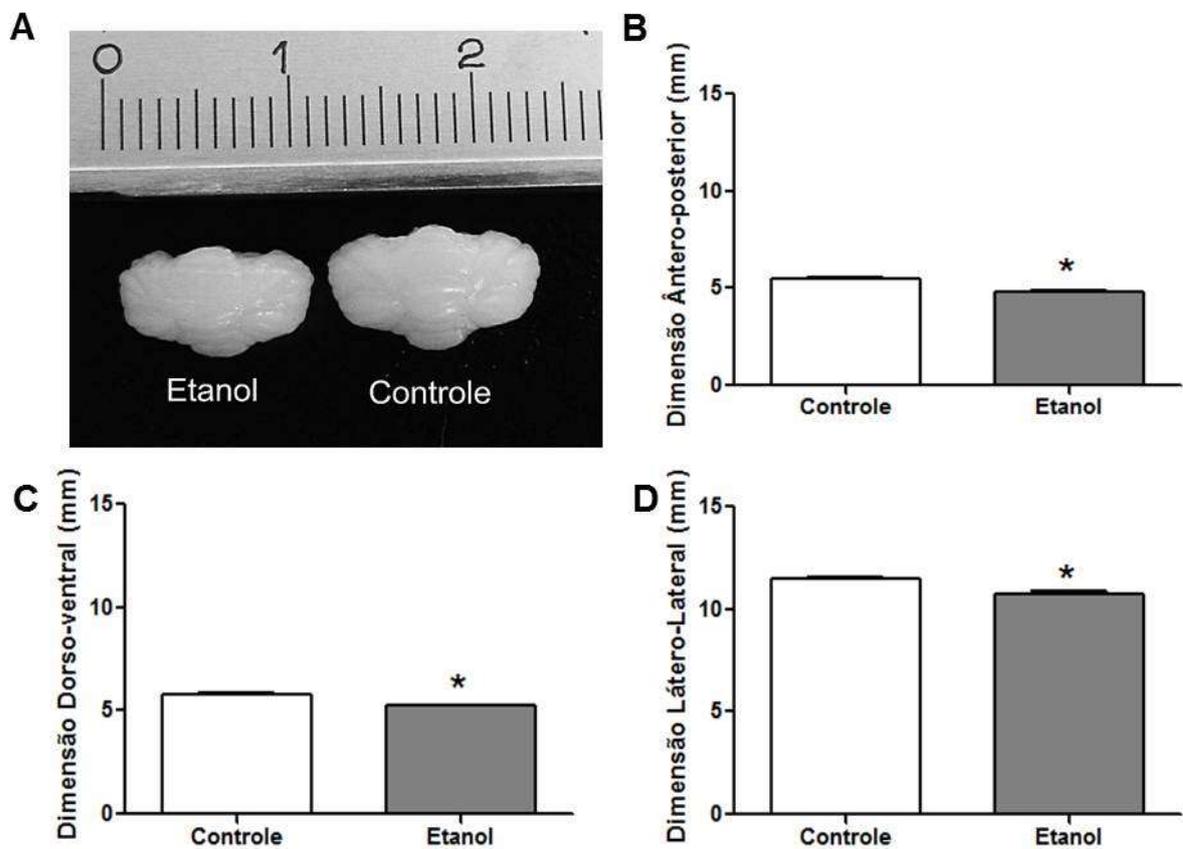


Figura 5 – Efeito da intoxicação do etanol sobre a mensuração do Cerebelo. Painel A: fotografia apresentando a representação da diferença entre os tamanhos dos cerebelos na régua de mensuração; Painel B: gráfico representativo do tamanho do plano ântero-posterior em milímetros (mm); Painel C: gráfico representativo do tamanho do plano dorso-ventral em mm; Painel D: gráfico representativo do tamanho do plano látero-lateral. Os resultados estão expressos como a média \pm E.P.M de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle. Student-t test.

4.3. O EtOH PROMOVE AUMENTO NA DENSIDADE CELULAR NAS CAMADAS MOLECULAR E GRANULAR

O consumo de álcool durante a adolescência induziu ao aumento no número de células das camadas granular e molecular do cerebelo. Na camada molecular os valores encontrados no grupo controle ($274,5 \pm 5,51$) foram significativamente menores que o grupo EtOH ($322,5 \pm 12,77$; $p = 0,0198$) (Figura 6, painel A e C).

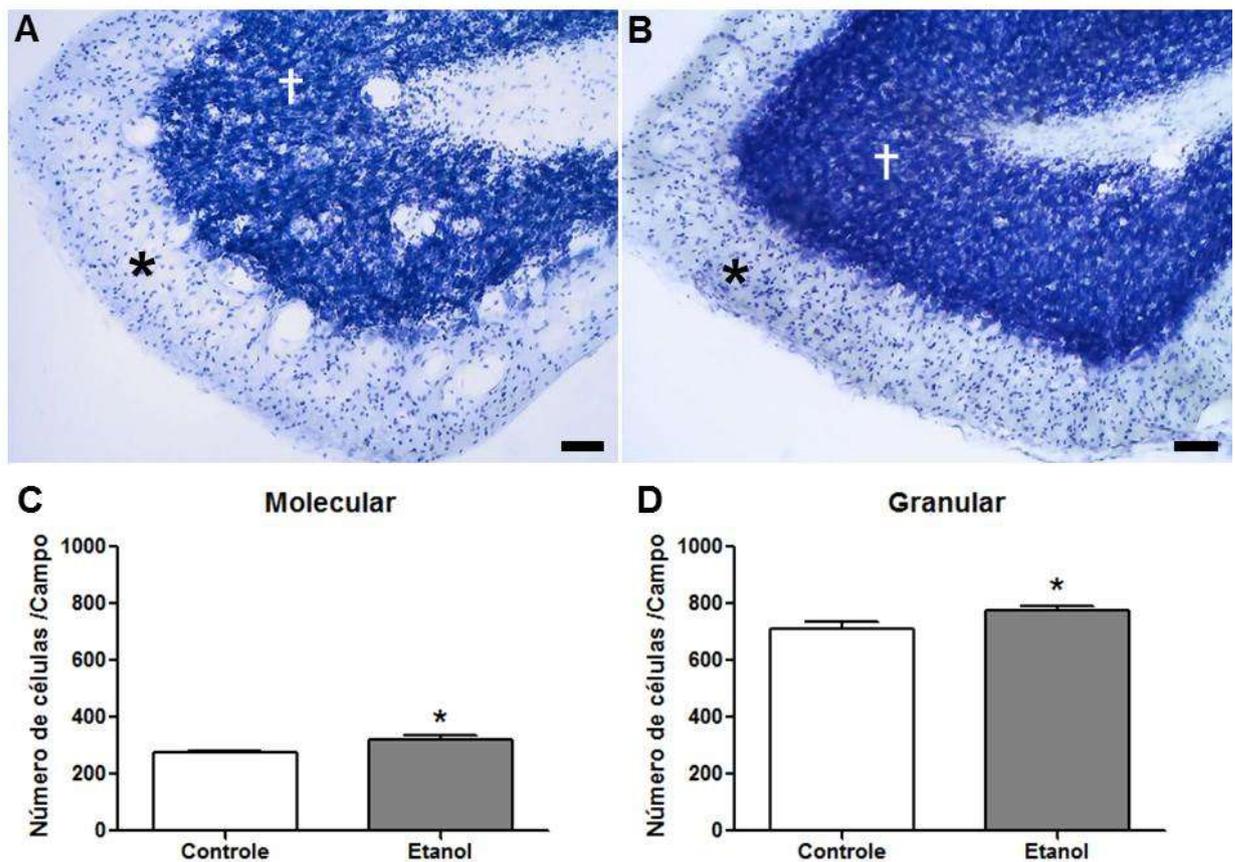


Figura 6 - Efeito da intoxicação do etanol sobre a análise das secções cerebelares coradas pela violeta de cresila. Painel A: micrografia ilustrativa do grupo controle; Painel B: micrografia ilustrativa do grupo etanol. (*) nas fotomicrografias representa a camada molecular; (†) nas fotomicrografias representa a camada granular (escala de $50\mu\text{m}$); Painel C: gráfico representativo da análise quantitativa do número de células por campo da camada molecular; Painel D: gráfico representativo da análise quantitativa do número de células por campo da camada granulosa. Os resultados estão expressos como a média \pm E.P.M de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle. Student-t test.

A análise comparativa entre os grupos na camada granular apresentou resultados semelhantes à análise da camada molecular, ou seja, o grupo controle

apresentou média de $(709,5 \pm 26,12)$ células por campo, enquanto que o grupo EtOH $(778,0 \pm 14,72)$ células com $p = 0,0383$, sugerindo que em ambas as camadas houve uma proliferação celular ocasionada pelo álcool.

A avaliação qualitativa das camadas molecular e granular sugere uma compactação das camadas cerebelares, com aparente aumento da densidade celular. Alteração justificada pela metodologia empregada (contagem de células por campo), que seria consequência da redução da matriz extracelular.

Sendo assim, o cerebelo dos ratos intoxicados durante a adolescência à fase adulta apresentou dimensões anatômicas menores, sem alterações em sua massa, porém com densidade celular aumentada nas camadas molecular e granular.

4.4. O EtOH CAUSA REDUÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA NEURONAL (ANTI-NEU N).

O tratamento com EtOH reduziu significativamente o número de células Neu-N+ $(128,6 \pm 60,36)$ no cerebelo, quando comparado ao controle $(365,8 \pm 96,74)$ na camada granulosa. O mesmo efeito foi observado na camada molecular, onde o grupo controle apresentou $(19 \pm 4,24)$ células por campo e o grupo EtOH $(6,25 \pm 3,5)$ (Figura 7).

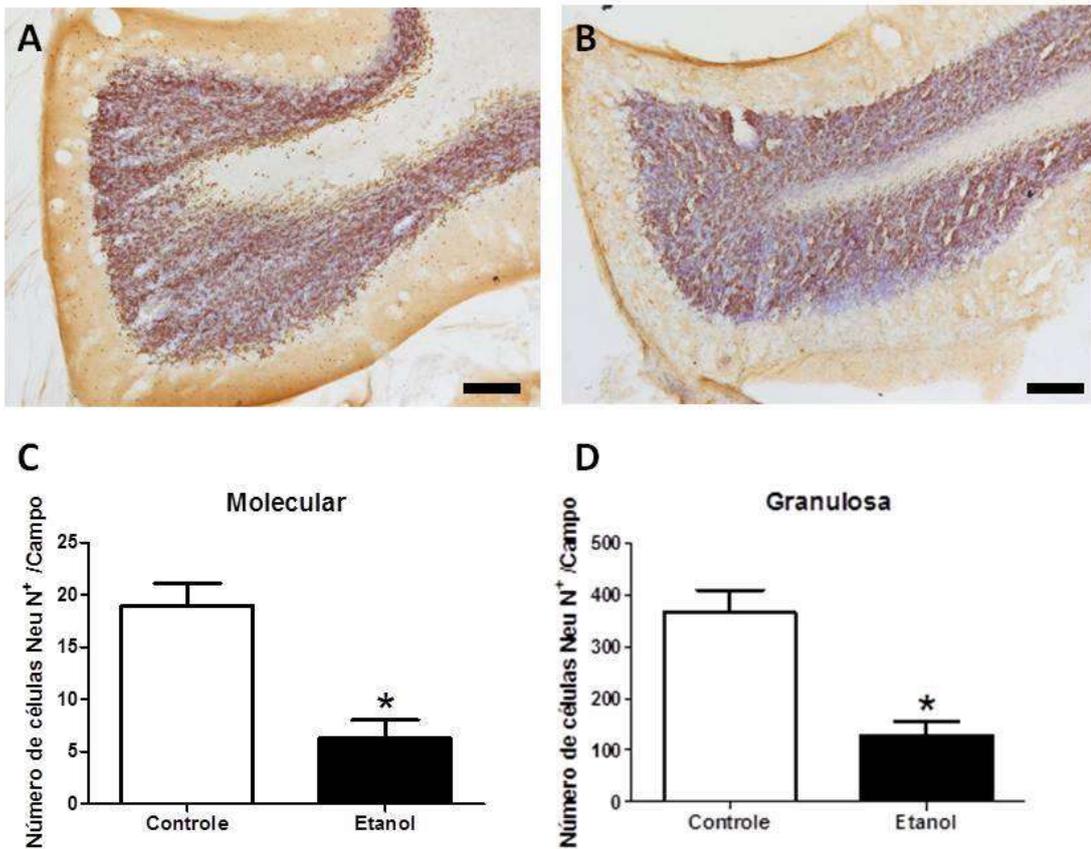


Figura 7 - Efeito da intoxicação do etanol sobre a análise das secções cerebelares marcadas por imunohistoquímica. Painel A: micrografia ilustrativa do grupo controle; Painel B: micrografia ilustrativa do grupo etanol. (*) nas fotomicrografias representa a camada molecular; (†) nas fotomicrografias representa a camada granular (escala de 50µm); Painel C: gráfico representativo da análise quantitativa do número de células por campo da camada molecular; Painel D: gráfico representativo da análise quantitativa do número de células por campo da camada granulosa. Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M de 4-5 animais por grupo. *p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo controle. Student-t test.

4.5. CONCENTRAÇÃO DE NITRITO

Os níveis de nitritos detectados nos cerebelos dos animais tratados não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes grupos (Figura 8).

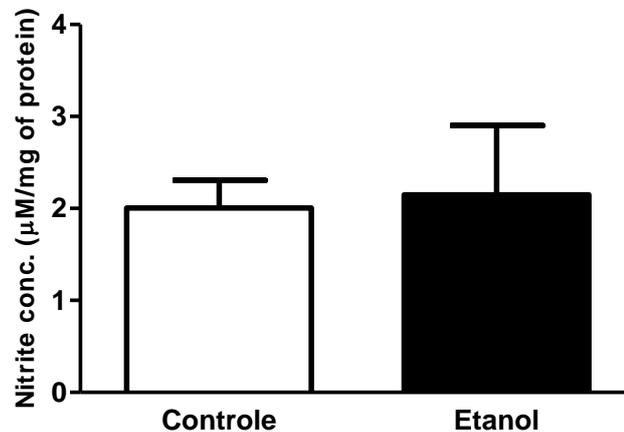


Figura 8 - Efeito da intoxicação crônica com etanol sobre a concentração de nitritos em tecido cerebelar. Os resultados estão expressos como a média \pm E.P.M de 5-6 animais por grupo. Student-t test.

4.6. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os dados dos níveis de peroxidação lipídica dos cerebelos não apresentaram variabilidade conseqüentemente não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos (Figura 9).

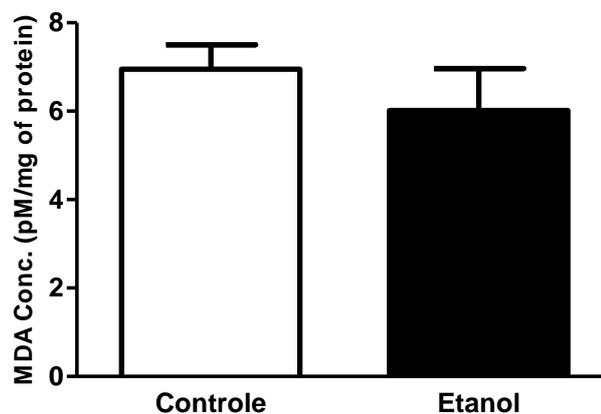


Figura 9 - Efeito da intoxicação do etanol sobre a peroxidação lipídica no tecido cerebelar. Os resultados estão expressos como a média \pm E.P.M de 5-6 animais por grupo. Student-t test.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram investigados os aspectos dimensionais e possíveis alterações na densidade das populações celulares e na bioquímica oxidativa em ratos expostos ao EtOH da adolescência à fase adulta. Nossos resultados demonstraram que este protocolo de administração não promove alteração da massa cerebelar, contudo induziu à diminuição das dimensões cerebelares, assim como promoveu o aumento na densidade de corpos celulares nas camadas do órgão, porém houve a redução da população de neurônios adultos.

Em 1977, Bauer-Moffett e Altman realizaram um estudo por intoxicação com álcool utilizando a via inalatória em ratos (239 mg/100 ml), onde observaram uma inibição do crescimento cerebelar após 21 dias de tratamento associada à redução da massa. No entanto, recentemente, Huang et al. (2012) em seu trabalho com intoxicação por EtOH por via intraperitoneal (VIP) em camundongos (3,75 g/kg) desde a pré-adolescência à fase adulta (do 25 à 225 dias de vida) avaliaram o crescimento corporal total, do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo em vários tempos de sobrevivência. Na pré-adolescência, os autores encontraram uma redução não somente na curva de crescimento corporal total, como também na curva de ganho de peso pelos animais machos, no entanto não encontraram alterações decorrentes da intoxicação por EtOH sobre a massa do cerebelo, assim como o observado em nossa investigação que teve como protocolo de tratamento a dose de 6,5 g/kg/dia dos 35 aos 90 dias de vida, o que confirma que o álcool em altas concentrações é não capaz de promover alterações na massa do órgão, independente da dose e via de administração.

Contraditoriamente, existem diversos relatos na literatura acerca das alterações hipovolumétricas na macroanatomia do cerebelo (BAUER-MOFFETT e ALTMAN, 1977; LINDBOE e LOBERG, 1988; TORVIK et al. 1982; DIENER et al. 1986;. HAUBEK e LEE, 1979; MELGAARD e AHLGREN, 1986; ANTUNEZ et al. 1998). Estudos de autópsia em humanos revelaram uma atrofia cerebelar em 27,6%, em um total de 713 avaliados (TORVIK et al. 1982) e 26,8 % de 604 indivíduos (LINDBOE E LOBERG, 1988), confirmando a relevância do álcool para o estabelecimento desta alteração em humanos.

Para avaliação destes efeitos em humanos, foram adotadas diferentes metodologias para a determinação das alterações cerebelares volumétricas

decorrentes do uso abusivo de álcool, tais como: tomografia computadorizada (TC) (DIENER et al. 1986; ANTUNEZ et al. 1998), ressonância magnética (RM) (ANTUNEZ et al. 1998; CHANRAUD et al. 2007) e achados histológicos (LINDBOE e LOBERG, 1988), revelando o aumento da preocupação com os efeitos do álcool sobre a anatomia do SNC.

Estudos sugerem que essas alterações não são específicas de seres humanos, dessa forma tem-se buscado estabelecer um modelo animal a fim de esclarecer como se desenvolve as alterações macroscópicas (massa e volume) (BAUER-MOFFETT e ALTMAN, 1977) e microscópicas e possível envolvimento das camadas celulares (LEE et al. 2008; JAATINEN e RINTALA, 2008). Este trabalho demonstrou que a intoxicação elevada pelo álcool na adolescência induz à atrofia cerebelar em roedores, tais como observado em estudos em humanos.

Neste estudo, foi observado que houve aumento na densidade celular das camadas molecular e granular dos animais expostos ao EtOH, porém não foi possível confirmar qual célula neural estava em proliferação, corroborando estudos anteriores observados por Dikranian et al. (2005). No entanto, a literatura ainda é contraditória na confirmação da proliferação celular induzida pelo consumo de EtOH. LEE et al. (2008) encontrou resultados contrários aos dados encontrados no presente estudo, que poderia ser justificado pela precocidade no período de exposição avaliado pelo autor (quinto dia de vida pós-natal). Neste período, o SNC ainda encontra-se em desenvolvimento e conseqüentemente o tecido poderia estar mais sensível às alterações metabólicas, uma vez que neste modelo animal o SNC só é considerado maduro quando atinge a idade de 35 dias de vida pós-natal (ALTMAN e BAYER, 1997). Atualmente, há um consenso de que as alterações ocasionadas pelo EtOH dependem de fatores tais como dose e frequência da exposição, assim como o período em que a administração/consumo ocorreu (Maier e West, 2001).

Sabe-se que o anticorpo NeuN é responsável pela marcação de neurônios pós mitóticos, ou seja, neurônios jovens (MULLEN et al, 1992; SILVA et al., 2012). No entanto, foi observado em nosso estudo que, após o tratamento crônico com EtOH (durante 55 dias), houve uma redução nesta população celular. Este resultado também foi observado em outras regiões do SNC como na amígdala, onde, após a administração do EtOH (10mg/kg a 20%) durante 14 dias (i.p.) detectou-se a redução de células NeuN positivas nesta região. Além disso, foi observado também

que na zona sub ventricular (região neurogênica), após a marcação por BrdU, o grupo EtOH mostrou visível redução no número de células BrdU+, o que sugere que esta droga foi capaz de intervir no processo neurogênico, com consequentemente redução das células NeuN+ (CHUANG et al., 2011).

Como citado anteriormente, o álcool atua sobre o SNC e clinicamente promove ataxia de postura e marcha (perda de coordenação dos movimentos musculares voluntários) (VICTOR et al. 1958; ANDERSEN, 2004; TIMMANN-BRAUN e DIENER, 2000), alteração dos movimentos oculares (MAURITZ et al. 1979; WOBBER et al. 1999), disdiacocinesia (dificuldade em realizar movimentos rápidos alternadamente), dismetria (desorientação espacial) e decomposição de movimentos (DECKER et al. 1959), alterações na fala, ocorrendo de modo lento e arrastado, variando em altura e intensidade (VICTOR et al.1958).

Esta droga pode promover alterações centrais em indivíduos expostos durante o processo de transição da fase juvenil/adolescência para a fase adulta. As mudanças no volume da substância cinzenta e branca durante este período parecem estar associadas com a produção excessiva de axônios e sinapses, assim como a “poda” deste processo de arborização neuronal (SOWELL et al., 2004; GUERRI e PASCUAL, 2010). Estes eventos seriam resultantes do crescimento da massa cinzenta e a formação de novas ligações, assim como estabelecimento de novas conexões sinápticas e eliminação de outras, resultante do desenvolvimento do SNC neste período (LENROOT e GIEDD, 2006; GUERRI e PASCUAL, 2010).

Sabe-se que o EtOH atua no organismo de uma maneira pró-oxidativa, gerando ROS. Na literatura, há registros de que a administração do álcool de forma subcrônica (4 semanas) influencia positivamente a taxa de peroxidação lipídica no cerebelo de ratos (CELEC et al. 2003). No entanto, quando Rouachi e colaboradores (1997) realizou seu estudo usando um período que excedeu a quarta semana de exposição ao neurotóxico, nenhuma alteração nos níveis de peroxidação lipídica foi encontrada, corroborando com os resultados obtidos neste estudo, onde foi adotado uma janela de intoxicação de 55 dias. Desta forma, sugere-se que a ampliação da janela de intoxicação permitiu ao organismo balancear as vias antioxidantes intracelulares envolvidas na oxidação do acetaldeído gerado pelo metabolismo do EtOH.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram que:

- Os animais submetidos à intoxicação ao álcool da adolescência à fase adulta apresentaram alterações no parâmetro tamanho do cerebelo, sem alterar a massa;
- A presença de EtOH no cerebelo de ratos aumentou a densidade e diminuiu quantidade de neurônios nas camadas molecular e granular, avaliados na coloração de violeta de cresila;
- O álcool induziu modificações nas camadas granular e molecular;
- Todas as alterações morfohistológicas não foram acompanhadas de alterações na bioquímica oxidativa.

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram a necessidade de estudos complementares que possam determinar qual classe de corpos celulares sofreu proliferação nas camadas molecular e granular e qual o mecanismo que resultou em redução do tamanho do cerebelo sem alterar a massa cerebelar. Deve-se investigar também, se nesta janela e intensidade de exposição à droga houve um possível mecanismo compensatório que justificassem as alterações encontradas, assim como as possíveis repercussões funcionais ocasionadas pelas alterações morfológicas encontradas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, B.B. Reduction of Purkinje cell volume in cerebellum of alcoholics. **Brain Research**. v. 1007, p. 10-18. 2004.
- APFEL, M.I.R.; ÉSBERAD, C.A.; RODRIGUES, F.K.P.; BAHAMAD, F.M.J.R.; SILLERO, R.O. Estudo estereológico das células de Purkinje cerebelares submetidas à intoxicação alcoólica em ratos Wistar. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v. 60, n. 2^a, p. 258-263, 2002.
- Associação Psiquiátrica Americana (APA). **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. 4. ed. – Revista (DSM-IV-TR). Porto Alegre: Artmed, [2000] 2002.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.A., PENHA-SILVA, N. Effects of ethanol on the neuronal migration in the brain neocortex formation. **Bioscience Journal**. v. 21, n. 1, p. 151-157, jan/april, 2005.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.A.; CORRÊA, N.C.R.; MORAIS, J.O.R.; PENHA-SILVA, N. Postnatal effects of ethanol on neocortical neurogenesis in Wistar rats. **Neurociências**. v. 2, n. 6, p. 1-7, nov/dez, 2005.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.A.; MORAIS, J.O.R.; FERREIRA, N.R.; PENHA-SILVA, N. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal cortex in Wistar rats. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**. v. 21, n. 2, p. 97-101, april/june, 2004.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.A.; RODRIGUES, H.G.; NERES, A.C.; FONSECA, L.C.; PENHA-SILVA, N. Imunoistoquímica do bulbo olfatório de ratos Wistar, submetidos à exposição aguda com etanol. **Bioscience Journal**. v. 22, n. 1, april, 2006.
- BAKER, K.G.; HARDING, A.J.; HALLIDAY, G.M.; KRIL, J.J.; HAPER, C.G. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. **Neuroscience**. v. 91, p. 429-438. 1999.
- BERTRAND, J.; FLOYD, L.L.; WEBER, M.K. FETAL ALCOHOL SYNDROME PREVENTION TEAM. Division of Birth Defects and Developmental Disabilities, National and Prevention (CDC). **Guidelines for identifying and referring persons with fetal alcohol syndrome**. MMWR Recomm rep. 2005 Oct 28;54(RR-11):1-14. Erratum in: MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2006 May 26;55(20):568.
- BOYCE-RUSTAY, J.M.; WIEDHOLZ, L.M.; MILLSTEIN, R.A.; CARROLL, J.; MURPHY, D.L.; DAWS, L.C.; BROOKS, P.J. Brain atrophy and neuronal loss in alcoholism: a role for DNA damage. **Neurochemistry International**. v. 37, p. 403-412, 2000.
- BRUST, J.C.M. The Neurotoxicity os Ethanol and Related Alcohols. **Clinical Neurotoxicology: syndromes, substances, environments**. 1 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p. 329-334, 2009.
- BUGALHO, P.; CORREA, B.; VIANA-BAPTISTA, M.; **Acta Med Port**. v. 19, p. 257-268. 2006.

C. M. R. S. FERNANDES. A EVOLUÇÃO DO CEREBELO. DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM MEDICINA. PORTO. 1988.

CARLINI, E.A.; GALDURÓZ, J.C. & NOTO, L. **I Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de drogas Psicotrópicas no Brasil – 2001**. São Paulo. CEBRID. 2001.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Alcohol use among pregnant and nonpregnant women of childbearing age – United States, 1991 – 2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009 May 22,58(19):529-32.

CLOWER DM, WEST RA, LYNCH JC, STRICK PL: The inferior parietal lobule is the target of output from the superior colliculus, hippocampus, and cerebellum. **J Neurosci**; 21(16):6283-91. 2001.

Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo. **Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento**. 2 ed. São Paulo; 2003.

COSTA, L.G; GUIZZETTI M. Inhibition of Muscarinic Receptor – Induced Proliferation of Astroglial Cells by Ethanol: Mechanism and Implications for the Fetal Alcohol Syndrome. **Neurotoxicology**. 102: 1-7, 2002.

DECKER, J.B., WELLS, C.E., MCDOWELL, F. Cerebellar dysfunction associated with chronic alcoholism. **Neurology** 9. 1959.

Diehl, A., Cordeiro, D.C., Laranjeira, R. Dependência química: prevenção, tratamento e políticas públicas. Porto Alegre: Artmed, 2011, cap.6, pg.67-80.

ECCLES, J.C. Neurogenesis and Morphogenesis in the Cerebellar Cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. V. 66, n. 2, p. 294-301, jun, 1970.

Faden V Epidemiology. Em Galanter M (ed.) Recent Developments in Alcoholism, vol. 17 – Alcohol Problems in Adolescents and Young Adults. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2005.

FERREIRA MP, LEITE MC, HOCHGRAF PB, ZILBERMAN ML. Dependências Químicas. **Condutas em Psiquiatria**. São Paulo: Ed. Lemos; p. 290-318. 1999.

FIUZA, T.S.; MORAIS, J.O.R. Immunohistochemical evaluation of the postnatal effects of acute exposure to ethanol on the kinetics of granule-cell migration in rat cerebellum Brazilian Journal of Morphological Sciences. V. 22, n.1, p. 19-24. 2005.

Fortes J R A. Conceito e definição do alcoolismo. **Alcoolismo: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Ed. Sarvier; p. 11-25. 1991.

GALASSI, A. D., ALVARENGA, P. G., ANDRADE, A. G., 7 COUTTOLLENC, B.F. Custos dos problemas causados pelo abuso do álcool. **Revista de Psiquiatria Clínica**. 35(supl. 1), 25-30. 2008.

GALDURÓZ JCF, NOTO AR, FONSECA AM E CARLINI EA V Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do ensino Fundamental e Médio da Rede Pública de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras – 2005. São Paulo, CEBRID. 2005.

GARBUTT JC, WEST SC, CAREY TS, LOHR KN, CREWS FT. Pharmacological treatment of alcohol dependence. A review of evidence. **Jama**; 281(14): 1318-25. 1999.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D.J.; FREIRE, M. A.; PECANCO-DINIZ, C. W. e PERRY, V. H. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal Cord injury. **Exp Neurol**, v. 190, n. 2, p. 456-467, 2004.

GREEN, J.T. The effects of ethanol on the developing cerebellum and eyeblink classical conditioning. **Cerebellum**. V. 3, n. 3, p. 178-187, sep, 2004.

HABIB C, SANTORO J, KREMER P, TOUMBOUROU J, LESLIE E, WILLIAMS J, The importance of family management, closeness with father and family structure in early adolescent alcohol use. **Addiction**. Oct;105(10):1750-8. 2010.

HARD M. L.; ABDOLEL M.; ROBINSON B. H.; KOREN G. Gene-expression analysis after alcohol exposure in the developing mouse. **Journal of laboratory and Clinical Medicine**. V. 145, n.1, p. 47-54, 2005.

HIRANO, T.; KUBO, Y.; WU M.M. Cerebellar granule cells in culture: Monosynaptic connections with Purkinje cells and ionic currents. **Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America**. V. 83, n. 13, p. 4957-4061, jul, 1986.

HOLMES, A Ethanol-related behaviors in serotonin transporter knockout mice. **Alcoholism: Clinical and experimental Research**. V.30, p. 1957-65, 2006.

HOSP, JA.; LUFT, A.R. Cortical plasticity during motor learning and recovery after ischemic stroke. **Neural Plast**. 2011.

HUANG C., JENNIFER A. T.; RICHARD L. B., TAMAS K., JIE C., AND ROSA H. A., Mouse model for adolescent alcohol abuse: Stunted growth and Effects in brain **Alcohol Clin Exp Res**, v. 36, No 10, 2012: pp1728-1737.

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: 20 abr 2013.

ITO, D.; IMAI, Y.; OHSAWA, K.; FUKUUCHI, Y. e KOHSAKA, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Brain Res**, v. 57, n. 1, p. 1-9, 1998.

JONES KL. The effects of alcohol on fetal development. Birth Defects **Res C Embryo Today**. Mar;93(1):3-11. 2011.

KAPLAN HI, SADOCK BJ. **Compêndio de Psiquiatria Dinâmica**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1984.

KODITUWAKKU PW. Neurocognitive profile in children with fetal alcohol spectrum disorders. **Dev Disabil Res Rev.** 15(3):218-24. 2009.

KRIL, J.J. Neurophatology of thiamine deficiency disorders. **Metabolic Brain Disease** 11, 9-17. 1996.

KRYSTOSEK, A.; SEEDS, N.W. Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 78, n. 12, p. 7810-7814, dec, 1981.

LANGOHR, H.D., PETRUCH, F., SCHROTH, G., Vitamin B1, B2 and B6 deficiency in neurological disorders. **Journal of Neurology** v. 225, p,95-108. 1981.

LARANJEIRA R, HINKLY D. Evaluation of alcohol outlet density and its relation with violence. **Rev Saúde Pública.**; 36(4):455-61. 2002.

LARANJEIRA R., DUARTE P. C. A. V. I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. Secretaria Nacional Antidrogas, Brasília. 2007.

Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília (DF), 1990 jul16: Seção 1.

LIEBER CS. The metabolism of alcohol. **Scientific American** v. 234, p.25-33, 1976.

LINDBOE, C.F., LOBERG, E.M., The frequency of brain lesions in alcoholics. Comparison between the 5-year periods 1975-1979 and 1983-1987. **Journal of the neurological Sciences** v.75, p 88-107. 1988.

MAGGS J.L., SCHULENBERG J.E., Initiation and Course of Alcohol Consumption among Adolescents and young Adults. Em Galanter M (ed.). Recent Developments in Alcoholis, vol. 17 – Alcohol Problems in Adolescents an Young Adults. Kluwer Academic/Planum Publishers. 2005.

MAIR SE, WEST JR. regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. **Alcohol.**; 23: 49-57. 2001.

MARGRET, C. P.; LI CHENG, X.; ELBERGER, A. J.; CHAPPEL, T. D.; WATERS, R.S. Prenatal alcohol exposure alters the size, but not pattern, of the whisker representation in neonatal rat barrel cortex. **Experimental Brain Research**, v.65, p. 167-178, 2005.

MARTIN, P.R., SINGLETON, C.A., HILLER-STURMHOFEL, S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Research & Health.** v.27, p.134-142. 2003.

MATTSON SN, CROCKER N, NGUYEN TT. Fetal alcohol spectrum disorders: neuropsychological and behavioral features. **Neuropsychol Rev.** jun;21(2):81-101. Apr 19. 2011.

MELLION M, GILCHRIST JM, DE LA MONTE S. Alcohol-related peripheral neuropathy: nutritional, toxic, or both **Muscle Nerve.** Mar,43(3):309-16. 2011.

MESQUITA EM, NUNES AJ, COHEN C. Avaliação das atitudes dos estudantes de medicina frente ao abuso de drogas por colegas do meio acadêmico. **Ver Psiquiatr Clin.**; 35(supl 1):8-12. 2008.

MEYER, O. A., TILSEON, H. A., BYRD, W.C., & RILEY, M. TA. Method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats mice. **Neurobehavioral Toxicology** v.3, p. 233-236. 1979.

MIDDLETON FA, STRICK PL: Anatomical evidence for cerebellar and basal ganglia involvement in higher cognitive function. **Science**. V.256, p. 458-451. 1994.

MILLER, M. W. Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v.19, p. 1500-1509, 1995.

MIWA, H., NAKANISHI, I., KODAMA, R., KONDO, T., Cerebellar atrophy in a patient with anorexia nervosa. **International Journal of Eating Disorders** v. 36. P. 238-241. 2004.

NASCIMENTO, E. W. DO; MORAES, E. DE O.; Avaliação da função motora de ratos wistar submetidos a ingestão de álcool. FAPI – Faculdade de Pindamonhangaba, 37f. Monografia. 2009.

NORMAN AL, CROCKER N, MATTSON SN, RILEY EP. Neuroimaging and fetal alcohol spectrum disorders. **Dev Disabil Res Rev.**;15(3):209-17. 2009.

O'HEARN, E., MOLLIVER, M.E., Organizational principles and microcircuitry of the cerebellum. **International Review of Psychiatry**. v.13. p. 232-246. 2001.

OGA, S., Fundamentos de Toxicologia 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

O'Leary-Moore SK, Parnell SE, Lipinski RJ, Sulik KK. Magnetic resonance-based imaging in animal models of fetal alcohol spectrum disorder. **Neuropsychol Rev**. jun;21(2):167-85. Mar 29. 2011.

OLIVEIRA M.L.F., ARNAUTS I.; Intoxicação alcoólica em crianças e adolescentes: dados de um centro de assistência toxicológica. **Esc. Anna Nery** (impr.) jan-mar; 15(1):83-89. 2011.

PEADON E., RHYS-JONES B., BOWER C., ELLIOTT E.J.; Systematic review of interventions for children with Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **BMC Pediatr**. May25;9:35. 2009.

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

PHILLIPS, S.C., HARPER, C.G., KRIL, J., A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients. **Brain** v.110. p. 301-314. 1987.

PINSKY, I; BESSA MA. Adolescentes e drogas. Editora Contexto. São Paulo. 2004.

POLONI, M., MAZZARELLO, P., LAFORENZA, U., CARAMELLA, C., PATRINI, C.; Thiamine contents of cerebrospinal fluid, plasma and erythrocytes in cerebellar ataxia. **European Neurology** v.32 p.154-158. 1992.

PRANT, G.; ADAN, A.; PÉREZ-PÁMIAS, M.; SÁNCHEZ-TURET, M. Neurocognitive effects of alcohol hangover. **Addictive Behaviors**. V.33, p.15-23, 2008.

REHM, J., SEMPOS, C.T. & TREVISAN, M. Average volume of alcohol consumption patterns of drinking and risk coronary heart disease – A review. **Journal of Cardiovascular Risk** 10(1), 15-20. 2003.

RILEY EP, INFANTE MA, WARREN KR, Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. **Neuropsychol Rev**. Jun;21(2):73-80. 2011.

ROMANO M; DUAILIBI S.; PINSKY I., LARANJEIRA R. Pesquisa de compra de bebidas alcoólicas por adolescentes em duas cidades do estado de São Paulo. **Rev. Saúde Pública** [online]. 2007, vol.41, n.4, PP. 495-501. ISSN 0034-8910. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102007000400001>. Acesso em 15 de abril 2013.

ROPPER, A.H., BROWN, R.H. Principles of Neurology, eighth Ed. McGraw-Hill, New York. 2005.

ROSSOW I, ROMELSJÖ A. The extent of the 'prevention paradox' in alcohol problems as a function of population drinking patterns. **Addiction** Jan;101(1):84-90. 2006.

SASAKI, H.; MATSUZAKI, T.; NAKAGAWA, H. A.; SENKIZAWA, K.; MARUYAMA, Y. Cognitive function in rats with alcohol ingestion. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. v.52, n.4, p.845-8, 1995.

SCHMAHMANN JD, PANDYA DN: Course of fibers pathways to pons from parasensory association areas in the rhesus monkey. **J Comp Neurol** v.326(2) p.159-79. 1992.

SCHMAHMANN JD, PANDYA DN: Prefrontal cortex projections to the basilar pons: implications for the cerebellar contribution to higher function. **Neuroscience Lett** 199(3):175-8. 1995.

SCHUTCKIT, M. A. Alcohol y Alcoholismo. In: KASPER D. L.; FAUCI A.S.; LONGO D.L. Harrison Principios de Medicina Interna. 16º edición. México: Mac Graw Hill, 2005.

SCIVOLETTO S, ANDRADE A G. Tratamento farmacológico das drogas dependências. **Drogas: atualização em prevenção e tratamento**. São Paulo: Lemos 1993; p.107-32

SCIVOLETTO S HENRIQUE JÚNIOR SG, ANDRADE AG. A progressão do consumo de drogas entre adolescentes que procuram tratamento. **J Bras Psiqu**; 45(4): 210-17. 1996.

Snell RS. **Clinical Neuroanatomy**, Cap.6, 7ªed. 2010. Lippincott Williams & Wilkins. Timmann-Braun, D., Diener, H.C., 2000. Alcoholic cerebellar degeneration (including ataxias

that are due to other toxic causes). In: Klockgether, T. (ed.), Handbook of Ataxia Disorders. Marcel Dekker Inc., New York, pp.571-605.

TWERSKI, M.D. Como precede com o álcool. 2ªed. São Paulo: Paulinas/ Reindal, 1987.

VASCONCELOS, S. M. M. Efeitos Comportamentais, Neuroquímicos e Bioquímicos do etanol em roedores na presença e na ausência de antagonistas dopaminérgicos, glutamatérgicos e opióide. 2001. 245 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE-Brasil.

VASCONCELOS, S. M. M.; CAVALCANTE, R. A.; AGUILAR, L. M.; SOUSA, F. C. F.; FONTELES, M. M. F.; VIANA, G. S. B. Effects of chronic ethanol treatment on monoamine levels in rat hippocampus and striatum. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.37, n.12, p.1839-1846, 2004.

Vendrame A, Pinsky I. [Inefficacy of self-regulation of alcohol advertisements: a systematic review of the literature.]. **Rev Bras Psiquiatr**. May 13. 2011.

VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio da Rede Pública e Privada nas Capitais Brasileiras (2010) CEBRID/SENAD.

VILENSKY JA, VAN HOESEN GW: Corticopontine projections from the cingulate cortex in the rhesus monkey. **Brain Res**;205:391-395. 1981.

VOOGD, J. The human cerebellum. **Journal of Chemical Neuroanatomy**. v. 26, n. 4, p. 243-252, dec, 2003.

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

WANG, Y.; FREUND, R.K.; PALMER, M.R. Potentiation of ethanol effects in cerebellum by activation of endogenous noradrenergic inputs. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v. 288, n. 1, p. 211-220, jan, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Global status report on alcohol and health. ISBN 978 92 4 156415 1. 2011.

XAVIER S., FERREIRA B. Aspectos Neuropsiquiátricos do cerebelo. **PsiLogos**. Vol. 10 Nº 1 pp 34-42. Junho 2012.

ZHANG, L., WELTE, J. & WIECZOREK, W. The role of aggression related alcohol expectancies in explaining the link between alcohol and violent behavior. **Substance Use and Misuse**, 37(4), 457-471. 2002.

ANEXOS



comitê de ética em pesquisa
com animais de experimentação



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