



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

**MINOCICLINA ATENUA OS PREJUÍZOS MOTORES EM
RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA FOCAL NO CÓRTEX
MOTOR E EXPOSTOS CRONICAMENTE AO ETANOL DA
ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA**

Gedeão Batista de Oliveira

Belém-PA
2012

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

**MINOCICLINA ATENUA OS PREJUÍZOS MOTORES EM
RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA FOCAL NO CÓRTEX
MOTOR E EXPOSTOS CRONICAMENTE AO ETANOL DA
ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA**

Autor: Gedeão Batista de Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. 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

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Oliveira, Gedeão Batista.

Minociclina atenua os prejuízos motores em ratos submetidos à isquemia focal no córtex motor e expostos cronicamente ao etanol da adolescência à fase adulta / Gedeão Batista de Oliveira; orientadora, Cristiane do Socorro Ferraz Maia. — 2012

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Belém, 2012.

1. Etanol. 2. Córtex motor. 3. Isquemia encefálica. 4. Minociclina. I. Título.

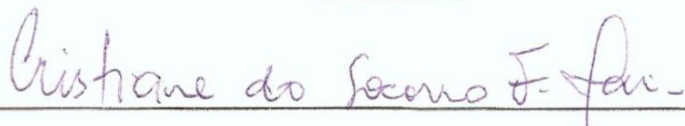
FOLHA DE APROVAÇÃO

Gedeão Batista de Oliveira

Minociclina atenua os prejuízos motores em ratos submetidos à isquemia focal no córtex motor e expostos cronicamente ao etanol da adolescência à fase adulta.

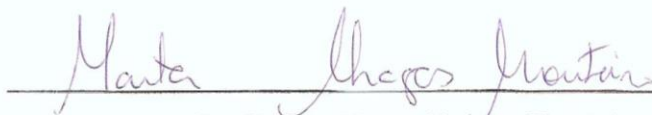
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, para a obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora



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

Banca examinadora:



Prof^a. Dra. Marta Chagas Monteiro (UFPA)



Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger (UFSC)

Aprovado em: 30 de agosto de 2012.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado às duas pessoas que, com dificuldades e esforços inestimáveis, construíram a oportunidade preciosa que eu só fiz segurar, que me presentearam com o objeto mais valioso e raro que eu poderia adquirir: a Educação. Todos os méritos por cada etapa ou conquista alcançada por mim pertencem também a Dimas Martins de Oliveira e Nelcina Batista de Oliveira, meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que foi fonte de inspiração durante a caminhada e conforto nas horas difíceis, sem ele nada seria possível.

À orientadora, Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia, serei sempre grato por ter acreditado em mim! Pela confiança que me depositou para a realização deste trabalho. Por seu jeito de conduzir a orientação permitindo que eu adquirisse maturidade científica. Por me aceitar e acolher em seu grupo de pesquisa. Pelo incentivo constante para realização deste trabalho.

Aos professores Msc. Rafael Lima, Dr. Wallace Leal, Dra. Marta Chagas pelo grande suporte científico, pelas idéias que sempre foram muito bem vindas. Sem o apoio de vocês esse momento não seria possível.

Aos colegas: Josiane Batista, Sabrina Carvalho, Rui Guilherme, Ewerton Luiz, Joni Tetsuo, Luana Fernandes, Cristina Pereira, Msc. Enéas Fontes. Pessoas fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigado pela dedicação nas inúmeras manhãs ou noites, mesmo aos finais de semana e feriados. Esse trabalho também é mérito de vocês. A todos os colegas do Laboratório de Farmacodinâmica obrigado pela “interação científica”.

Aos meus grandes e velhos amigos que sempre me incentivaram e entenderam minhas ausências quando tinha que “sacrificar” feriados e finais de semana. Tenho sorte de poder contar com tamanha cumplicidade, entendimento, carinho, além de toda diversão proporcionada.

Aos meus pais, Dimas Oliveira e Nelcina Oliveira, pelo apoio, amor, dedicação e incentivo ao longo da minha vida. Por terem me fornecido toda a base necessária para que eu conseguisse lutar por meus objetivos. Por sempre acreditarem e confiarem em mim, qualquer que fosse minha decisão. Obrigado por tudo que tenho em minha vida. Amo vocês mais do que podem imaginar!

A Eliete Oliveira e Jardel Oliveira, vocês são peças fundamentais na construção deste caminho que escolhi. Cada um de vocês, da sua maneira, dando um conselho, preocupando, muitas vezes sendo financiadores, e o mais importante: o INCENTIVO. Não imaginam o quanto isto foi importante para mim. Obrigado por serem meus irmãos!

As agências financiadoras CAPES e FAPESPA.

"Quem tenta ajudar uma borboleta a sair do casulo a mata.
Quem tenta ajudar um broto a sair da semente o destrói.
Há certas coisas que não podem ser ajudadas. Tem que
acontecer de dentro para fora."

Rubem Alves

RESUMO

MINOCICLINA ATENUA OS PREJUÍZOS MOTORES EM RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA FOCAL NO CÓRTEX MOTOR E EXPOSTOS CRONICAMENTE AO ETANOL DA ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o consumo de álcool no mundo tornou-se um problema de saúde pública. Neste contexto, o Brasil figura na 63ª posição no mundo em consumo de álcool *per capita* para pessoas com 15 anos ou mais de idade. Além de seus efeitos sócio-econômicos, o etanol constitui um importante fator de risco na ocorrência de isquemias cerebrais. O consumo exacerbado desta droga colabora para o mau prognóstico, assim como para o possível tratamento de morbidades relacionadas ao acidente vascular cerebral. O objetivo deste estudo foi avaliar alterações neuromotoras após bloqueio da ativação micrógliar com minociclina em ratos submetidos à isquemia focal no córtex motor, quando tratadas cronicamente com etanol da adolescência a fase adulta. Ratos receberam durante 55 dias, por gavagem, etanol (6,5 g/kg/dia, 22,5 p/v). No término destes 55 dias os animais foram submetidos à microinjeções do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (40 pmol), para indução de lesão isquêmica focal córtex motor. Os animais isquemiados foram tratados com minociclina recebendo duas doses diárias de 50 mg/kg nos primeiros dois dias, e mais cinco aplicações diárias únicas de 25 mg/kg, por via intraperitoneal, até o sétimo dia pós-indução isquêmica. Os testes comportamentais realizados foram campo aberto, plano inclinado e rota-rod. Os resultados demonstraram que os animais isquemiados e os expostos ao etanol e isquemiados apresentaram déficits motores em todos os testes comportamentais. Entretanto, o tratamento com minociclina foi capaz de reverter-los, possibilitando melhor desempenho em todos os testes aplicados. Os resultados sugerem que a minociclina foi capaz de reverter os danos motores ocasionados pelo acidente vascular cerebral, mesmo em presença do etanol. O exato mecanismo envolvido neste processo necessita ser investigado em pesquisas futuras.

Palavras-chave: etanol, córtex motor, isquemia cerebral, minociclina.

ABSTRACT

MINOCYCLINE ATTENUATES THE MOTORS INJURY IN RATS SUBMITTED TO FOCAL ISCHEMIA IN MOTOR CORTEX AND EXPOSED TO ETHANOL CHRONICALLY THE ADOLESCENCE TO ADULTHOOD

According to World Health Organization, alcohol consumption in the world has become a public health problem. In this context, Brazil is at 63th position in the world in *per capita* alcohol consumption for people aged 15 or older. In addition to its socio-economic effects, ethanol is an important risk factor in the occurrence of cerebral ischemia. Exacerbated consumption of this drug contributes to the poor prognosis, as well as possible treatment for health problems related to stroke. The objective of this study was to evaluate neuromotor changes after blocking microglial activation with minocycline in rats subjected to focal ischemia in the motor cortex, when treated chronically with ethanol from adolescence to adulthood. Rats were given for 55 days by gavage ethanol (6.5 g/kg/dia, 22.5 w/v). At the end of 55 days the animals were microinjected with the vasoconstrictor peptide endothelin-1 (40 pmol) for induction of focal ischemic lesion. The ischemic animals were treated with minocycline receiving two daily doses of 50 mg/kg in the first two days, and five daily applications of single 25mg/kg, intraperitoneally, by the seventh day post-ischemic induction. Behavioral tests consisted of open field, inclined plane and rota-rod. The results showed that the animals were exposed to ethanol showed motor deficits in all behavioral tests. However, treatment with minocycline was able to reverse them, enabling better performance on all tests. The results suggest that minocycline was able to reverse damage caused by motors stroke, even in the presence of ethanol. The exact mechanism involved in this process need to be investigated in future research.

Keywords: ethanol, motor cortex, cerebral ischemia, minocycline.

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figura 1	Consumo <i>per capita</i> de EtOH puro em litros.....	18
Figura 2	Interação do EtOH com o receptor NMDA.....	21
Figura 3	EtOH e neurotransmissão GABAérgica.....	23
Figura 4	Modelo simplificado da circuitaria dos gânglios da base.....	28
Figura 5	Tipos de AVC: isquêmico ou hemorrágico.....	30
Figura 6	Esquema de processo isquêmico.....	31
Figura 7	Eventos moleculares no tecido afetado por AVCi.....	34
Figura 8	Estrutura química da Minociclina.....	38
Figura 9	Esquema do tratamento experimental com EtOH.....	49
Figura 10	Aparelho estereotáxico.....	50
Figura 11	Animal posicionado no aparelho estereotáxico.....	51
Figura 12	Esquema do tratamento farmacológico com MNC.....	52
Figura 13	Figura do campo aberto.....	54
Figura 14	Figura do plano inclinado.....	56
Figura 15	Figura do rota-rod.....	57
Figura 16	Delineamento experimental do estudo.....	58
Figura 17	Efeitos do tratamento com MNC sobre os prejuízos na locomoção espontânea avaliados no teste do campo aberto.....	60
Figura 18	Efeitos do tratamento com MNC sobre os prejuízos no equilíbrio e força muscular avaliados no teste do plano inclinado.....	62
Figura 19	Efeitos do tratamento com MNC sobre os prejuízos na aprendizagem motora avaliados no teste do rota-rod.....	63
Figura 20	Efeitos do tratamento com MNC sobre os prejuízos na coordenação motora e equilíbrio, teste 1.....	64
Figura 21	Efeitos do tratamento com MNC sobre os prejuízos na coordenação motora e equilíbrio, teste 2 e 3	65
Quadro 1	Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo..	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl	Microlitro
5-HT ₃	Receptor de serotonina subtipo 3
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVCi	Acidente vascular cerebral isquêmico
BHE	Barreira hematoencefálica
Ca^{2+}	Íon cálcio
CEBRID	Centro brasileiro de informação sobre drogas psicotrópicas
CID	Classificação Internacional das Doenças
COX-2	Ciclooxigenase 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
e.p.m	Erro padrão da média
ERN	Espécies reativa de nitrogênio
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
ET-1	Peptídeo vasoconstritor endotelina-1
EtOH	Etanol
Fas-L	Ligando Faz
FasR	Receptor Faz
GABA _A	Ácido gama-aminobutírico A
Glu	Glutamato
GlyR	Receptor de glicina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ O _{dest.}	Água destilada
i.p	Via intraperitoneal
IF- γ	Interferon gama
iGluR	Receptor ionotrópicos de glutamato
IL	Interleucina

iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K ⁺	Íon potássio
LAFICO	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento
LNNE	Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental
MAP	Proteína associada ao microtúbulo
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
min	Minuto
MMP	Metaloproteinase de matriz
MNC	Minociclina
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
Na ⁺	Íon sódio
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NF	Neurofilamento
NICE	<i>National Institute for Health and Clinical Excellence</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO [•]	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Superóxido
OH [•]	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OR	<i>Odds Ratio</i>
PKC	Proteína quinase C
pmol	Picomol
s	Segundo
SDA	Síndrome de dependência do álcool
SNC	Sistema nervoso central
SSI	Solução salina isotônica estéril
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
tPA	Ativador do plasminogênio tecidual
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Álcool e Alcoolismo: Considerações Gerais.....	15
1.2 Mecanismo de Ação do Etanol.....	20
1.3 Acidente Vascular Cerebral.....	24
1.3.1 ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS.....	24
1.3.2 AVC e CONTROLE MOTOR.....	26
1.3.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS.....	29
1.3.3.1 Eventos Envolvidos na Morte Celular.....	32
1.3.3.2 Neuroinflamação e AVC.....	35
1.4 AVC e Terapêutica.....	36
1.4.1 MINOCICLINA E A POSSIBILIDADE TERAPÊUTICA.....	38
1.5 EtOH e AVC.....	42
II OBJETIVOS.....	44
2.1 Objetivo Geral.....	45
2.2 Objetivos Específicos.....	45
III METODOLOGIA.....	46
3.1 Animais e Grupos Experimentais.....	47
3.2 Tratamento com EtOH.....	48
3.3 Indução de Isquemia Focal Experimental.....	49
3.4 Tratamento com minociclina.....	52
3.5 Testes Comportamentais.....	53

3.5.1 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	53
3.5.2 TESTE DO PLANO INCLINADO.....	55
3.5.3 TESTE DO ROTA-ROD.....	56
3.6 Análise Estatística.....	58
IV RESULTADOS.....	59
4.1 Campo Aberto.....	60
4.2 Plano Inclinado.....	61
4.3 Rota-Rod.....	62
V DISCUSSÃO.....	66
VI CONCLUSÃO.....	73
VII REFERÊNCIAS.....	75
VIII ANEXOS.....	103

I INTRODUÇÃO

1.1 Álcool e Alcoolismo: Considerações Gerais

O consumo de substâncias psicoativas constitui um dos fenômenos mais frequentes na população mundial, dentre estas, o etanol (EtOH) se destaca por ser a mais utilizada mundialmente, fato correlacionado a sua grande aceitabilidade pela maioria das sociedades organizadas (GRIFFITH, 1998; ELLIOTT e BOWER, 2008; KHALSA et al. 2008; SANCHIS et al. 2007; UHART e WAND, 2009).

O EtOH é considerado a droga mais danosa a sociedade, haja vista que seu uso causa transtornos sociais, familiares, econômicos, legais, além de representar um problema de saúde pública de grande relevância (MENDENHALL et al. 1980; FORTES, 1991; ROUQUAYROL, 1993; BATES, 1993; NASCIMENTO e JUSTO, 2000). Desta forma, faz-se necessário à construção de políticas públicas de saúde que abordem de maneira eficaz temas como a prevenção, tratamento e educação, focados na problemática decorrentes da dependência de álcool (MACHADO e MIRANDA, 2007).

A dependência a esta droga é favorecida por alguns de seus efeitos psicoativos, como a redução da ansiedade, a euforia, ações anéstesicas e alívio do estresse. A importância social do EtOH em cerimônias religiosas, rituais de iniciação e momentos comemorativos; a sua legalização na maioria das culturas; e a interação destes fatores com características psicológicas e biológicas do indivíduo podem torná-lo mais propenso ao alcoolismo (BORDIN; FIGLIE; LARANJEIRA, 2004).

A concepção do alcoolismo quanto doença foi incorporado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1967, à Classificação Internacional das Doenças (CID-8), a partir da 8ª Conferência Mundial de Saúde. Na CID-8, os problemas relacionados ao EtOH foram inseridos em uma ampla categoria de transtornos de personalidade e de neuroses. A dependência de álcool foi categorizada pelo uso compulsivo de bebidas alcoólicas e pela manifestação de sintomas de abstinência após a cessação do uso de EtOH. Essa classificação também foi seguida pela segunda edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM II) (COIMBRA et al. 2005).

Edwards e Gross, em 1970, ampliaram os critérios determinantes dessa disfunção e propuseram o conceito de Síndrome de dependência do álcool (SDA),

com isso mudou-se o foco das questões relativas apenas ao psiquismo, incluindo assim, os efeitos físicos decorrentes do uso crônico de EtOH (GIGLIOTTI e BESSA, 2009).

A OMS (1993) passou integrar a SDA como elemento básico para o diagnóstico do alcoolismo, e desde então é compreendida como um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após o consumo repetitivo do EtOH, tipicamente associado ao forte desejo de utilizar a droga, o que dificulta o controle, levando o indivíduo a usá-la persistentemente, apesar das suas consequências graves, e a dar maior prioridade ao uso da droga em detrimento de outras atividades e obrigações, aumentando assim a tolerância à droga.

Este quadro contribui para uma multiplicidade de complicações médicas, incluindo danos aos órgãos e funções imunológicas. Apesar da maioria dos órgãos serem afetados pela intoxicação por EtOH, os danos mais notáveis são no fígado, pâncreas e sistema nervoso central (SNC) (NICCOLS, 2007). Geralmente humanos alcoolistas apresentam significativa perda de volume das estruturas cerebrais corticais e subcorticais (CREWS e NIXON, 2009). Imagens destes indivíduos, *in vivo* e *post mortem* evidenciaram morfologia anormal do cérebro, bem como redução do volume da substância cinzenta e branca (KUBOTA et al. 2001; SULLIVAN e PFEFFERBAUM, 2005).

O consumo desta droga se torna mais grave quando se inicia na adolescência, pois esta fase compreende um período de maturação entre a infância e a idade adulta, caracterizada por alterações hormonais que levam a maturação sexual, secreção de hormônios relacionados ao estresse e crescimento (VARLINSKAYA e SPEAR, 2004; DOREMUS-FITZWATER et al. 2007; WITT, 2007; SPEAR e VARLINSKAYA, 2010). Estas alterações também são observadas no SNC, o qual passa por mudanças que vão desde transformações moleculares (WILLIAMS et al. 1993) até alterações no volume absoluto do córtex pré-frontal (JERNIGAN et al. 1991). O cérebro adolescente apresenta maior suscetibilidade para lesão cerebral e deficiência cognitiva, induzida por EtOH do que o cérebro adulto (CREWS, 2000; WHITE e SWARTZWELDER, 2004; SLAWECKI et al. 2004).

Por ser a adolescência um período de modificações estruturais e fisiológicas, a exposição excessiva a esta droga tem impacto negativo na qualidade de vida destes indivíduos, por exemplo maior susceptibilidade ao estresse e aumento do

risco de desenvolver SDA na idade adulta (GRANT e DAWSON, 1997; SIEGMUND, 2005; FULLGRABE et al. 2007; CARVALHO et al. 1995; SANCHIS et al. 2007; SCHUCKIT, 2009; ALFONSO-LOECHES e GUERRI, 2011).

O início precoce do uso desta substância representa um fator de risco para o desenvolvimento de SDA na idade adulta. É importante destacar que 80% dos alcoolistas começaram a beber antes dos 30 anos de idade e mais de 40% relataram problemas relacionados ao EtOH entre as idades de 15-19 anos (CHAMBERS, TAYLOR e POTENZA, 2003).

O consumo desta droga está associado a comportamentos de risco, que inclui beber e dirigir, sexo sem proteção e uso de múltiplas substâncias. A ingestão abusiva contribui para o aumento da violência, da taxa e prevalência de lesões relacionadas ao ato de beber e dirigir, assim, os impactos a sociedade são negativos e complexos, fazendo deste neurotóxico uma grave ameaça à saúde, e representando uma das principais causas de morte entre as idades de 15-59 anos. Além de ser um fator causal de 60 tipos de doenças e lesões e causa componente de 200 outras (MILLER et al. 2006; WHO, 2011).

A OMS (2011) estima que o uso abusivo do EtOH seja responsável por aproximadamente 2,5 milhões de óbitos ao ano no mundo sendo responsável por quase 4% de morbidades. De acordo com este estudo, o consumo continuará a subir nas próximas décadas, e as mulheres e os adultos jovens constituem os grupos de maior risco, o que torna esta substância um problema de saúde pública emergencial. O consumo crescente de EtOH, especialmente entre as mulheres, está relacionado a países de rápido crescimento econômico, a exemplo do Brasil (BOFFETTA e HASHINE, 2006). Dentro de um determinado país, padrões de consumo variam de acordo com subpopulações e em diferentes regiões; acredita-se geralmente que aqueles de baixa escolaridade e renda consomem mais álcool do que os de ensino superior e de renda elevada, resultando em disparidades nos padrões de consumo (MOLLER et al. 1997).

Os problemas relacionados à ingestão abusiva desta droga variam amplamente em todo o mundo. Porém, os maiores índices de consumo são relatados na sociedade oriental moderna, uma vez que esta a utiliza regularmente. (SPANAGEL, 2009; WHO, 2011).

O consumo *per capita* mundial de bebidas alcoólicas em 2005 foi de 6,13 litros de EtOH puro, consumidos por pessoas com 15 anos ou mais. Os níveis mais altos

de ingesta podem ser encontrados no mundo desenvolvido, principalmente no hemisfério norte, Austrália e Nova Zelândia. Os baixos níveis podem ser encontrados nos países do norte da África e África Subsaariana, em regiões do Mediterrâneo Oriental, Ásia Meridional e Oceano Índico (figura 1). Estas regiões representam grandes populações de fé islâmica, que tem altas taxas de abstinência (WHO, 2011).

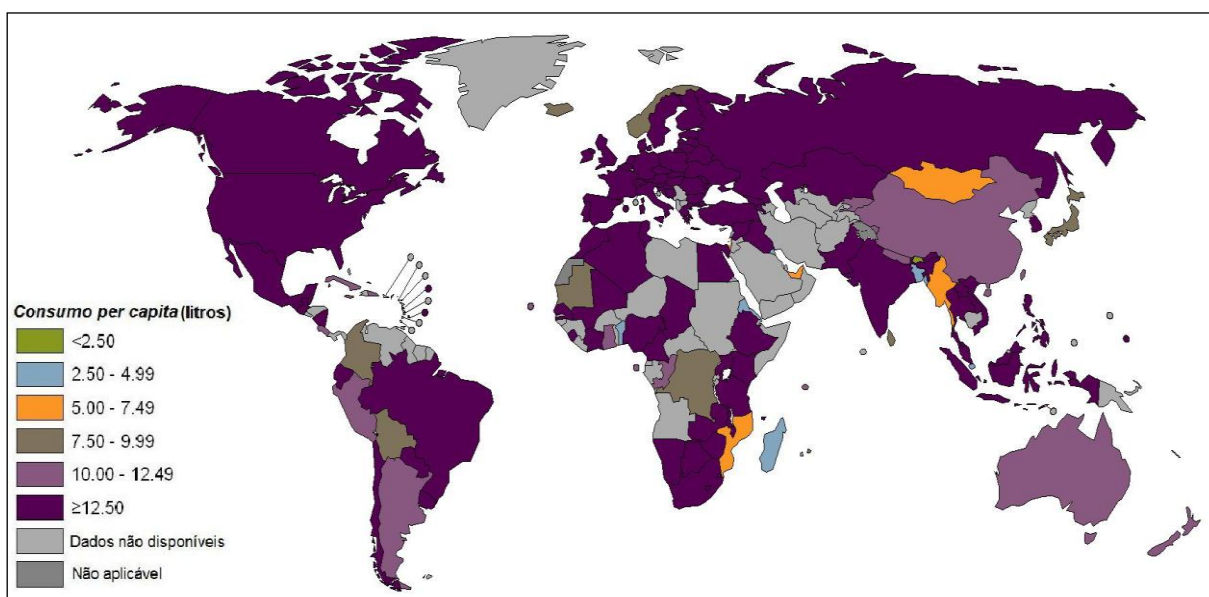


Figura 1: Consumo *per capita* de EtOH puro em litros, para a população com mais de 15 anos de idade, referente ao ano de 2005.

Fonte: Adaptado de WHO, 2011.

O Brasil, de acordo com Galduroz e Caetano (2004), ocupava a 63^a posição no mundo em consumo de EtOH *per capita* para pessoas com idade superior a 15 anos. Os autores chamaram a atenção para o fato de que o consumo desta droga no Brasil cresceu 74,5% entre 1970 e 1990. Outro fator preocupante foi o aumento percentual de dependentes de álcool, de 11,2% em 2001 para 12,3% em 2002 (CARLINI et al. 2002).

Estudos epidemiológicos sobre o uso do EtOH no Brasil, desenvolvido pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), a partir de dois levantamentos domiciliares realizados em 2001 e 2005, em 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes, representativos de todas as regiões indicaram que esta foi a substância psicotrópica mais utilizada, e em consumo

crescente. Em 2001 o seu uso era de 68,7% elevando-se para 74,6% em 2005 para todas as faixas etárias (CARLINI et al. 2002; CEBRID, 2007).

Estudo recente sobre as características socioodemográficas de ingesta do desta substância entre os brasileiros, constatou que indivíduos entre 18 e 44 anos de idade consomem quatro vezes mais que os demais. Segundo os autores, o maior consumo da substância a partir dos 18 anos é devido à legislação brasileira, que proíbe a venda de bebidas alcoólicas para pessoas menores, e provavelmente, contribui para os níveis mais baixos de consumo por adolescentes (CASTROAND et al. 2012).

Para avaliar a ingestão diária de EtOH em 16 capitais brasileiras, um estudo epidemiológico foi realizado e demonstrou que Belém ocupa o 12º lugar em consumo, e a prevalência entre consumidores nesta capital era de 31%, o equivalente a pelo menos uma dose de álcool nos últimos trinta dias do estudo, situando-se na 9ª capital de maior incidência (INCA, 2003).

Associado ao aumento de uso e consequente dependência, estão os desdobramentos individuais ao usuário e à sociedade. Assim, o levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool pela população brasileira constatou que 45% dos brasileiros que declararam ter bebido pelo menos uma vez nos últimos 12 meses, apresentaram algum tipo de problema. Os problemas relacionados à saúde foram os mais prevalentes (38%), seguidos por problemas familiares (18%), sociais (17%), de trabalho (8%) e legais (2%). Destes, 17% envolveram algum tipo de violência (LARANJEIRA et al. 2007).

Além de seus efeitos sócio-econômicos, o alcoolismo constitui um importante fator de risco para carga global de doenças (ISO et al., 2004; PALLEIRO e LÓPEZ, 2007), frente a isto, é necessário que se conheça alguns dos possíveis mecanismos de ação do EtOH no organismo. Tal compreensão auxilia e orienta intervenções nas patologias decorrentes da exposição crônica ao EtOH (ALLEN e BAYRAKTUTAN, 2008).

1.2 Mecanismo de Ação do EtOH

O EtOH age sobre diversos receptores ou proteínas efetoras através de interações diretas ou indiretas, em concentrações muito elevadas pode alterar a composição de lipídios da membrana. Concentrações entre 5 e 20 mM, que constitui a faixa legal de embriaguez para a condução em muitos países, interfere diretamente com a função dos canais iônicos e de receptores (VENGELIENE et al. 2008). Diversos estudos apontaram alguns alvos celulares para ação desta droga, incluindo receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido γ -aminobutírico A ($GABA_A$), glicina, serotoninérgicos (5-HT₃) e nicotínicos de acetilcolina (nAChR), assim como canais de Ca^{2+} do tipo-L e canais de K^+ retificadores internamente dirigidos e modificados pela proteína G (NARAHASHI et al. 1999; LOVINGER, 1999; JUNG, AKABAS e HARRIS, 2005; VENGELIENE et al. 2008). A ação desta substância sobre canais iônicos e receptores depende de uma série de variáveis, principalmente de sua concentração e da composição da subunidade de determinado canal ou receptor (WALLNER, HANCHAR e OLSEN, 2003).

Os dois tipos principais de canais diretamente afetados por concentrações de 100 mmol/L ou 460 mg/dL, as quais podem ser letais ao ser humano, são os canais iônicos dependente de ligante e os canais de Ca^{2+} voltagem-dependente. Os primeiros 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 $GABA_A$, NMDA, glicina e 5-HT₃. Devido à capacidade do EtOH em modificar a excitabilidade neuronal através da interação com proteínas, é de se esperar que após longa exposição a esta substância, os neurônios se adaptem modulando a expressão gênica destes receptores e canais iônicos (JOHNSON et al. 2002; DAVIES, 2003).

Tem sido demonstrado que em exposição aguda esta droga afeta receptores de glicina (GlyR) (MIHIC et al. 1997) e seus domínios extracelulares (BORGHESE et al. 2012), o que por conseguinte inibe a função do receptor NMDA (figura 2) (WOODWARD, 1997). No entanto, na exposição crônica, e quando esta é retirada repentinamente, provoca aumento na densidade dos receptores NMDA (figura 2). (TIKKA e KOISTINAHON, 2001). Em animais, a administração crônica aumenta a

expressão de genes e proteínas de subunidades do receptor NMDA, sendo que pelo menos uma subunidade NR1 em combinação com uma ou mais subunidades NR2 (A-D) irão compor este receptor, e assim aumentar a resposta mediada pelo neurotransmissor glutamato (Glu) (MATSUMOTO, 1998; KRYSTAL et al. 2010). O uso crônico de EtOH causa aumento na regulação de receptores NMDA *in vivo* e *in vitro*, o que resulta em hiperatividade de receptores NMDA glutamatérgicos (figura 2), responsáveis pelo aparecimento das crises convulsivas características do período de abstinência e também por resposta citotóxica (excitotoxicidade) (MCBAIN e MAYER, 1994; MATSUMOTO, 1998; DODD et al. 2000; NAGY, 2004).

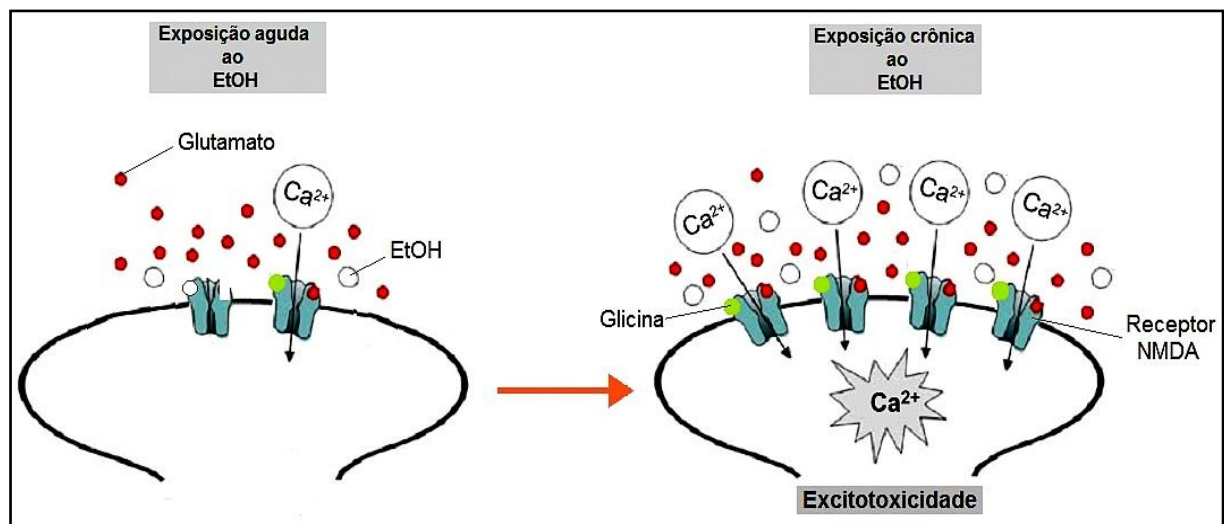


Figura 2: Interação do EtOH com o receptor NMDA. A exposição aguda ao EtOH, bloqueia/inibe receptores NMDA. Enquanto, a exposição crônica ao EtOH, provoca aumento na densidade de receptores NMDA. Este aumento na expressão de receptores NMDA, e através dos locais de ligação do co-agonista glicina, leva a neurotransmissão glutamatérgica excessiva. Em consequência ocorre influxo prolongado de Ca^{2+} na célula, ativando diferentes enzimas catabólicas e finalmente morte celular, por excitotoxicidade.

Fonte: Adaptado de Bleich et al. 2004.

O Glu é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro. Receptores de Glu são divididos em duas categorias principais: os receptores metabotrópicos (mGluR) e ionotrópicos (iGluR). Os primeiros são mensageiros secundários intracelulares, através de proteínas-G. Por conseguir passar livremente através da bicamada lipídica das células, o EtOH afeta várias proteínas intracelulares, muitas delas envolvidas nas vias dos segundo mensageiros. Contudo, estudos tem demonstrado a proteína quinase C (PKC) como a principal proteína intracelular

afetada pela exposição a esta substância. Alterações na PKC é capaz de modificar a função ou expressão dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e canais iônicos dependente de ligante (DODD et al. 2000; FENG et al. 2001; PROCTOR et al. 2003).

Os receptores ionotrópicos medeiam a neurotransmissão excitatória rápida dos íons sódio (Na^+), Ca^{2+} e K^+ . Uma vez liberado na fenda sináptica o Glu pode se ligar a um dos três tipos de iGluR: NMDA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e o cainato (WIRKNER, POELCHEN, e KÖLES, 1999; DEMIRCI e EŞEL, 2004). Alguns dos receptores AMPA's e cainato permitem a entrada de Ca^{2+} na célula, já os receptores NMDA são todos permeáveis ao Ca^{2+} . Aumento moderado na concentração do Ca^{2+} intracelular pode desencadear uma variedade de processos que alteram as propriedades dos neurônios, e quando em excesso o Ca^{2+} é tóxico e pode ocasionar morte neuronal. Assim, os receptores NMDA estão envolvidos em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos no SNC, tais como desenvolvimento neuronal, aprendizagem e memória, excitotoxicidade e doenças neurodegenerativas. Estes receptores, também medeiam alguns dos efeitos agudos e crônicos do EtOH no SNC, incluindo cognitivos, convulsões e degeneração neuronal (DODD et al. 2000; KUMARI e TICKU, 2000; WOODWARD, 2000).

Dentre sua vasta gama de efeitos sobre o SNC, este neurotóxico influencia poderosamente a transmissão GABAérgica, através da modulação de liberação pré-sináptica de GABA, principal neurotransmissor inibitório do SNC, e do influxo de cloreto pós-sináptico (figura 3). Estas ações contribuem para vários efeitos comportamentais do EtOH, tais como: desinibição comportamental, sedativo-hipnótico, prejuízo cognitivo, ataxia e incoordenação motora (FEHR et al. 2006; KUMAR et al. 2009; HEILIG, 2011).

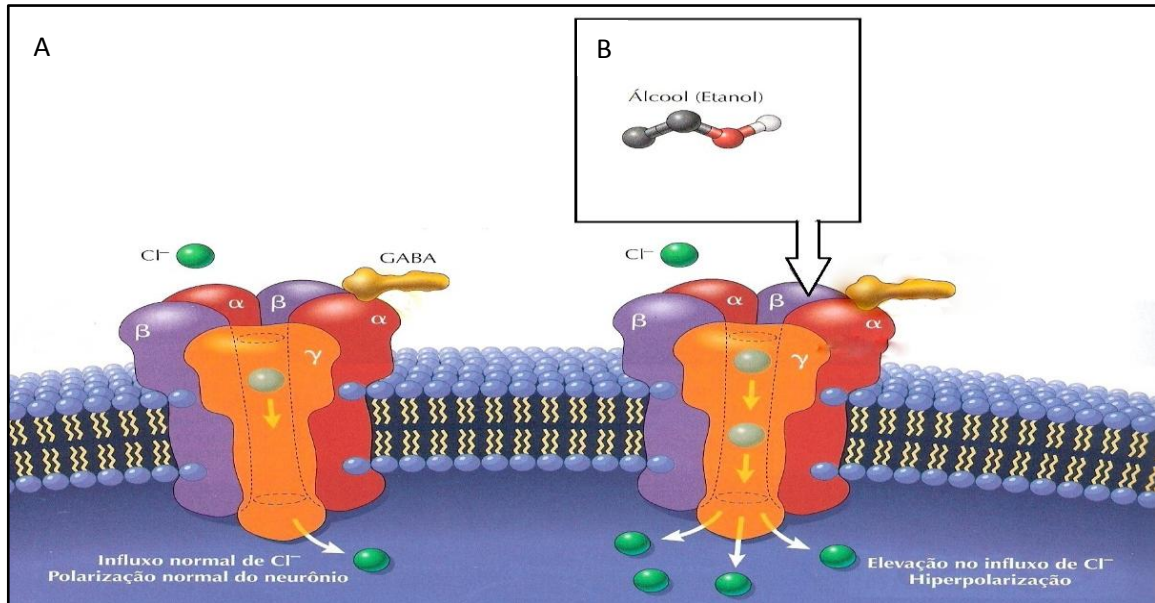


Figura 3: EtOH e neurotransmissão GABAérgica. (A) Modelo esquemático da neurotransmissão GABAérgica em condições fisiológicas. (B) O EtOH atua diretamente no receptor pós-sináptico GABA_A, mantendo-o aberto por mais tempo, o que implica em maior influxo de Cl⁻ para a célula. O EtOH, também pode aumentar a quantidade GABA liberado a partir do neurônio pré-sináptico.

Fonte: Adaptado de Fehr et al. 2006; Kumar et al. 2009; Kelm et al. 2011.

A administração crônica de EtOH provoca efeitos neuroquímicos e moleculares no cérebro de ratos, semelhantes ao induzido por drogas que potencializam a função dos receptores GABA_A (CAGETTI et al. 2003), os quais pertencem a uma família de canais iônicos transmembrana ativados por ligantes que inclui receptores nicotínicos de acetilcolina, glicina e 5-HT₃, sendo responsáveis pela transmissão neuronal rápida no SNC (DAVIES, 2003).

Embora os mecanismos moleculares responsáveis pelas alterações na função do receptor GABA_A, induzidos pela exposição prolongada ao ETOH ainda permaneçam obscuros, foi cogitado que alterações na densidade do receptor e na expressão gênica do mRNA de suas subunidades possam estar envolvidas neste processo. A exposição crônica a esta droga induz tolerância funcional de receptores GABA_A, o que implica em mudanças adaptativas na neurotransmissão mediada por este receptor e consequentemente sobre suas propriedades farmacológicas e fisiológicas. Parece, entretanto, que um único mecanismo por si só não é suficiente para explicar as mudanças observadas em função deste receptor (CAGETTI et al. 2003; KUMAR, FLEMING e MORROW, 2004; BIGGIO et al. 2007; ENOCH, 2008).

As alterações fisiológicas e morfológicas provenientes da ingestão crônica de EtOH podem ser observadas em todo o cérebro, entretanto algumas áreas ou populações de células são mais vulneráveis que outras. Tem sido documentado que regiões como córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo, substância branca e células da glia são mais susceptíveis aos seus efeitos (HARPER et al, 1987; HARDING et al, 1996; BAKER et al, 1999).

Além dos efeitos deletérios o consumo excessivo da droga também foi identificado como potencial fator de risco para o acidente vascular cerebral (AVC) (GILL et al. 1986). Diversos autores constataram que esta substância compõe um dos cinco fatores de risco mais importantes para carga global de doenças e que quase 60% destas estão incluídas nas categorias de doenças crônicas, doenças neuropsiquiátricas, diabetes, cirrose hepática e doenças cardiovasculares, como o AVC (REHM et al. 2003; GILMAN, 2006; MICHAEL e SHAUGHNESSY, 2006; OTERO PALLEIRO e BARBAGELATA LÓPEZ, 2007; O'DONNELL, 2010).

1.3 Acidente Vascular Cerebral

1.3.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O AVC continua sendo uma das principais causas de morte nos países ocidentais, superado apenas pelas doenças cardíacas e o câncer. Além da elevada taxa de mortalidade, mais de 50% dos pacientes apresentam alguma deficiência motora, reduzindo expressivamente a qualidade de vida, mais do que qualquer outra doença (BONITA, 1992; DONNAN et al, 2008).

De todos os problemas neurológicos, o AVC é um dos mais devastadores. No mundo é responsável por 5,5 milhões de óbitos/ano. A prevalência desta patologia deve aumentar expressivamente em todo o mundo nos próximos anos, pois a população mundial com mais de 65 anos aumenta em cerca de 9 milhões por ano. A estimativa é que em 2025, a população mundial de pessoas com idade superior a 65 anos seja aproximadamente de 800 milhões, das quais dois terços deverão viver em

países ainda em desenvolvimento, particularmente na América Latina e Ásia (MUKHERJEE e PATIL, 2011).

Segundo dados da OMS, no ano de 2002 havia 15,2 milhões de pessoas acometidas com AVC em todo o mundo, o que representava mais de um terço da população do planeta, destas 5,5 milhões foram ao óbito. Considerando que em 2002 ocorreram 57 milhões de mortes no mundo, o AVC representou aproximadamente 10% deste total (WHO, 2004; JOHNSTON et al. 2009).

Nos Estados Unidos, o AVC constitui uma das principais causas de déficit neurológico, de acordo com estatísticas do “*National Institute of Neurological Disorders and Stroke*” (Instituto Nacional de Distúrbios Neurológicos e AVC), órgão pertencente ao “*National Institute of Health*” (Instituto Nacional de Saúde) (NINDS/NIH), a estimativa é de que haja anualmente 780.000 novos casos de eventos cerebrovasculares, os quais devem ultrapassar 1 milhão nas próximas décadas. Pacientes que sobrevivem ao AVC geralmente apresentam sequelas neurológicas definitivas, este perfil nosológico é característico dos países industrializados (TAYLOR et al. 1996; LO, 2003; GORELICK e RULAND, 2010; NINDS/NIH, 2010).

Nos últimos 50 anos houve uma redução constante na mortalidade por AVC (redução relativa de cerca de 1% ao ano até o final dos anos 1960 seguido por uma queda mais acentuada de até 5% ao ano) nos países desenvolvidos, o que não ocorreu naqueles em desenvolvimento. A explicação mais plausível para a redução seria o melhor controle dos fatores de risco (hipertensão arterial e tabagismo), combinada com a melhoria nos padrões de vida (BONITA, 1992; THRIFT et al. 2006).

A incidência e a mortalidade provocada por AVC tem sido correlacionadas com a renda nacional *per capita*. O estudo de Feigin et al. (2009) baseado em uma metanálise de 56 estudos de base populacional em todo o mundo, demonstrou que de 1970 a 2008, houve redução de 42% na incidência desta patologia nos países de renda *per capita* elevada, enquanto os países de baixa e média renda *per capita* experimentaram aumento de 100% na incidência. Embora a mortalidade esteja diminuindo tanto nos países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, nos últimos 10 anos, a mortalidade foi 25% superior nos países de renda média e baixa, quando comparados àqueles de renda elevada.

Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde do Brasil (2004) indicam que as doenças do aparelho circulatório representam a principal causa de morte para ambos os gêneros. Entre estas, o AVC foi a primeira causa de óbito entre as mulheres (33,6% de todos os óbitos), e a segunda causa entre os homens (31,5% de todos os óbitos), sendo estes valores ultrapassados apenas pelas doenças isquêmicas do coração (33,3% do total de óbitos). No país, o AVC ocupa o segundo lugar das causas de internações hospitalares, e alguns autores relatam que este já se tornou a principal causa de morte, com índices de mortalidade em 2003 de 51 por 100 mil habitantes (MANSUR et al. 2003; LOTUFO e BENSEÑOR, 2005; SOUZA et al. 2006).

Estudos realizados nos anos de 2000 e 2002 analisando pacientes (55 e 177 pacientes, respectivamente) acometidos por AVC, demonstraram que 72% dos pacientes retornaram para suas residências, 25% permaneceram em instituições e 3% necessitaram de acompanhamento domiciliar de enfermagem para execução de suas atividades. Aproximadamente 70% recuperaram a deambulação em um ano, 45-60% eram independentes em seus cuidados pessoais e apenas 5-9% eram totalmente independentes. Somente 9% retornaram às suas ocupações profissionais de origem, 1% modificaram suas ocupações e 37% não retornaram para o trabalho (KWAKKEL et al. 1999; OTAOLA e DE LA VILLA, 2000; HOBART et al. 2002; SCHAECHTER, 2004).

Os déficits neurológicos ou deficiências mais prevalentes nos pacientes pós-AVC são: distúrbios de comunicação, cognitivos, na percepção visuo-espacial, e alterações motoras, tais como: hemiparesia, hiper ou hipocinesia, desordens que comprometem significativamente a qualidade de vida destas pessoas (EVERS et al. 2004; SCHMIDT et al. 2007; ROGERS et al. 2011).

1.3.2 AVC e CONTROLE MOTOR

O sistema motor consiste em uma complexa rede de áreas corticais (áreas motoras primárias e secundárias) e subcorticais (gânglios da base e cerebelo), em que populações neuronais interagem entre si, através de mecanismos excitatórios e inibitórios. Este sistema altamente dinâmico é influenciado por fatores externos e

internos que modulam a percepção sensorial, atenção e comportamento motor (XERRI et al. 1996; ASANUMA e PAVLIDES, 1997; BREAKSPEAR et al. 2003; HOSP e LUFT, 2011). A lesão estrutural resultante de um AVC pode perturbar o complexo equilíbrio das vias excitatórias e inibitórias que compõem este sistema, podendo afetar diretamente as vias motoras descendentes (o trato corticoespinhal), e também áreas corticais (MURASE et al. 2004 ; HUMMEL et al. 2005 ; HE et al. 2007 ; GREFKES et al. 2008; NOMURA et al. 2010 ; WANG et al. 2010). Diferentes tipos de distúrbios do movimento (hipercinéticos e hipocinético) tem sido observados pós-AVC (GHIKA e BOGOUSSLAVSKY, 2001).

A capacidade de gerar movimentos corporais coordenados depende da interconexão de uma série de estruturas envolvidas no controle motor. Em humanos, o córtex motor pode ser dividido em córtex motor primário (M1), área motora suplementar (AMS) e área pré-motora (APM). Enquanto a AMS e a APM estão envolvidas no planejamento da atividade motora, o M1 recebe densas aferências da AMS e APM e mantém-se organizado em agrupamentos neuronais altamente especializados no comando do movimento de cada segmento. A ativação coordenada dessa rede neuronal possibilita o ordenamento multiarticular fino e independente, como os movimentos de alcance e preensão (ADKINS et al., 2006; JUAN et al. 2011).

O sistema motor é constituído por um conjunto de 3 unidades: unidade de comando, de controle e de ordenação. O movimento é idealizado, planejado e comandado pelo córtex, sob supervisão da unidade de controle, a qual é constituída pelos núcleos da base e cerebelo. Este sistema funciona por meio de uma alça de retroalimentação, a qual leva informação acerca do movimento pretendido até estruturas de controle, que corrigem, adequam e aperfeiçoam o movimento e reenviam às estruturas corticais (DELONG e WICHMANN, 2007; HANDLEY et al. 2009). De modo simplificado, os sinais partem do córtex e são transmitidos por meio do corpo estriado, globo pálido e tálamo de volta para o córtex (figura 4) (HANDLEY et al. 2009).

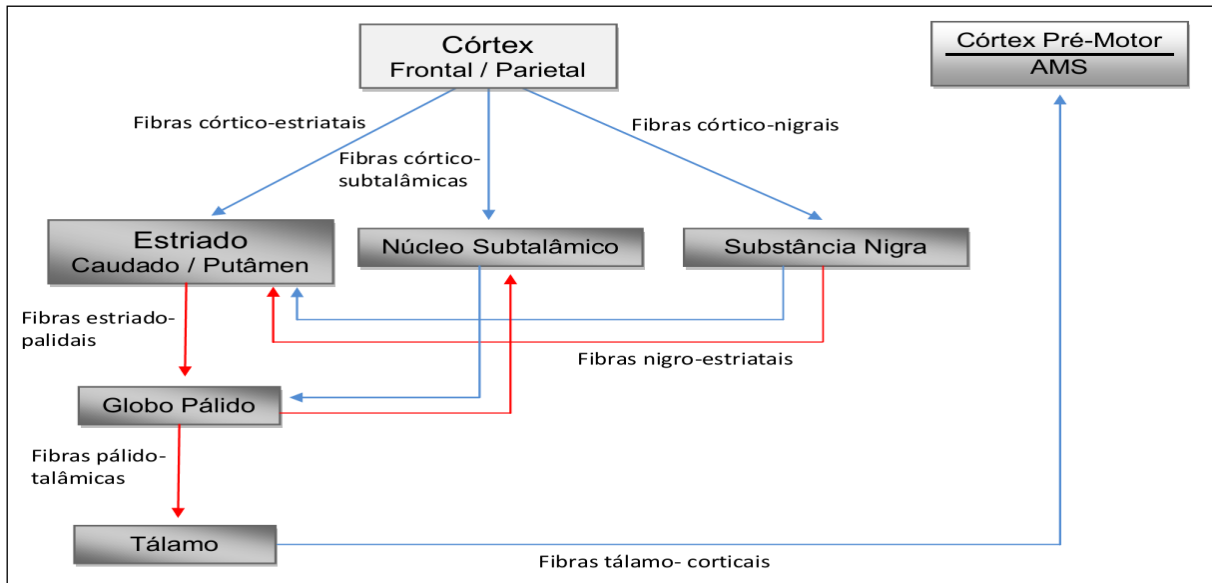


Figura 4 – Modelo simplificado da circuitaria dos gânglios da base. As vias estimulatórias são representadas pelas linhas em azul e as vias inibitórias pelas linhas em vermelho.

Fonte: Adaptado de HANDLEY et al. 2009.

No cerebelo há grande número de aferências, as quais fornecem informações referentes à sensibilidade somestésica, vestibular, visual e auditiva, além de aferências de origem cortical (PROSKE e GANDEVIA, 2009). Do córtex, o cerebelo recebe as informações sensorio-motoras por meio do trato córtico-pontino-cerebelar. A resposta de correção do movimento, por sua vez, parte dos núcleos cerebelares profundos para o núcleo centro-lateral do tálamo e deste para o córtex (HORNE e BUTLER, 1995; HOLSCHNEIDER et al. 2007). Após a adequação e correção do movimento a informação é transmitida até a unidade de ordenação. Esta é constituída pelos motoneurônios da medula e do tronco encefálico, os quais controlam a excitabilidade muscular por meio de potenciais de ação transmitidos pelos pares de nervos cranianos e espinhais (KANDEL et al. 2003).

Os núcleos da base através de conexões com o córtex sensorio-motor e o cerebelo, controlam os movimentos por meio da regulação de impulsos neurais que auxiliam no planejamento e na execução de movimentos sequenciados (HANDLEY et al. 2009). Dentre os núcleos da base, o estriado (formado pelos núcleos caudado e putâmen) atua como a porção receptora da maioria das projeções provenientes de diversas regiões corticais, tendo particular importância na integração de informações necessárias para a realização do movimento voluntário normal e, talvez, para o aprendizado motor (BROWN e SHARP, 1995).

Experimentos utilizando injeção estriatal de inibidores de síntese proteica demonstram que essa inibição é capaz de prejudicar a aquisição de tarefas que envolvam a habilidade motora, sugerindo a participação da plasticidade estriatal, assim como a integridade dos circuitos que envolvem os núcleos da base, como componentes fundamentais neste processo (WÄCHTER et al. 2010).

Alguns estudos sugerem que o estriado apresenta efetiva contribuição para a execução das tarefas motoras, incluindo componentes da atenção (VANVLEET et al. 2002; KARNATH et al. 2002), da orientação espacial (BROWN e ROBBINS, 1989), da percepção sensorio-motora (JEYASINGHAM et al. 2001) e da motivação (CARDINAL et al. 2002). Além disso, estariam envolvidos na finalização de programas motores relacionados a metas, tais como alcançar e segurar um objeto (REDGRAVE, 1999).

Até o momento, grande parte dos mecanismos neurobiológicos que levam a mudanças na conectividade cortical após AVC não foram elucidados. Desta maneira, é necessário que estudos longitudinais analisem o período desde o início das alterações pós-isquêmicas até a fase crônica, para aprofundar a compreensão de como as interações patológicas entre áreas do cérebro se desenvolvem após o AVC e como elas se relacionam com déficits neurológicos observados nos resultados clínicos. Estas análises podem fornecer novos conhecimentos fisiopatológicos, possibilitando compreender os sintomas neurológicos. Essas informações podem ajudar a decidir quando as terapias específicas de intervenção para o sistema motor devem ser realizadas para melhorar a recuperação motora dos pacientes (GREFKES e FINK, 2011).

1.3.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS

O AVC pode ser definido como uma síndrome neurológica caracterizada pela rápida progressão dos sinais e sintomas que podem perdurar por 24 horas ou mais, podendo ocasionar perda de função cerebral focal ou levar a óbito sem outra causa aparente, a não ser de origem vascular (WHO, 1988; FEUERSTEIN e WANG, 2000). Pode resultar de hemorragia (15% dos casos) ou de isquemia (80% dos casos) do tecido encefálico (figura 5). A hemorragia ocorre no momento em que uma artéria

perde sua elasticidade e se rompe, ocasionando extravasamento de sangue dentro ou ao redor do tecido encefálico. Na isquemia, há restrição do suprimento sanguíneo para o encéfalo, em consequência do bloqueio de artérias que irrigam determinada área do cérebro, ocasionado pela presença de trombo ou êmbolo (ADAMS et al. 1993; BROWN, 2002; NUDO E NELSON, 2003; MERGENTHALER et al. 2004).

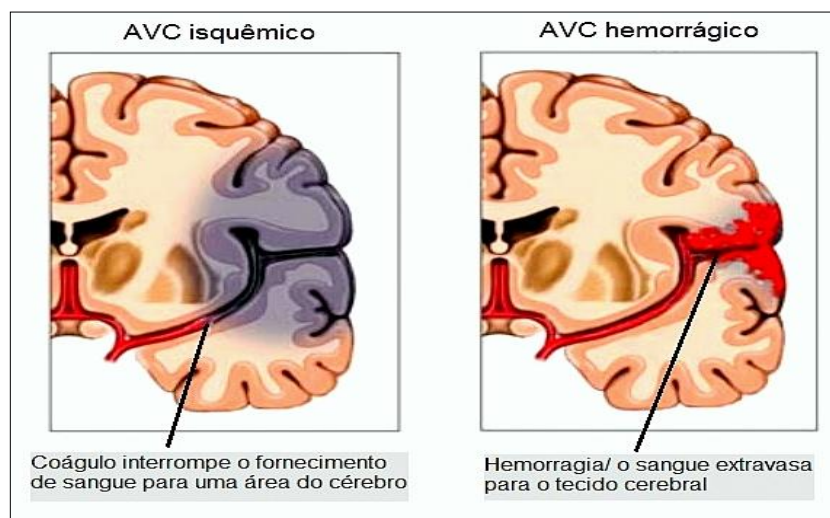


Figura 5: Tipos de AVC: isquêmico ou hemorrágico.

Fonte: Adaptado de Nucleus Medical Media Inc.

A oclusão do vaso na isquemia promove a interrupção do fluxo sanguíneo para o cérebro, reduzindo a oferta de oxigênio e nutrientes para níveis que comprometem a integridade celular, podendo levar à necrose, apoptose ou a ambas (SELMAN et al. 1992).

Para melhor compreensão/visualização da lesão isquêmica, Lee et al. (2005), propuseram um modelo de quatro compartimentos, sendo distinguidos por métodos de diagnóstico por imagem e por suas diferenças fisiopatológicas no decorrer do AVC isquêmico (AVCi), a saber: 1) tecido não afetado, 2) tecido levemente hipoperfundido, geralmente não está em risco, 3) o tecido de risco (penumbra isquêmica) e 4) o tecido já irreversivelmente danificado (núcleo isquêmico) (figura 6).

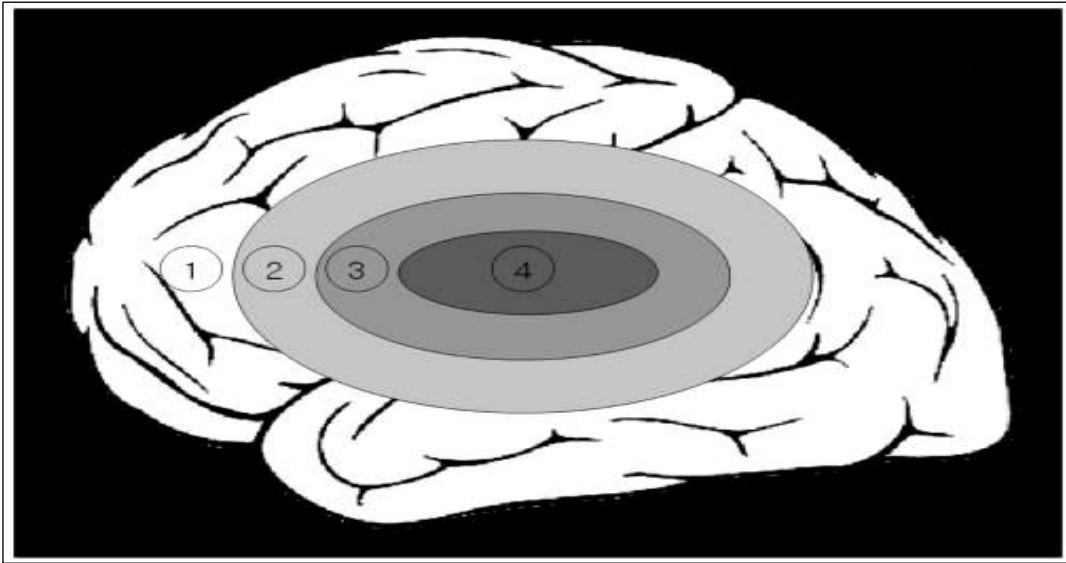


Figura 6: Esquema do processo isquêmico. O núcleo isquêmico (4) representa um compartimento de tecido que está irreversivelmente danificado ou infartado, e está rodeado, em graus diversos pela penumbra isquêmica (3) que está em risco iminente de infarto. Entre a área não afetada (1) e a penumbra isquêmica, existe uma área de oligemia benigna (2) que normalmente sobrevive ao insulto isquêmico, mesmo sem perfusão. A extensão de cada compartimento sofre alterações com o passar do tempo, após o início de hipoperfusão.

Fonte: Adaptado de LEE et al. 2005.

Minutos após a ocorrência de um AVCi focal, o tecido cerebral com redução mais drástica do fluxo sanguíneo é altamente lesionado e, posteriormente, sofre morte celular, por necrose. Este núcleo necrótico (isquêmico) permanece rodeado por uma zona de tecido que foi afetado em menor severidade (penumbra isquêmica). Nesta região, o dano neuronal desenvolve-se lentamente, pois o fluxo de sangue decorrente de territórios vasculares adjacentes (fluxo colateral) mantém a perfusão cerebral acima do limiar para a morte celular imediata, portanto permanece metabolicamente ativo. Esta região fronteiriça, penumbra isquêmica, pode representar até a metade do volume total da lesão durante os estágios iniciais da isquemia, e corresponde à região pós-AVC, em que há oportunidade de intervenção farmacológica para minimizar os danos ao tecido (GINSBERG, 1997; BROUGHTON, REUTENS e SOBEY, 2009, IADECOLA e ANRATHER, 2011).

No núcleo isquêmico, a principal causa de morte celular é a falta de energia. Sem oxigênio e glicose os neurônios não liberam adenosina trifosfato (ATP) necessário para abastecer as bombas iônicas que mantem o gradiente iônico através da membrana neuronal, principalmente a Na^+/K^+ ATPase. Por conseguinte,

o maciço acúmulo citoplasmático de Na^+ e Ca^{2+} leva à degeneração das organelas, perda da integridade da membrana e morte celular por necrose (LIPTON, 1999; IADECOLA e ANRATHER, 2011).

Existe uma variedade de definições para a penumbra isquêmica, no entanto, o conceito de “penumbra” durante a isquemia cerebral foi introduzido em 1981 por Astrup, e refere-se às regiões do tecido cerebral, geralmente de localização periférica, onde o fluxo sanguíneo é suficientemente reduzido para causar hipóxia e grave o suficiente para reprimir a função fisiológica, mas não tão completo para causar falha irreversível do metabolismo energético e nem necrose celular (PACIARONI et al. 2009).

Neurônios na penumbra isquêmica ou zona peri-infarto podem sofrer apoptose após várias horas ou dias, o que torna esta área potencialmente recuperável por algum tempo, após o início da lesão. Diferindo da necrose, a apoptose é um processo relativamente ordenado de morte celular, dependente de energia para sua execução. A célula apoptótica é destruída de maneira organizada a fim de minimizar danos e perturbações às células vizinhas (TAYLOR et al. 2008; BROUGHTON et al. 2009).

1.3.3.1 Eventos Envolvidos na Morte Celular pós-AVC

O dano cerebral, em consequência à isquemia, resulta em uma cascata de eventos fisiopatológicos durante o processo isquêmico que incluem: despolarização, excitotoxicidade, inflamação e morte celular (WHITE et al. 2000).

A interrupção no fornecimento de nutrientes no início do AVC, em especial oxigênio e glicogênio, prejudica o fornecimento de ATP, necessário para manutenção do gradiente iônico neuronal. Esta rápida exaustão energética, após isquemia cerebral, leva a perda de potencial de membrana e despolarização neuronal. Canais de Ca^{+2} voltagem-dependentes são ativados e aminoácidos excitatórios são liberados no espaço extracelular (MERGENTHALER et al. 2004).

No núcleo isquêmico, as células sofrem despolarização axônica e não voltam a ser repolarizadas. Na região da penumbra, as células podem ser repolarizadas e despolarizadas novamente em resposta aos níveis elevados de Glu e K^+ no espaço extracelular. Estas repetidas despolarizações recebem o nome de “despolarizações peri-infarto” e acarretam o dano celular excitotóxico (LAKHAN et al. 2009).

A excitotoxicidade pode ser definida como a morte celular resultante das ações tóxicas dos aminoácidos excitatórios, como o Glu. Este evento geralmente se refere ao dano e a morte de neurônios decorrente da exposição ao Glu e ao influxo excessivo de Ca^{2+} para o interior da célula (BERLIOCCI et al. 2005), iniciando uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares (DIRNAGL et al. 1999).

O Ca^{2+} e o Glu, tão importantes em inúmeras funções celulares, estão envolvidos no processo de morte celular após evento isquêmico (SATTLER e TYMIANSKI, 2000). O Glu sináptico por sua vez, ativa os receptores de aminoácidos excitatórios (NMDA, AMPA e cainato), acoplados a canais iônicos (iGluR) preferencialmente de Ca^{2+} e Na^+ , acarretando maior permeabilidade a estes íons. Este neurotransmissor pode agir, ainda, através dos mGluR acoplados à proteína G, mobilizando os estoques intracelulares de Ca^{2+} (ARUNDINE e TYMIANSKI 2004; IADECOLA e ANRATHER, 2011).

A liberação excessiva de Glu ativa receptores AMPA, que aumenta o influxo de Na^+ nos corpos celulares e dendritos pós-sinápticos, levando à despolarização e edema agudo local. Os receptores NMDA são ativados e medeiam o influxo excessivo de Ca^{2+} tornando a célula neuronal incapaz de expulsar, sequestrar ou tamponar o íon, que deste modo permanece livre para ativar enzimas Ca^{2+} -dependentes, incluindo as proteases calpaína e caspases, metaloproteases de matriz (MMPs), fosfolipases, enzimas produtoras de óxido nítrico (NO^*), radicais livres e metabólitos do ácido araquidônico. Estas enzimas e seus produtos metabólicos, tais como os eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) e os radicais livres de oxigênio, provocam a destruição dos ácidos desoxirribonucléicos (DNA) e a ruptura da membrana citoplasmática e dos elementos citoesqueléticos (figura 04). Estes eventos induzem necrose ou morte celular programada (apoptose) dependendo da intensidade do estímulo nocivo e do estado metabólico dos neurônios (BROTT e BOGOUSSLAVSKY, 2000; WEINBERGER, 2006; GUPTA e CHAUHAN, 2011; IADECOLA e ANRATHER, 2011).

A cascata de eventos neuroquímicos inclui a disfunção da bomba Na^+/K^+ , aumento do Ca^{2+} intracelular pela abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes, ativação de receptores, principalmente, AMPA e NMDA, formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's), peroxidação lipídica, liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina (IL) -6 e IL-1 β (figura 7) (LO et al. 2003).

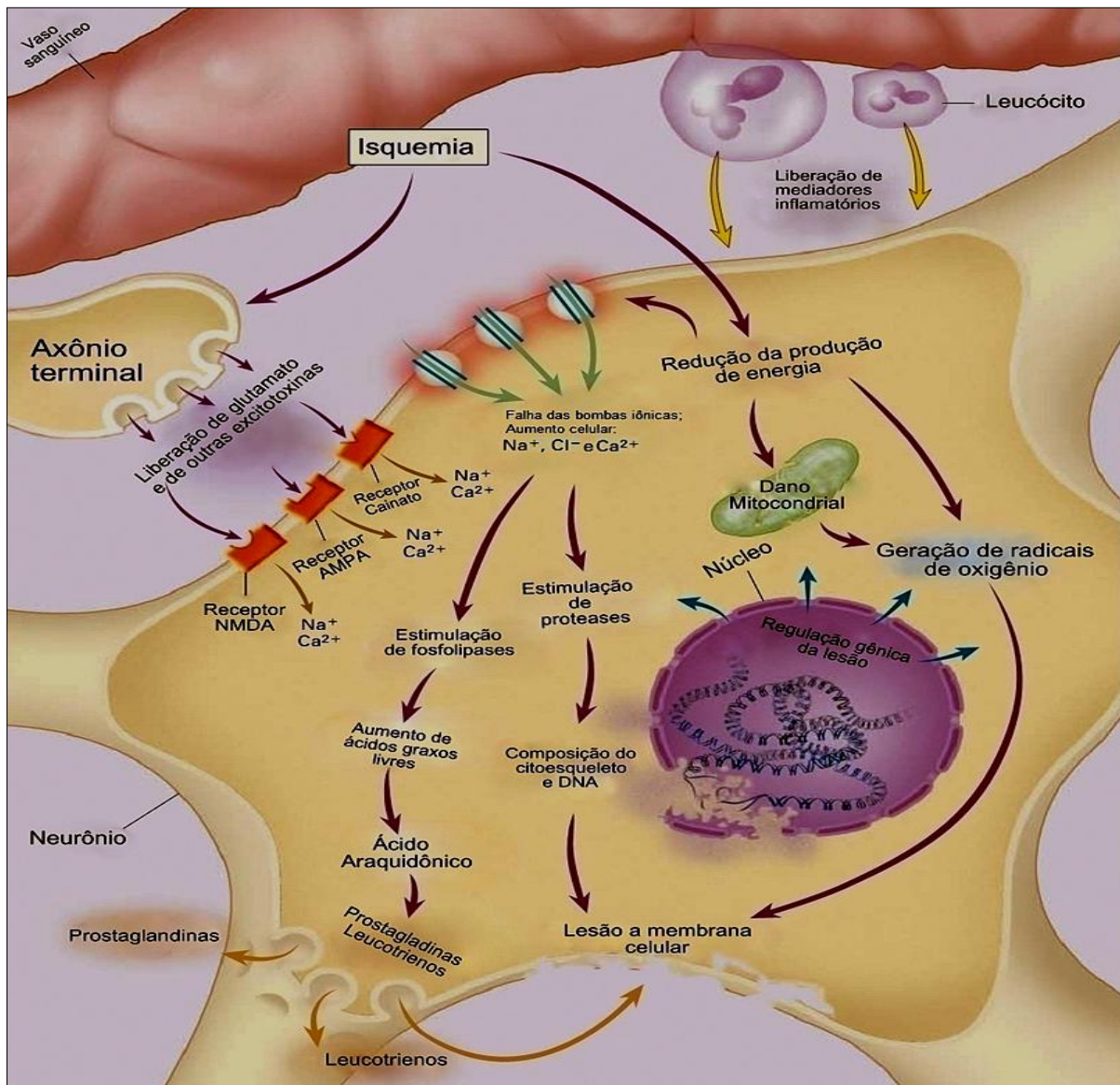


Figura 7: Eventos moleculares no tecido afetado por AVCi. A interrupção do fluxo sanguíneo diminui a produção energética, que por sua vez provoca insuficiência das bombas iônicas, lesão mitocondrial, ativação de leucócitos, liberação de mediadores inflamatórios, geração de radicais de oxigênio e liberação de excitotoxinas. Aumento dos níveis celulares de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} resultando na estimulação de fosfolipases e proteases, seguido por geração e liberação de prostaglandinas e leucotrienos, desarranjo do DNA e do citoesqueleto, e em seguida, dano a membrana celular. Alterações de componentes genéticos que regula elementos da cascata alteraram o grau da lesão. Fonte: Adaptado de Brott e Bogousslavsky, 2000.

1.3.3.2 Neuroinflamação e AVC

O sistema imunológico e o SNC, por muito tempo foram considerados entidades separadas, e qualquer interação entre os dois era compreendido como um sinal de mau funcionamento destes. No entanto, ao longo dos últimos anos, tem sido mostrado evidências de relação entre estes sistemas, principalmente, em presença de lesão cerebral (ZIERATH et al. 2010).

Durante a lesão cerebral, vários tipos de células e de mediadores inflamatórios são ativados e liberados, independentemente da origem da lesão. Células residentes, incluindo micróglia e astrócitos, controlam a resposta imediata; secundário a isto, há o recrutamento de células não-residentes incluindo macrófagos. No AVCi, a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) é comprometida, possibilitando ou não regulando, a comunicação entre o SNC e o sistema imune. Estudos já evidenciaram que a comunicação entre os dois sistemas, também ocorre em lesão que não danifica, necessariamente a BHE (KAUR e LING, 2008). O mecanismo preciso desta interação ainda necessita ser elucidado, no entanto, sabe-se que a regulação deste processo facilita a recuperação, mas quando descontrolado pode induzir lesão secundária (GRAEBER et al. 2011; KRAFT e HARRY, 2011).

A isquemia cerebral induz morte das células adjacentes, produzindo inflamação local, o que implica em recrutamento de leucócitos, macrófagos e produção de mediadores inflamatórios. A resposta inflamatória imediata é essencialmente coordenada pela micróglia residente (GIULIAN e VACA, 1993).

As células micrógliais são fagócitos mononucleares, altamente heterogêneas no SNC saudável. Elas compreendem 10% da população total de células neurais. No entanto, apresentam vários fenótipos morfológicos e, presumivelmente vários perfis funcionais em função do ambiente em que se localizam. No cérebro adulto, encontram-se em repouso e possuem morfologia ramificada e capacidade de monitorizar o ambiente cerebral, sendo responsável pela “vigilância imunológica” (STREIT, 2006; KRAFT e HARRY, 2011; ROMANO, 2011). Em resposta à lesão cerebral aguda, este grupamento de células é rapidamente ativado, liberando mediadores inflamatórios que agravam o dano celular (PERRY et al. 2003).

Estudos demonstraram que neurônios necróticos apresentam a capacidade de ativar células micrógliais e que a resposta pró-inflamatória subsequente leva ao aumento da atividade neurotóxica por indução de glutaminase, enzima envolvida na produção de Glu. Este mecanismo endógeno pode ser comum para várias formas de lesão neuronal e fornece uma ligação entre inflamação do SNC e neurodegeneração (LEHNARDT et al. 2007; PAIS et al. 2008; KILIC et al. 2008; CASO et al. 2008).

A micróglia ativada na lesão isquêmica libera mediadores neurotóxicos prejudiciais tais como: citocinas pró-inflamatórias, superóxido ($O_2^{\bullet-}$), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e proteases. Dentre as citocinas pró-inflamatórias expressa por células micrógliais, a IL-1 é a mais abundante. Esta interleucina induz à expressão de outras citocinas como IL-6 e TNF- α que contribuem para progressão da lesão isquêmica. (POLAZZI e CONTESTABILE, 2002; DANTON e DIETRICH, 2003; GUPTA e CHAUHAN, 2011).

Na atualidade tem se considerado a inibição da ativação micrógliar no decorrer do dano isquêmico, como uma opção lógica para intervenção terapêutica objetivando reduzir o dano neuronal (KRAFT e HARRY, 2011).

1.4 AVC e Terapêutica

Atualmente a única droga aprovada para o tratamento do AVCi agudo é o ativador do plasminogênio tecidual (tPA). No entanto, sua aplicação clínica está associada a limitações como a estreita janela terapêutica – a administração deve ser feita no máximo 3 horas após o ocorrido, antes da administração deve ser descartada a possibilidade de isquemia hemorrágica, devido o aumento do risco de hemorragia intracraniana associado ao uso do tPA (WEIR et al. 2004; GINSBERG, 2008; GUPTA e CHAUHAN, 2011). A estreita janela terapêutica faz com que o número de pacientes que podem se beneficiar com o tratamento seja pequeno. A estimativa é de que apenas seis pacientes em 1000 usufruam deste recurso terapêutico (GILLIGAN et al. 2005; O'DONNELL et al. 2010). De acordo com dados do “*National Institute for Health and Clinical Excellence*” (Instituto Nacional de Saúde e Excelência Clínica) (2008), a incidência de hemorragia intracraniana sintomática

de 7 a 10 dias após o tratamento, foi maior no grupo que utilizou a terapia trombolítica, porém o aumento não superou o benefício do uso do medicamento.

A terapia trombolítica tem por finalidade desobstruir o fluxo sanguíneo cerebral através da dissolução do trombo. Comparando-a ao placebo em seis ensaios clínicos foi possível observar diferença estatística favorável ao seu uso com *Odds Ratio* (OR) de 0,64 (IC 95%: 0,50 a 0,83) para a mortalidade e independência após três meses (NICE, 2008; O'DONNELL et al. 2010).

Vários estudos buscam fármacos que apresentem significativo benefício clínico no tratamento da isquemia cerebral. Estes tem sido testados ao longo dos anos, tais como bloqueadoras dos canais de Ca^{2+} , antagonistas glutamatérgicos, agonistas GABAérgicos, inibidores de leucócitos, antioxidantes, altas doses de albumina, porém nenhuma destes apresentou resultados significantes em ensaios clínicos com seres humanos (GINSBERG, 2008). Fármacos como os bloqueadores do canal de Na^+ e antagonistas do Glu não demonstraram benefícios na lesão cerebral aguda, em particular o AVCi por várias razões, dentre elas: a reduzida distribuição através da BHE, a toxicidade limitante da dose e a estreita janela terapêutica, tornando-os inviáveis para utilização na prática clínica (HAZEM et al. 2006).

A compreensão crescente dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão isquêmica tem possibilitado o surgimento de novas abordagens para o tratamento. Neste contexto, novas intervenções terapêuticas visam inibir a ativação micrógliar, a fim de reduzir os seus efeitos neurotóxicos sobre os neurônios saudáveis (RANSOHOFF e PERRY, 2009), pois ao produzirem ERO's, espécies reativas de nitrogênio (ERN's) e citocinas pró-inflamatórias, como: a $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e $\text{TNF-}\alpha$, esta população de células interferem negativamente no desfecho das doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias (BLOCK et al. 2007; RANSOHOFF e PERRY, 2009).

O objetivo desta estratégia é manipular a ativação micrógliar, a fim de interferir nos eventos da cascata isquêmica, inibir eventos moleculares que induzem influxo de Ca^{2+} e ativação de radicais livres, e deste modo evitar a morte de células neuronais na penumbra isquêmica (HAILER, 2008; AURIEL e BORNSTEIN, 2010).

O bloqueio e/ou inibição da micróglija já foi realizado com o uso da minociclina (MNC), que em estudos anteriores foi capaz de reduzir a inflamação e apresentou

efeito neuroprotetor em modelos animais de isquemia cerebral (YRJANHEIKKI et al. 1998; YRJANHEIKKI et al. 1999)

1.4.1 MINOCICLINA E A POSSIBILIDADE TERAPÊUTICA

As tetraciclinas foram descobertas em 1945, por Benjamin Duggar, o primeiro membro desta família foi a clortetraciclina que é um produto da fermentação natural da bactéria *Streptomyces aureosaciens*, encontrada no solo. A descoberta deste fármaco provocou uma corrida na pesquisa e obtenção de novas tetraciclinas (GOOD e HUSSEY, 2003; SAPADIN e FLEISCHMAJER, 2006), de tal modo que da década 1950 a 1970 vários compostos, naturais e semissintéticos, foram desenvolvidos. Neste mesmo período, este grupo de fármacos representou os antibióticos mais usados nos Estados Unidos (MAIA et al. 2010).

Desde sua descoberta este grupo farmacológico tem passado por várias modificações estruturais no intuito de aumentar sua atividade antimicrobiana, melhorar a absorção e meia-vida. Através destas modificações, em 1967 obteve-se a MNC (figura 8), uma tetraciclina semissintética de segunda geração, que foi comercializada a partir de 1972 (MERA et al. 2008; KIM E SUH, 2009; NELSON e LEVY, 2011).

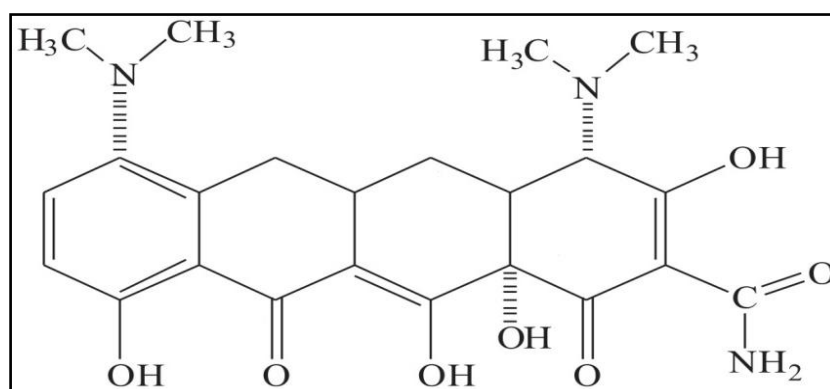


Figura 8: Estrutura química da minociclina. Nomenclatura IUPAC: 2-(amino-hidroxil-metilideno)-4,7-bis (dimetilamino)-10, 11,12a-trihidroxi-4a, 5, 5a, 6-tetrahidro-4H-tetraceno-1, 3,12-triona.

A MNC apresenta excelente biodisponibilidade por via oral, com meia vida de 11-22 horas, o que a permite atingir concentração plasmática 12 vezes superior aos outros compostos do grupo. Outra característica deste fármaco é sua organização molecular que lhe garante ser até cinco vezes mais lipofílica que as demais tetraciclina em pH fisiológico, proporciona elevada difusão através das membranas fosfolipídicas, incluindo a BHE, e possibilita alcançar concentrações clinicamente eficazes no SNC (GOOD e HUSSEY, 2003; BLUM et al. 2004; MERA et al. 2008).

Apesar de inicialmente ser indicado como antimicrobiano, estudos demonstraram que este fármaco proporciona neuroproteção clínica e experimental após lesão aguda e crônica em vários modelos experimentais de desordens que acometem o SNC, como esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose múltipla, traumatismo craniano e AVC. Sua ação neuroprotetora é atribuída à inibição da ativação micrógliar. Os resultados promissores obtidos em modelos animais fizeram a MNC ser alvo de muitos estudos de neuroproteção, o que provavelmente ocorre através de mecanismos anti-inflamatórios nas doenças neurodegenerativas (YRJANHEIKKI et al., 1998; 1999; YONG et al. 2004; LI e MCCULLOUGH, 2009).

De acordo com estes resultados em breve este fármaco poderá ser inserido na prática clínica para tratamento de doenças que acometem o SNC. No entanto, para que isto ocorra, é necessário um profundo conhecimento dos seus mecanismos de ação e alvos celulares, bem como o estabelecimento de diretrizes que instituem doses seguras e efetivas, vias de administração e janela terapêutica definida (PLANE et al. 2010).

Vários mecanismos de ação podem ser responsáveis pelos efeitos neuroprotetores da MNC, porém, o seu alvo celular principal no SNC ainda permanece desconhecido. Estudos atuais investigam as propriedades anti-inflamatórias, antiapoptóticas e antioxidantes (PLANE et al. 2010; GUPTA et al. 2011). Os principais efeitos biológicos desta droga, envolvidos na patogênese das doenças neurológicas, incluem a inibição da ativação da micrógliar e o seu amplo espectro de ação inibitória sobre os fatores inflamatórios, tais como, ciclooxigenase 2 (COX-2), IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α e interferon gama (IF- γ), atenuação da apoptose e supressão de ERO's (MATSUKAWA et al. 2009; NOBLE et al. 2009).

Outro mecanismo de ação que pode ser responsável por seu efeito sobre diversas doenças neurológicas, é a inibição de MMP's, as quais são expressas em

doenças neurológicas, e podem contribuir para desmielinização, excitotoxicidade e inflamação. Portanto, é extremamente relevante o fato de que a MNC atue inibindo diretamente a atividade enzimática das MMP's e, provavelmente, reduzindo a produção destas por leucócitos, alterando a transmigração destes para o SNC, e reduzindo ainda mais a inflamação (YONG et al. 2004; FAGAN et al. 2011).

Na isquemia cerebral ocorre inflamação aguda, o que agrava a lesão cerebral primária, ocasionando perda de funções neurais e morte celular, os quais podem ocorrer por necrose ou apoptose (SUGAWARA et al. 2004; DOYLE et al. 2008; BROUNS e DE DEYN, 2009; GUPTA e CHAUHAN, 2011).

O mecanismo apoptótico pode envolver a via mitocondrial intrínseca ou estímulos extrínsecos à célula (DOYLE et al. 2008). No extrínseco, sinais extracelulares desencadeiam o processo apoptótico ao unirem-se aos seus ligantes presentes na célula-alvo, como ocorre quando a proteína transmembrana ligante Fas (Fas-L) une-se ao receptor Fas (FasR), que por sua vez cliva e ativa caspase 8, levando à apoptose. A via intrínseca é ativada quando os neurônios não são capazes de manter o equilíbrio iônico causando perda de potencial de membrana, que por sua vez leva ao influxo de Ca^{2+} para a mitocôndria, provocando a abertura da membrana mitocondrial, liberação do citocromo c, e ativação das caspase 9 e 3 (GUAN et al. 2006; MEHTA et al. 2007).

Os efeitos antiapoptóticos da MNC, provavelmente, são exercidos na mitocôndria, visto que a redução na sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial estabiliza a membrana e inibe a liberação de citocromo c e outros fatores apoptóticos para o citoplasma, impedindo assim a ativação de caspase-3 e 9 (DOMERCQ e MATUTE, 2004; NOBLE et al. 2009). Há uma família de proteínas denominada de "*B-cell lymphoma 2*" (Bcl-2) presentes na mitocôndria que estão envolvidas na morte celular, e podem ser pró-apoptóticos (Bax, Bid, Bak) ou anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL). Em estudo *in vitro* foi observado que a MNC regula a expressão e a clivagem de Bcl-2, que se acumula na mitocôndria e promove os efeitos protetores por reduzir a ativação de Bax, Bid e Bak. Este fármaco parece ser eficaz em várias doenças que agredem o SNC, através da supressão de sistemas apoptóticos e/ou estímulos apoptóticos (GARCIA-MARTINEZ et al. 2010; ANTONENKO et al. 2010; GRIFFIN et al. 2010; FAGAN et al. 2011). Dentre os fatores que podem levar à apoptose, destacam-se os danos ao DNA, a irradiação, a ativação de genes promotores de apoptose, as citocinas, as proteínas virais, a deficiência de fatores de sobrevivência

da célula e o estresse oxidativo causado pelas ERO's (JOHNSON, 2003; GUPTA e CHAUHAN, 2011).

Em condições fisiológicas, os neurônios possuem mecanismos antioxidantes endógenos que são capazes de degradar radicais livres produzidos. Entretanto, estes mecanismos tornam-se insuficientes em condições patológicas (DOYLE et al. 2008). Quando a membrana celular perde sua polaridade há influxo de Ca^{2+} e Na^+ na célula. Esse acúmulo iônico induz a mitocôndria a produzir quantidades prejudiciais de ERO's (KNOTT et al. 2008). As principais ERO's envolvidas na neurodegeneração são: $\text{O}_2^{\bullet-}$, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\text{OH}^{\bullet}$). Além disto, as ERN, tal como $\text{NO}^{\bullet}$, podem resultar em dano neuronal. O $\text{NO}^{\bullet}$ pode reagir com $\text{O}_2^{\bullet-}$ para produzir peroxinitrito (ONOO^-). Este último ânion ou os produtos oriundos de sua decomposição ($\text{NO}_2^{\bullet}$ e $\text{OH}^{\bullet}$), em sua forma protonada, podem modificar a estrutura e função de proteínas e enzimas por nitração de resíduos de tirosina ou por sulfoxidação de metionina. Estes radicais ativam cascatas enzimáticas que destroem macromoléculas na célula levando-a a morte (HERTZ, 2008; BROUNS e DE DEYN, 2009; MELO et al. 2011; SCHILDKNECHT et al. 2011). Estudos recentes mostraram que a MNC tem a capacidade de interferir em uma série de sistemas químicos geradores de radicais livres (SCHILDKNECHT et al. 2011).

Schildknecht et al. (2011) demonstraram que este fármaco funciona como um eliminador seletivo de ONOO^- em vários modelos celulares, inclusive em neurônios humanos. A MNC foi capaz de proteger neurônios em meio de cultura, contra o estresse oxidativo com uma potência semelhante à vitamina E (Kraus et al. 2005).

O potencial neuroprotetor deste fármaco ainda não foi investigado frente a exposição crônica ao EtOH, porém há a possibilidade de que exerça efeito neuroprotetor, uma vez que estudos *in vivo* indicaram que o consumo crônico desta droga causa aumento nos níveis cerebrais da óxido sintase induzível (iNOS), COX-2 e IL-1 β (CREWS et al. 2006; CREWS e NIXON, 2009). Esta droga também promove aumento na produção de ERO's e/ou uma diminuição nos níveis de defesas antioxidantes, causando um desequilíbrio redox e resultando na degradação oxidativa de lípideos, proteínas e DNA. Portanto, o EtOH pode contribuir, pelo menos em parte, com a intensificação do dano em doenças neurodegenerativas (BROCARD et al. 2011). Deste modo, ele constitui um importante fator de risco na

ocorrência de isquemia cerebral (ISO et al., 2004; PALLEIRO e LÓPEZ, 2007; MELO et al. 2011).

Os dados epidemiológicos indicam que o consumo de EtOH deverá continuar aumentando globalmente, e conjuntamente a prevalência de AVC, uma das principais causas de morte no mundo (PATRA et al. 2011).

1.5 EtOH e AVC

Diversos estudos observacionais abordam os possíveis efeitos cardioprotetores do EtOH, e esses tem sido foco de debate na literatura científica e na mídia popular. No entanto, devido à ausência de ensaios clínicos é necessário que os profissionais de saúde interpretem os resultados antes de responder a seus pacientes quanto à utilização desta droga para reduzir o risco de desenvolver doença cardiovascular. As revisões sistemáticas e as metanálises tem associado o consumo de EtOH com proteção cardiovascular (MACLURE, 1993; RIMM et al. 1996; CLEOPHAS, 1999; CORRAO et al. 2000; DI CASTELNUOVO et al. 2002; REYNOLDS et al. 2003; CORRAO et al. 2004; FILLMORE et al. 2006), mas não tem abordado, uniformemente, a associação entre EtOH e mortalidade por doença cardiovascular, bem como a incidência e a mortalidade por doença coronariana e AVC (RONKSLEY et al. 2011).

O aumento do risco relativo para incidência de AVC em usuários contínuos de EtOH esta relacionado a um efeito sinérgico desta droga com a hipertensão. A associação entre o consumo da substância e a elevação da pressão arterial foi observado pela primeira vez entre soldados franceses, e desde 1915 se tem sugerido que esta associação pode ser causal (LIAN, 1915; HILLBOM et al. 2011). A causalidade foi confirmada em estudo posterior (PUDDEY et al. 2005), e na atualidade já é conhecido que o uso excessivo constitui um fator de risco para hipertensão e, por conseguinte, para o AVC hemorrágico e isquêmico (CAICOYA et al. 1999; THRIFT et al. 1999). Porém, ainda não foi elucidado com que frequência e por quais mecanismos a hipertensão, induzida por EtOH, contribui para os diferentes tipos de AVC's (HILLBOM et al. 2011).

Estudos evidenciam a existência de relação linear entre o consumo excessivo de EtOH e a incidência desta patologia, porém devido a heterogeneidade dos resultados é impossível prever o subtipo de AVC, hemorrágico ou isquêmico, prevalente (MAZZAGLIA et al. 2001; PATRA et al. 2010; RONKSLEY et al. 2011). A revisão sistemática mais recente não analisou os riscos separadamente para cada subtipo de AVC, mas confirmou a relação linear entre ambos, e relatou que o risco para as mulheres é maior do que para os homens e os riscos de mortalidade são maiores que os riscos de morbidade (PATRA et al. 2010).

Diante deste cenário, este estudo visa fornecer uma valiosa contribuição na busca de novas possibilidades terapêuticas, através de fármacos com potenciais efeitos neuroprotetores para os danos isquêmicos acentuados pelo consumo precoce e crônico de EtOH, que é considerado uma droga socialmente aceita, e atinge níveis alarmantes no Brasil e no mundo.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Investigar os efeitos neuromotores após bloqueio da ativação microglial com minociclina em ratos submetidos à isquemia focal no córtex motor, quando tratadas cronicamente com EtOH da adolescência a fase adulta.

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Investigar o efeito da exposição crônica ao EtOH em animais isquemiados.
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento farmacológico com MNC em animais isquemiados e isquemiados expostos cronicamente ao EtOH.

Utilizando testes comportamentais investigar nos animais submetidos às condições anteriores alterações:

- ✓ Na locomoção espontânea;
- ✓ No equilíbrio motor;
- ✓ Na coordenação motora;
- ✓ Na força muscular.

III METODOLOGIA

3.1 Animais e Grupos Experimentais

Este estudo foi inicialmente aprovado pelo comitê de ética em pesquisas envolvendo animais da Universidade Federal do Pará (UFPA), recebendo a aprovação sob parecer BIO-CEPAE-UFPA:BIO 007-09 (ver comprovante na página 103), e obedeceu aos critérios e as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais.

Foram utilizados 60 ratos fêmeas adolescentes (35 dias) da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério da UFPA. Estes animais foram encaminhados para Faculdade de Farmácia, UFPA, onde foram 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*. Nas salas onde ocorreram os experimentos comportamentais utilizou-se lâmpadas fluorescentes para iluminação, e houve controle de temperatura (25°C) e ruído.

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.

Para este estudo os 60 animais foram divididos em seis grupos experimentais (quadro 1):

Quadro 1: Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo.

GRUPO	DESCRIÇÃO	NÚMERO
01	Controle - são animais tratados com H ₂ O _{dest.} , submetidos à microinjeção estereotóxica com SSI. Receberam por via i.p. SSI como tratamento pós-isquemia.	10
02	Animais tratados com H ₂ O _{dest.} , submetidos à microinjeção estereotóxica isquêmica com ET-1. Receberam por via i.p. SSI como tratamento pós-isquemia.	10
03	Animais tratados com H ₂ O _{dest.} , submetidos à microinjeção estereotóxica isquêmica com ET-1. Receberam por via i.p. MNC como tratamento pós-isquemia.	10
04	Animais tratados com EtOH, submetidos à microinjeção estereotóxica com SSI. Receberam por via i.p. SSI como tratamento pós-isquemia.	10
05	Animais tratados com EtOH, submetidos à microinjeção estereotóxica isquêmica com ET-1. Receberam por via i.p. SSI como tratamento pós-isquemia.	10
06	Animais tratados com EtOH, submetidos à microinjeção estereotóxica isquêmica com ET-1. Receberam por via i.p. MNC como tratamento pós-isquemia.	10
TOTAL		60

Legenda: ET-1= peptídeo vasoconstritor endotelina-1. H₂O_{dest.} = água destilada. MNC= minociclina.

SSI = solução salina isotônica estéril.

3.2 Tratamento com EtOH

Após a divisão dos grupos experimentais as ratas foram mantidas em caixas próprias em grupos de 5 animais para evitar o estresse pelo isolamento. Os animais adolescentes (35º dia de vida) receberam através de cânula orogástrica, gavage, água destilada ou etanol (Nuclear, Brasil) na dose de 6,5 g/kg/dia (22,5 p/v) (MAIER e WEST, 2001; MAIA et al. 2009) até atingirem a fase adulta (90º dia de vida) (figura 9). As soluções foram administradas em volumes de 1mL/Kg.

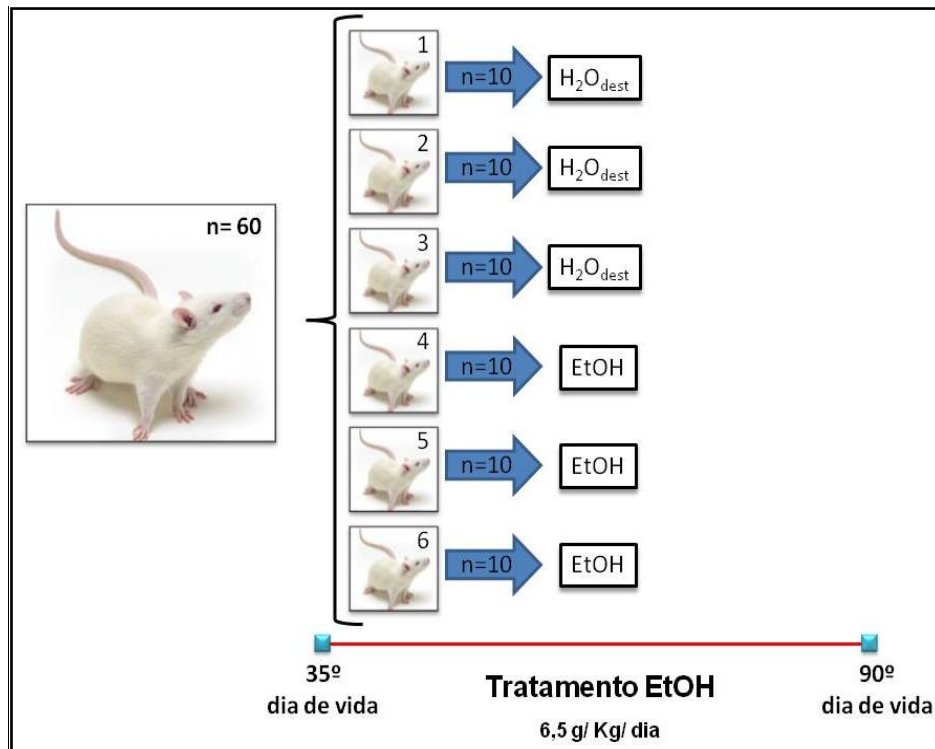


Figura 9: Esquema do tratamento experimental com EtOH – Ao 35º dia de vida as ratas, adolescentes, foram divididas em 06 (seis) grupos com 10 (dez) animais cada, de acordo com o tratamento a ser empregado, sendo 03 (três) grupos H₂O_{dest}. e 03 (três) grupos EtOH, o tratamento foi realizado até o 90º dia de vida, fase adulta.

3.3 Indução de Isquemia Focal Experimental

Ao término dos 55 dias de tratamento com água destilada ou EtOH, os animais foram encaminhados para o LNNE para indução de isquemia focal experimental. Para esta etapa, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (72 mg/Kg) e xilazina (9 mg/Kg), via intraperitoneal (i.p.). Os reflexos corneano e de retirada da pata foram testados antes dos animais serem posicionados em um aparelho estereotático (Insight®, EF-336) (figura 10).



Figura 10: Aparelho estereotáxico. Utilizado para a determinação das coordenadas estereotáxicas e estabelecimento da área para administração de microinjeção de ET-1 ou SSI.
Fonte: Insight®.

A isquemia focal foi induzida em área motora, córtex motor, com microinjeções estereotáxicas do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (ET-1) (Sigma-Aldrich), sendo utilizado 40 pmol de ET-1 diluídos em 1µl de solução salina isotônica estéril (SSI) (HUGHES et al., 2003; HOSSMANN, 2008). Este procedimento já foi realizado em nosso laboratório em trabalho anterior (Souza-Rodrigues et al. 2008).

Para a indução isquêmica, foi realizado inicialmente uma incisão sagital na superfície do crânio, divulsão dos tecidos moles subjacentes, exposição da calota craniana e determinação das coordenadas estereotáxicas. Após o estabelecimento da área de injeção através da estereotaxia, uma pequena abertura na estrutura óssea foi feita, utilizando uma broca esférica carbide nº 05 estéril acoplada a um motor de baixa rotação com refrigeração constante, na tentativa de evitar o aquecimento e destruição tardia do tecido ósseo circundante. Após trepanação óssea, a dura-máter foi removida para se ter uma melhor visualização do córtex cerebral. Em seguida, uma micropipeta de vidro com ponta de 10-20 µm e graduações de 1 µl (Sigma-Aldrich, Hirschmann) foi posicionada de acordo com as coordenadas estereotáxicas de Paxinos (1982) para o córtex motor: 2,3 médio-lateral; 1,2 ântero-posterior; 0,4 dorso-ventral (figura 11).



Figura 11: Animal posicionado no aparelho estereotáxico. (A) Barra auricular introduzida nas orelhas e a presilha (B) imobilizando a cabeça, impedindo movimentos verticais. O maxilar superior é mantido imóvel, uma vez que é pinçado entre a presilha (B) superior e inferior. Exposição da calota craniana (C) para visualização da sutura bregmática e posterior trepanação com broca elétrica. Micropipeta de vidro (D) posicionada no orifício da trepanação, para inoculação de SSI ou ET-1.

Após a microinjeção, a micropipeta permaneceu estacionária por cinco minutos antes de ser retirada lentamente do parênquima cerebral. Em seguida foi feita a limpeza da ferida cirúrgica com SSI, em especial dos detritos presentes sobre a superfície óssea, coaptação das bordas dos tecidos moles e sutura com fio de Nylon nº4.

Para melhor conforto dos animais, utilizou-se uma manta térmica para manter a temperatura corporal estável em 37°C durante todo o procedimento cirúrgico. A temperatura também foi monitorada por meio de um termômetro clínico retal. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com instrumental esterilizado e barreiras de proteção apropriadas a se manter níveis adequados de biossegurança.

3.4 Tratamento com minociclina

Após a cirurgia os animais foram conduzidos para sala de condicionamento na Faculdade de Farmácia, onde foram mantidos em condições padronizadas de temperatura (25°C), exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum*. Os animais permaneceram sete dias nesta sala para realização do tratamento pós-isquemia com minociclina (MNC).

A MNC ou SSI foram administradas de acordo com o protocolo adaptado de Ekdahl et al. (2003). Durante os dois primeiros dias, os animais receberam injeções (i.p.) diárias de 50mg/kg de MNC de 12/12 horas, sendo a primeira injeção administrada 2h após a isquemia focal. A partir do terceiro até o sétimo dia de tratamento foram administrados 25 mg/kg uma vez por dia (figura 12).

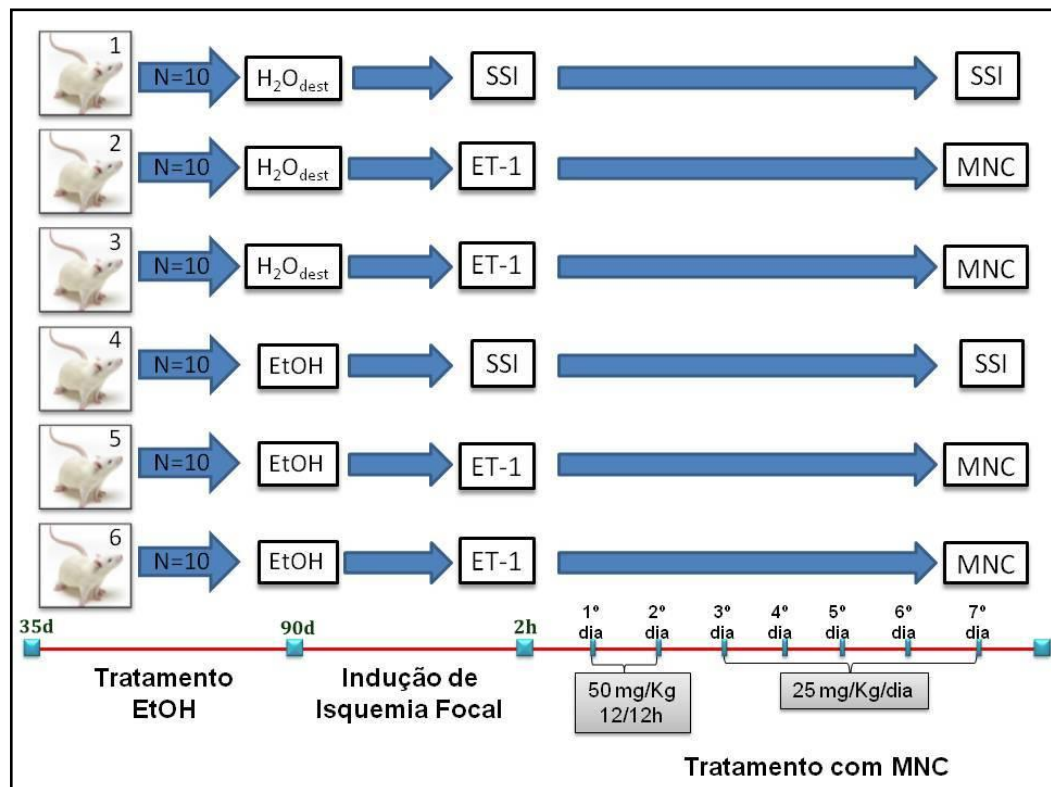


Figura 12: Esquema do tratamento farmacológico com MNC – Inicialmente os animais receberam durante 55 dias EtOH por gavagem, 24h após o término, foi realizada o procedimento cirúrgico para indução da isquemia focal, 2h após a cirurgia se iniciou o tratamento com MNC, por via i.p. No 1º e 2º dia os animais receberam 50 mg/Kg a cada 12h, e 25 mg/Kg/dia do 3º ao 7º dia pós-isquemia.

3.5 Testes Comportamentais

Depois de 24h do término do tratamento farmacológico com MNC ou SSI todos os animais foram encaminhados para o LAFICO, para realização dos testes comportamentais. Os ensaios foram realizados em sala própria, com temperatura controlada (25°C) e atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação (12 lx). Com o objetivo de evitar as variações circadianas que poderiam interferir com os resultados experimentais, todos os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 12:00 h.

3.5.1. TESTE DO CAMPO ABERTO

Neste estudo foi utilizada uma arena semelhante ao aparato conhecido como modelo do campo aberto (AGUIAR, 1995), proposto para avaliar a emocionalidade do animal (HALL, 1934), e amplamente utilizado para avaliar o efeito de drogas e de manipulações genéticas e ambientais sobre os animais (ARCHER, 1973; RAMOS e MORMÈDE, 1998).

A metodologia do campo aberto consiste em mensurar os comportamentos apresentados por um animal em um espaço aberto, que represente novidade para ele e do qual não consegue fugir, por existir paredes ao redor deste espaço. Este modelo permite avaliar tanto medidas de exploração (locomoção, levantamento, farejamento) quanto medidas aversivas (defecação, micção, congelamento) (NAHAS, 1997, 2001).

O campo aberto pode variar no tamanho, na forma (quadrado, retangular ou circular) e nos parâmetros das respostas a serem avaliadas. Desta forma, o teste pode ser utilizado tanto para avaliar o comportamento do animal mediante uma situação de novidade, como para avaliar efeitos de drogas, de lesões, estimulação elétrica do SNC, habituação, bem como a aprendizagem e atividade locomotora, em respostas ao ambiente experimental (AGUIAR, 1995).

Para este teste, foi utilizada uma arena em madeira (100x100x40cm), pintada com material não permeável, na qual o chão foi dividido em 25 quadrantes iguais de 20x20 cm (figura 13).

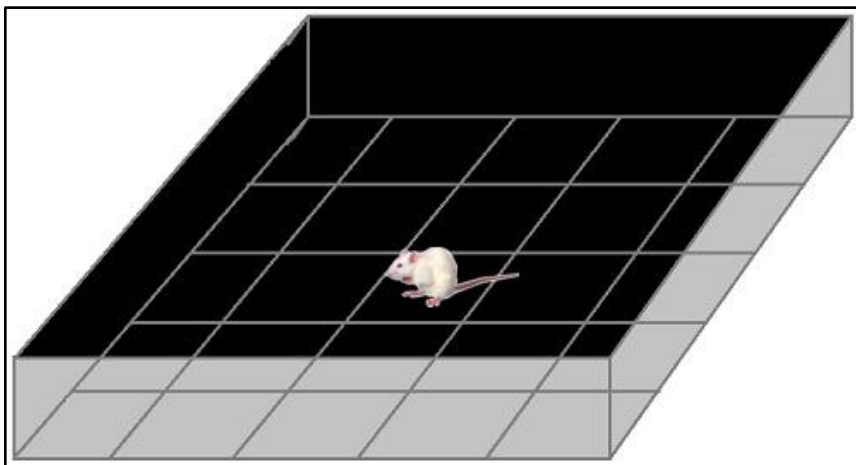


Figura 13: Figura do campo aberto.

A atividade locomotora foi avaliada 24 horas após o término do tratamento farmacológico. Antes do início dos experimentos, os animais foram conduzidos à sala de teste por um período de uma hora para aclimação e habituação ao ambiente do teste. Após habituação, o teste da atividade locomotora foi iniciado. Os animais foram colocados individualmente no quadrante central do campo aberto e foi permitido o livre deslocamento no aparato por 5 minutos. Este teste foi filmado através de filmadora posicionada acima da arena e monitorado por experimentador que não sabia o grupo que estava sendo testado.

Foi contabilizado a locomoção total de cada animal, de acordo com o protocolo de Pandolfo et al. (2007) e Walsh e Cummins (1976), que envolve andar e correr, e que foi mensurada através da contagem do número de quadrantes cruzados pelo animal com as quatro patas. Não foi considerada locomoção quando o animal colocava uma, duas ou três patas em um dos quadrantes, com retorno ao quadrante original. Após este teste, os animais foram submetidos ao teste do plano inclinado.

3.5.2. TESTE DO PLANO INCLINADO

O teste do plano inclinado foi realizado através do método descrito por Rivlin e Tator (1977), desenvolvido para avaliação da função motora em ratos. Devido sua importância para detecção de danos na coordenação motora, equilíbrio e força muscular dos animais, este tem passado por adaptações ao longo dos anos, com a finalidade de melhor adequá-lo a outras doenças neurológicas que acarretam dano motor. Inicialmente este teste foi empregado para avaliação de dano medular (MURPHY et al. 1995; MELCER et al. 1995). A pontuação atribuída ao animal é o ângulo máximo do plano que o animal pode manter por 5 segundos, sem deslizar para fora da superfície.

O aparato utilizado neste teste era constituído por duas plataformas retangulares de madeira compensada unidas por uma dobradiça. Uma das plataformas era a base e a outra, um plano inclinado móvel, este era revestido de borracha para permitir a aderência e movimentação do animal (figura 14). O animal foi colocado sobre o plano móvel em ângulo 0°. Este ângulo de inclinação foi gradativamente aumentado de zero grau até o ângulo máximo em que o rato não podia mais se manter na posição por 5 segundos (a cada 5 segundos o ângulo de inclinação da plataforma era aumentado em 5 graus), adaptado de Murphy et al. (1995). Após o término do teste do plano inclinado, os animais foram submetidos ao teste do rota-rod.

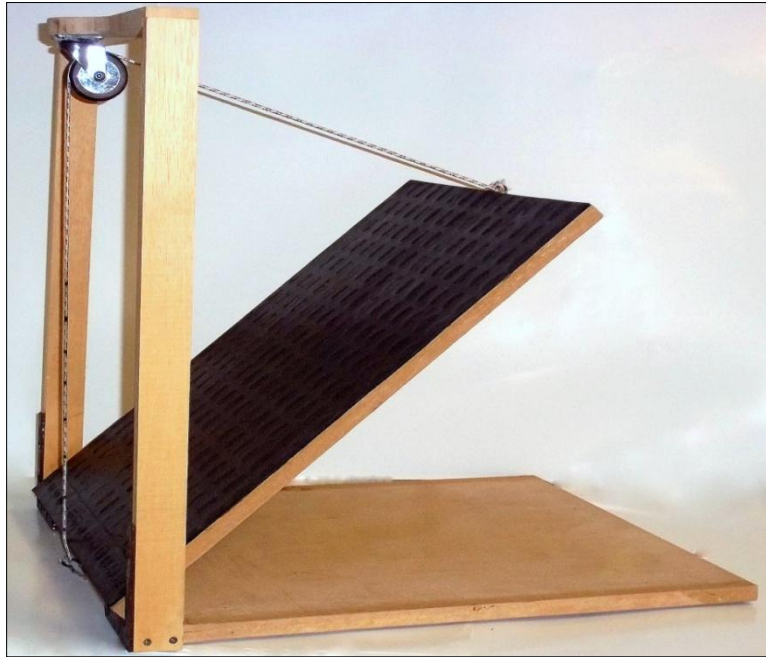


Figura 14: Figura do plano inclinado.

3.5.3. TESTE DO ROTA-ROD

O teste do rota-rod foi introduzido por Dunham e Miya (1957) para avaliar, coordenação motora e equilíbrio em roedores, nesta versão do teste os animais eram colocados sobre um cilindro giratório de rotação fixa. Mais tarde, Jones e Robert (1968) desenvolveram outra versão do teste, em que a rotação do cilindro era acelerada ao longo do experimento. Segundo os autores, a nova versão elimina a necessidade de treinamento extensivo.

O rota-rod é um dos testes mais utilizados para avaliar a função motora dos roedores, por ser considerado um dos mais sensíveis para isto. Neste experimento, foi empregado um aparelho automatizado (Insight®, EFF-411), instalado em uma sala fechada e mantida à temperatura de aproximadamente 25°C. O aparelho consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro giratório de 8 cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do chão, e mantido em rotação através de um motor. A caixa era dividida em 4 baias, de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo análise de 4 animais simultaneamente (figura 15).



Figura 15: Figura do rota-rod.
Fonte: Insight®.

Para permanecer sobre o cilindro giratório, o animal necessitava se locomover, deste modo a função motora foi quantificada cronometrando o tempo de permanência do rato sobre o cilindro.

Para a habituação, os animais foram colocados no cilindro giratório por um período de 180 segundos a 16 rotações por minuto. Quando ocorria a queda do animal, este era reposicionado no cilindro quantas vezes fossem necessárias até a finalização do tempo estipulado (180 segundos). Após o treinamento, o teste foi realizado em três exposições, com intervalo de 60 segundos entre cada exposição. O tempo limite do teste foi 180 segundos (adaptado de Sharma et al. 2009).

A figura 16 demonstra o esquema dos procedimentos adotados no estudo, delineando desde o tratamento com EtOH até os testes experimentais com os animais adultos. A ilustração mostra também a sequência dos testes realizados, que teve início com a atividade locomotora espontânea (no campo aberto) e foi finalizado com o teste do rota-rod.

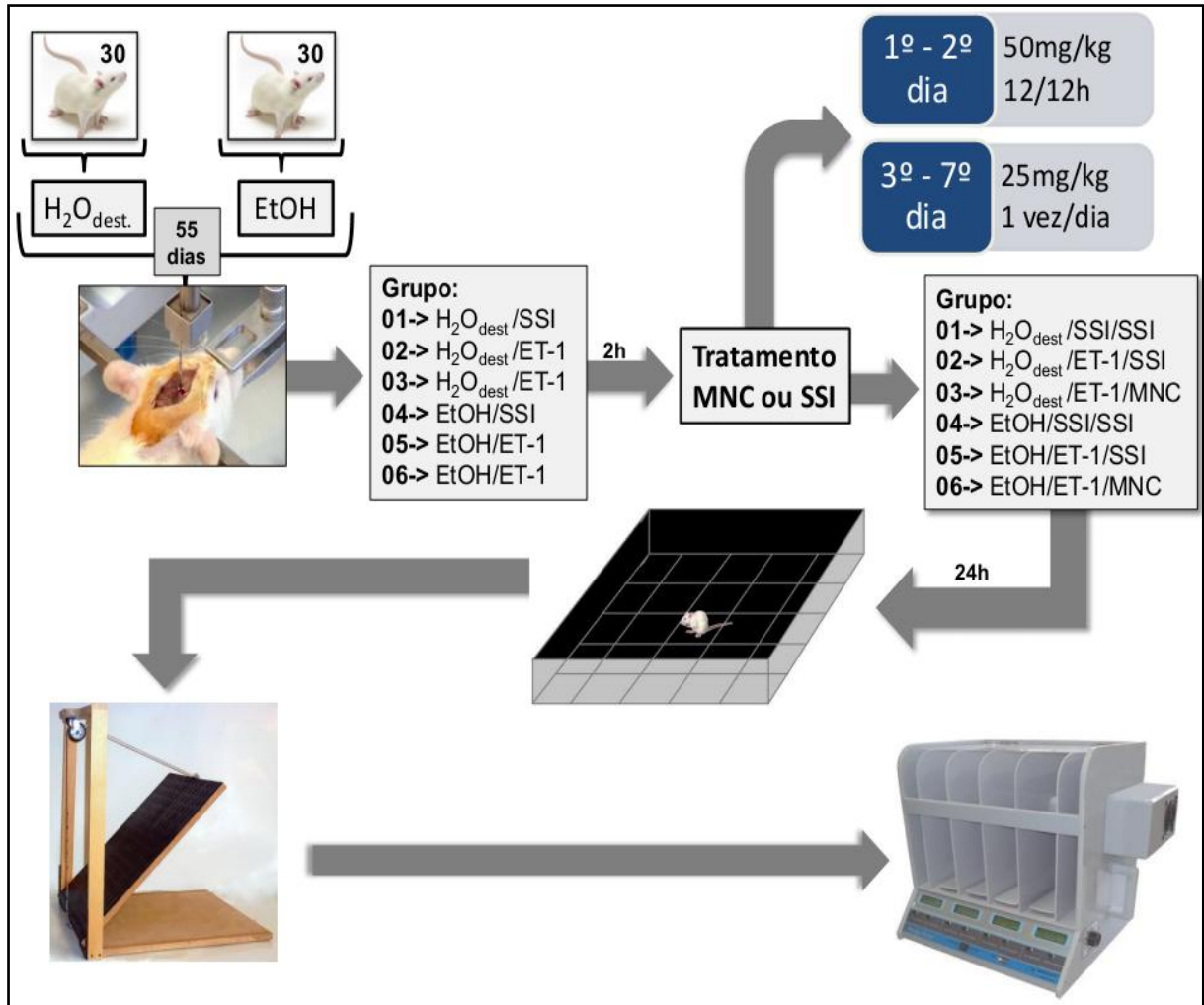


Figura 16: Delineamento experimental do estudo. Inicialmente os animais receberam por gavage H₂O_{dest.} ou EtOH, da adolescência a fase adulta, por 55 dias. Após o tratamento os animais foram encaminhados para cirurgia, indução da isquemia focal. 2 horas após o término do procedimento cirúrgico o tratamento farmacológico com MNC ou SSI foi administrado, por 07 dias consecutivos. Depois de 24 horas do término do tratamento farmacológico os testes comportamentais foram realizados: campo aberto, plano inclinado e rota-rod.

3.6 Análise estatística

Todos os dados dos testes comportamentais foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via. Para as comparações múltiplas *post hoc* utilizou-se o teste de Tukey. O teste de Kruskal-Wallis para comparação das medianas entre os grupos. Os dados de cada grupo experimental foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) de 10 animais. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de $p < 0,05$. A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0.

IV RESULTADOS

4.1 Campo Aberto

Na figura 17 são apresentados os resultados da atividade locomotora espontânea, o número total de quadrantes cruzados, dos grupos experimentais. No teste o grupo isquêmico (grupo 02) apresentou locomoção inferior a do grupo controle (grupo 01) ($F_{(5,59)} = 4,96$; $p < 0,01$). A redução da atividade locomotora foi intensificada nos animais expostos cronicamente ao EtOH e posteriormente isquemiados (grupo 05), sendo esta inferior a observada no grupo 02 ($F_{(5,59)} = 5,54$; $p < 0,001$) e no controle ($F_{(5,59)} = 10,50$; $p < 0,0001$). Entretanto, o EtOH quando administrado isoladamente aos animais (grupo 04), não promoveu alteração do parâmetro avaliado, se comparado ao controle.

O tratamento farmacológico com MNC do grupo isquêmico (grupo 03) reverteu o déficit locomotor observado no grupo 02 ($F_{(5,59)} = 5,95$; $p < 0,001$), e possibilitou a obtenção de resultado similar ao do grupo controle.

A MNC foi capaz de reverter o dano locomotor mesmo no grupo EtOH/isquemiado (grupo 06), deste modo número total de quadrantes cruzados foi igual ao do grupo controle, e superior ao dos grupo 05 ($F_{(5,59)} = 11,23$; $p < 0,0001$) e 02 ($F_{(5,59)} = 5,68$; $p < 0,001$).

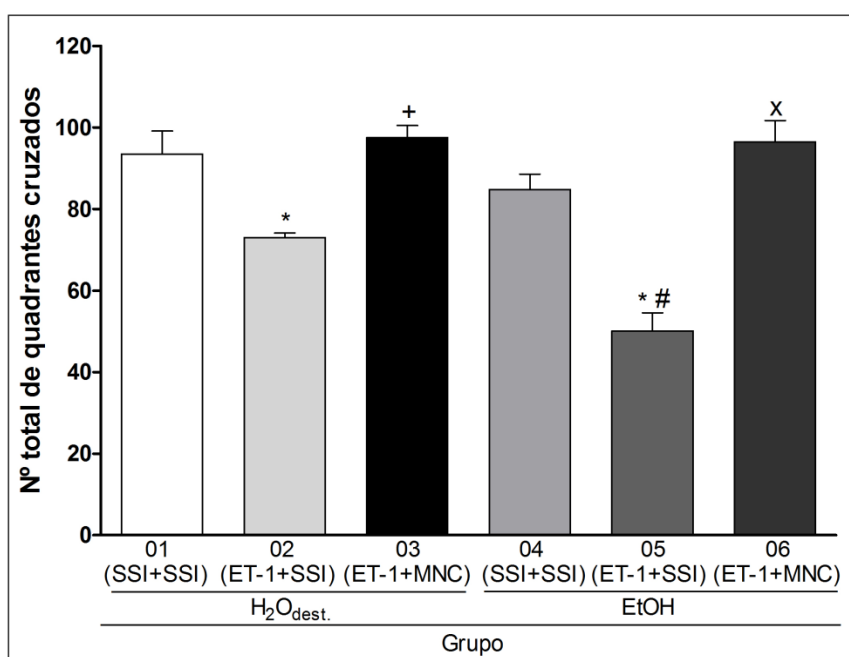


Figura 17: Efeitos do tratamento com MNC sobre os prejuízos na locomoção espontânea de ratos submetidos à isquemia focal e expostos cronicamente ao EtOH da adolescência a fase adulta. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m do número total de cruzamentos no teste do campo aberto, durante 5 min., de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 01. + $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 02. # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 04. x $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 05.

4.2 Plano Inclinado

A figura 18 ilustra quantitativamente o resultado dos parâmetros, força muscular e equilíbrio motor, avaliados neste teste através do ângulo de queda dos grupos experimentais. Os grupos isquemiado (grupo 02), EtOH (grupo 04) e EtOH/isquemiado (grupo 05) atingiram menor ângulo de queda que o grupo controle ($F_{(5,59)} = 7,16$; $p < 0,0001$; $F_{(5,59)} = 7,64$; $p < 0,0001$; $F_{(5,59)} = 10,5$; $p < 0,0001$, respectivamente).

A exposição prolongada ao EtOH (grupo 04) prejudicou o desempenho dos animais no teste, e consequentemente atingiram ângulo inferior ao do grupo controle ($F_{(5,59)} = 7,64$; $p < 0,0001$).

O tratamento com MNC dos animais isquemiados (grupo 03) foi capaz de reverter os danos nos parâmetros analisados, permitindo a estes atingir ângulo semelhante ao grupo controle, e consequentemente superior ao dos grupos: 02 ($F_{(5,59)} = 8,12$; $p < 0,0001$), 05 ($F_{(5,59)} = 11,46$; $p < 0,0001$) e 04 ($F_{(5,59)} = 8,60$; $p < 0,0001$). A MNC apresentou o mesmo efeito quando administrada em animais expostos cronicamente ao EtOH e posteriormente isquemiados, isto ângulo semelhante ao grupo controle e superior ao dos grupos: 02 ($F_{(5,59)} = 8,12$; $p < 0,0001$), 05 ($F_{(5,59)} = 11,46$; $p < 0,0001$) e 04 ($F_{(5,59)} = 8,60$; $p < 0,0001$). Portanto, o tratamento farmacológico dos grupos 03 e 06 foi capaz de reverter os danos ocasionado pela lesão isquêmica, mesma quando em presença de exposição crônica ao neurotóxico em estudo.

Neste teste o EtOH não intensificou os danos, na força muscular e equilíbrio motor, nos animais isquemiados (figura 05).

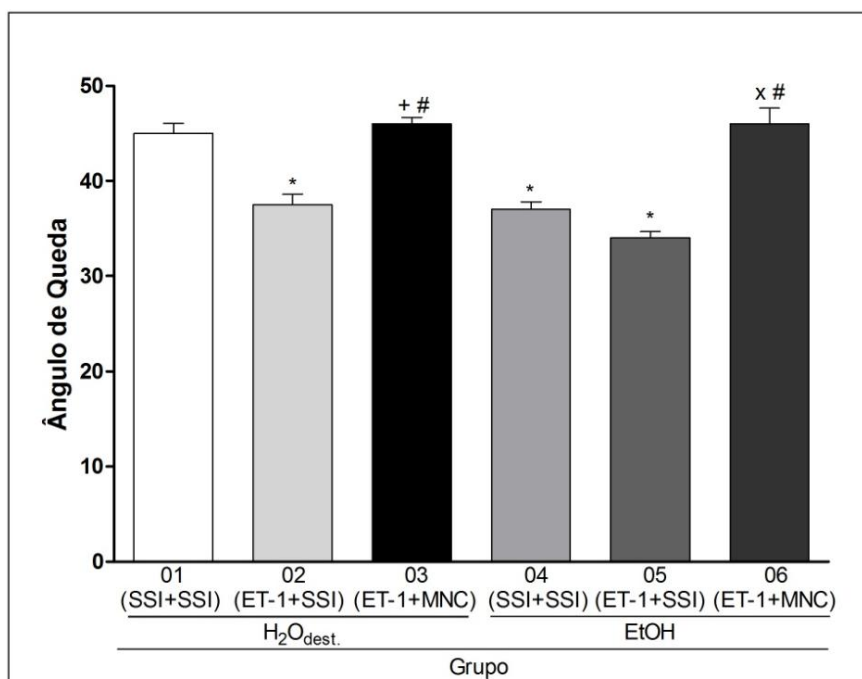


Figura 18 Efeitos do tratamento com MNC sobre os prejuízos no equilíbrio e força muscular de ratos submetidos à isquemia focal e expostos cronicamente ao EtOH da adolescência a fase adulta. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m do ângulo de queda no teste do plano inclinado de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 01. + $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 02. # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 04. x $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 05.

4.3. Rota-Rod

No teste do rota-rod os grupos experimentais foram expostos quatro vezes ao cilindro giratório, com um intervalo de 60 segundos entre as exposições. A primeira exposição consistiu na adaptação dos animais ao aparato, nas exposições seguintes avaliou-se a coordenação motora e o equilíbrio destes animais, o parâmetro avaliado foi o tempo de permanência sobre o cilindro giratório, latência (adaptado de SHARMA et al. 2009).

A figura 19 contém os resultados da fase de adaptação ao rota-rod. Nesta etapa do teste os grupos tratados com MNC (grupo 03 e 06) permaneceram mais tempo sobre o cilindro giratório, sendo que o grupo 03 superou até mesmo o grupo controle ($F_{(5,59)} = 4,71$; $p < 0,01$).

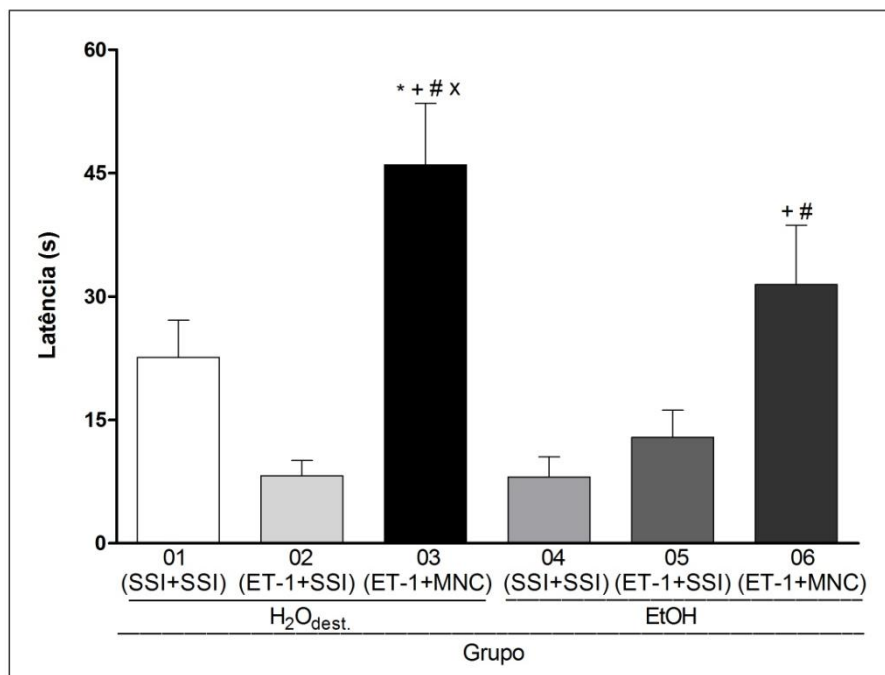


Figura 19: Efeitos do tratamento com MNC sobre os prejuízos na aprendizagem motora de ratos submetidos à isquemia focal e expostos cronicamente ao EtOH da adolescência a fase adulta. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m da latência no teste do rota-rod, durante 180 s., de 10 animais por grupo. Adaptação. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 01. + $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 02. # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 04. x $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 05.

Na figura 20 estão os resultados da primeira exposição (teste 1), após adaptação, ao aparato. Nesta etapa o EtOH isoladamente (grupo 04) não implicou em aumento do déficit motor, quando comparados ao grupo grupo controle. Os animais expostos ao EtOH e submetidos a lesão isquêmica (grupo 05) apresentaram o mesmo tempo de latência que os animais isquêmicos (grupo 02), sendo este tempo inferior ao dos grupos 04 ($F_{(5,59)} = 7,65$; $p < 0,0001$ e $F_{(5,59)} = 6,84$; $p < 0,0001$, respectivamente) e controle ($F_{(5,59)} = 11,66$; $p < 0,0001$ e $F_{(5,59)} = 10,85$; $p < 0,0001$, respectivamente).

O grupo 03 atingiu o tempo máximo estipulado ao teste, 180 s, sendo este resultado superior ao dos grupos: 02 ($F_{(5,59)} = 11,26$; $p < 0,0001$), 05 ($F_{(5,59)} = 12,07$; $p < 0,0001$) e 04 ($F_{(5,59)} = 4,42$; $p < 0,01$), mas semelhante a latência do grupo controle; bem como o grupo 06, que também atingiu o tempo de 180 s, o qual foi superior a dos grupos: 02 ($F_{(5,59)} = 11,26$; $p < 0,0001$), 05 ($F_{(5,59)} = 12,07$; $p < 0,0001$) e 04 ($F_{(5,59)} = 4,42$; $p < 0,01$) e similar ao do grupo controle.

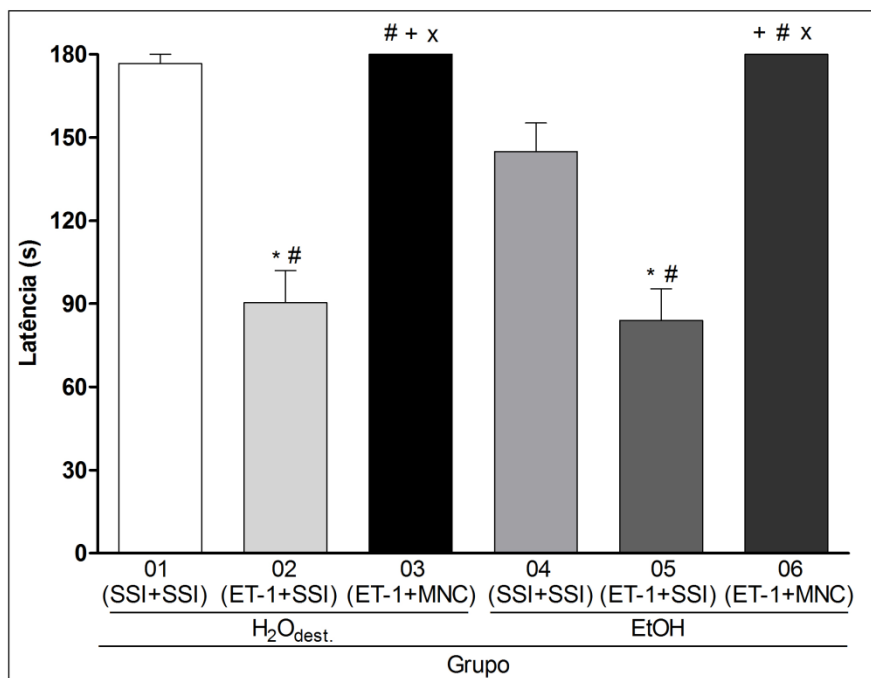


Figura 20: Efeitos do tratamento com MNC sobre os prejuízos na coordenação motora e equilíbrio de ratos submetidos à isquemia focal e expostos cronicamente ao EtOH da adolescência a fase adulta. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m da latência no teste do rota-rod, durante 180 s., de 10 animais por grupo. Teste 1. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 01. + $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 02. # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 04. x $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 05.

Os resultados do teste referente à segunda (teste 2) e terceira (teste 3) exposição ao cilindro giratório são apresentados na figura 21.

No teste 2 (figura 21-A), os grupos 03 e 06 atingiram o mesmo tempo de latência, 180 s, o qual também foi igual ao dos grupos: 02, 04 e controle. Nesta etapa o tempo de permanência do grupo 05 sobre o cilindro foi inferior ao dos grupos: controle, 03, 04 e 06 (KW = 32,50; $p < 0,0001$).

A figura 21-B representa o resultados dos grupos experimentais obtidos na ultima exposição ao rota-rod, teste 3, na qual o grupo 05 foi o único que não conseguiu permanecer por 180 s sobre o cilindro giratório, logo sua latência foi inferior a dos grupos: controle, 02, 03, 04 e 06 (KW = 28,37; $p < 0,0001$).

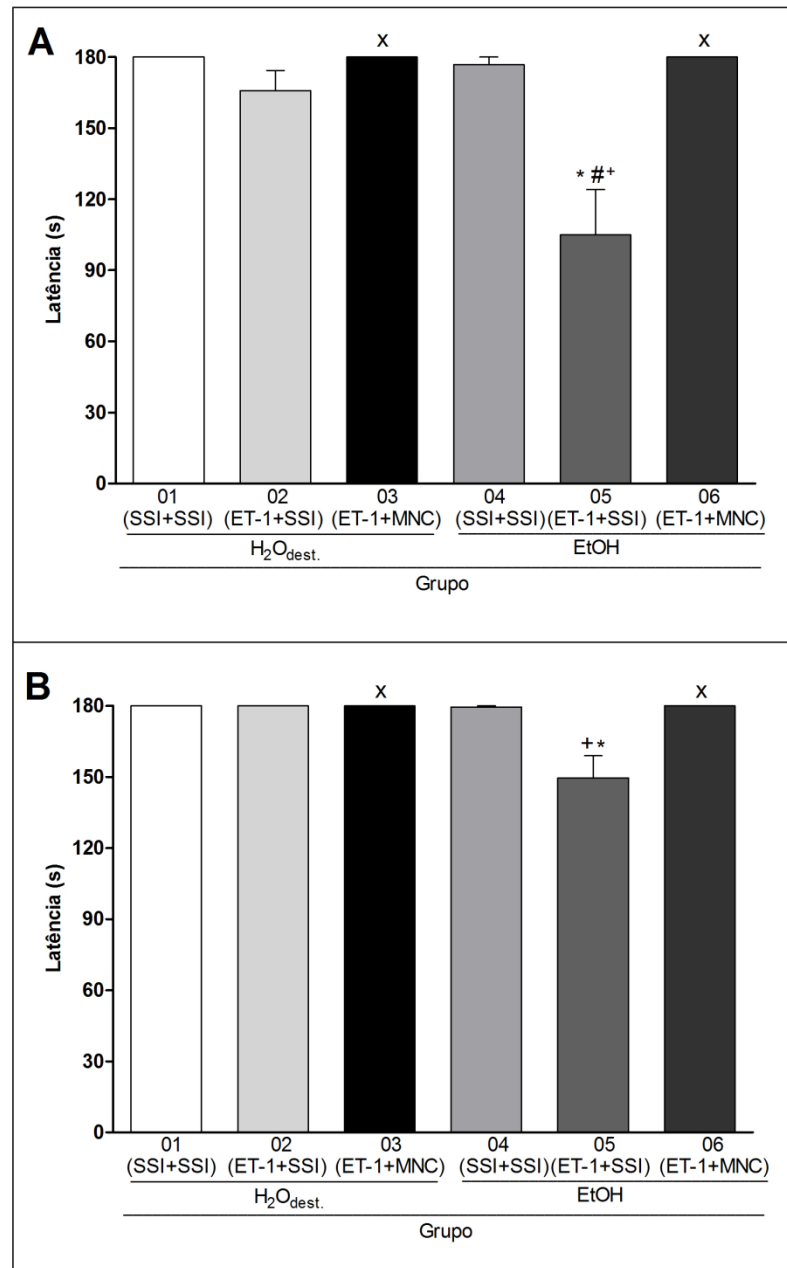


Figura 21: Efeitos do tratamento com MNC sobre os prejuízos na coordenação motora e equilíbrio de ratos submetidos à isquemia focal e expostos cronicamente ao EtOH da adolescência a fase adulta. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m da latência no teste do rota-rod, durante 180 s., de 10 animais por grupo. (A) Teste 2 e (B) Teste 3. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 01. # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 04. x $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo 05. Teste de Kruskal-Wallis.

V DISCUSSÃO

No modelo experimental em questão, foi investigada a hipótese de que a modulação da resposta microglial após a isquemia reduz os danos ocasionados pelo AVC em área motora de ratos expostos cronicamente ao EtOH, como possibilidade terapêutica foi utilizada a MNC, fármaco que em diversos estudos experimentais apresentou capacidade de reduzir a ativação e proliferação microglial, exibindo efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios, pós-isquemia e em diversas outras doenças neurais (YRJANHEIKKI et al. 1998; YRJANHEIKKI et al. 1999; BLUM et al. 2004; YONG et al. 2004; DOMERCQ e MATUTE, 2004; STIRLING et al. 2005; HEWLETT e CORBETT, 2006; HAYAKAWA et al. 2008; KIM & SUH, 2009).

Para investigar os efeitos do EtOH isolado ou associado a lesão isquêmica e ao tratamento farmacológico, foram utilizados testes neurocomportamentais, que avaliaram a locomoção, coordenação, equilíbrio e força motora. Afinal, o SNC é o responsável por originar as diferentes formas de comportamento, assim, a análise comportamental pode ser considerada a maneira mais elementar para avaliação das funções neurais (WHISHAW, HAUN e KOLB, 1999).

A partir da análise comportamental dos animais expostos ao EtOH e submetidos a isquemia, foi possível observar que houve redução na locomoção, a qual foi mais intensa nestes, do que nos animais submetidos apenas à isquemia. Este fato deve-se ao consumo crônico da droga, haja vista que esta causa prejuízos a vassorreatividade cerebral, ocasionando redução do fluxo sanguíneo, que associado ao AVC causa aumento da área de infarto, intensificando o dano cerebral isquêmico, e consequentemente os danos motores (ENGELHORN et al. 2004 e 2005; SUN et al. 2008).

Os animais que consumiram apenas EtOH, não apresentaram redução na locomoção, embora a depressão locomotora fosse esperada, uma vez que o período de exposição a este neurotóxico foi suficiente para exercer seu efeito depressor sobre o SNC (CRABBE, 1983; DUDEK e PHILLIPS, 1990; LINSENBARDT et al. 2011). Porém, a fase da vida, na qual ocorreu a exposição, pode ser responsável pelo resultado obtido, pois de acordo com estudo anterior o consumo prolongado de EtOH durante a adolescência não altera a atividade locomotora dos animais na fase adulta (STANSFIELD e KIRSTEIN, 2007), isto foi relacionado ao fato de que o cérebro adolescente foi capaz de amenizar as mudanças morfológicas induzidas em astrócitos e neurônios (EVRARD et al. 2006).

Entretanto o EtOH tem sido relacionado a amplificação do dano isquêmico, atuando por mecanismos diversos, dentre estes o estresse oxidativo tem se destacado (EVRARD et al., 2006). Estudos sugerem que o consumo desta droga induz estresse oxidativo por aumentar a produção de ERO's e diminuir a capacidade antioxidante do organismo (MONTOLIU et al. 1994; OMODEO-SALE, GRAMIGNA e CAMPANIELLO, 1997; AGAR et al. 1999; SUN et al. 2001; SUN et al. 2006). Devido à alta reatividade, as ERO's provocam danos a lipídeos, DNA e proteínas, levando à morte neuronal. Estas espécies também contribuem para a ruptura da BHE e para o aumento do edema cerebral (KONDO et al. 1997; GASCHÉ et al. 2001).

Outro mecanismo que pode estar associado à potencialização dos efeitos nocivos do AVCi pelo EtOH, envolve a excitotoxicidade do Glu. Este aminoácido excitatório é liberado em concentrações elevadas no tecido cerebral hipoperfundido. Nesta região, o Glu ativa receptores que acarretam influxo massivo de Ca^{2+} ativando um grande número de processos catabólicos que poderão causar morte celular. O aumento intracelular de Ca^{2+} induz ao aumento de Glu extracelular, consequentemente propaga a excitotoxicidade. A ativação destes receptores, principalmente o subtipo NMDA, promove ainda o influxo de Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- , acúmulo de água, expansão celular e edema citotóxico. O consumo crônico desta droga durante a adolescência faz com que os sistemas neurotransmissores sofram mudanças importantes, como por exemplo, regulação positiva dos GluRs e regulação negativa dos receptores GABA (SUN; PATEL e MAYHAN, 2002; JUNG, GATCH e SIMPKINS, 2005).

No intuito de reduzir estes danos, foi realizado o tratamento farmacológico dos animais isquemiados com MNC, já que YRJANHEIKKI et al. (1999) demonstraram, que em cultura de neurônios tratados com este fármaco, a morte celular devido a excitotoxicidade do Glu foi significativamente atenuada. Além disso, foi demonstrado também que este fármaco foi capaz de inibir a indução da enzima conversora de IL-1 (caspase-1), e reduzir a expressão de COX-2, bem como a produção de prostaglandina E2 em modelo de isquemia focal em ratos (YRJANHEIKKI et al. 1998; YRJANHEIKKI et al. 1999). Em outro estudo este fármaco foi capaz de inibir a liberação de citocromo c da mitocôndria, o que reduziu a morte celular por apoptose (ZHU et al. 2002). Relata-se também, que a MNC reduz a produção de MMP's e inibe sua ativação (PAEMEN et al. 1996; BRUNDULA et al. 2002). Embora seus mecanismos de ação ainda estejam sendo elucidados, é

tentador especular que ao interferir simultaneamente na cascata inflamatória, radicais livres, MMP's, Glu e outras moléculas, este fármaco exerce efeito neuroprotetor, e deste impede o aumento da zona de infarto pós-AVCi.

O amplo mecanismo de ação diferencia a MNC das propostas terapêuticas anteriores (antagonistas de Glu, bloqueadores de canal de Ca^{2+} , agonistas GABAérgicos, dentre outras), as quais tinham um único alvo farmacológico, deste modo, outros mecanismos prejudiciais permaneciam intactos, e por isso não apresentaram efeito neuroprotetor, o qual é observado com o uso do fármaco em estudo (WELLS et al. 2003).

Neste trabalho, a MNC promoveu a melhora na locomoção dos grupos tratados (grupo 03 e 06) de maneira similar, sendo os animais expostos ao EtOH ou não. Esta melhora pode estar relacionada com a redução da área infartada, uma vez que a administração deste fármaco reduz a área de infarto em 50% e a inflamação associada, atenuando os déficits funcionais induzidos pelo AVC, através da inibição da atividade microglial (LIU et al. 2007).

Para avaliar a força, coordenação e equilíbrio motor dos animais experimentais foram empregados o teste do rota-rod e do plano inclinado. O plano inclinado foi escolhido por ser um teste quantitativo, objetivo e suficientemente sensível para detectar déficits da função motora em modelos experimentais de AVC (YONEMORI et al. 1998). Quando se objetiva avaliar equilíbrio e coordenação motora, mais de um teste comportamental sensório-motor deve ser escolhido, para que se capture diversos aspectos relacionadas ao foco do estudo (CRABBE, WAHLSTEN e DUDEK, 1999). Por este motivo, foi empregado o teste do rota-rod, visto ser um teste amplamente utilizado devido sua capacidade em avaliar equilíbrio e coordenação motora em roedores (JONES e ROBERTS, 1968; PAZAITI et al. 2009). Neste teste é observado o aumento da latência (tempo de queda do animal), e este parâmetro avalia o progresso no desempenho motor dos animais (BUITRAGO et al. 2004).

No teste do plano inclinado, o grupo exposto ao EtOH (grupo 04) e o EtOH/isquemiado (grupo 05) apresentaram ângulo de queda inferior ao obtido pelo controle, o mesmo foi observado no grupo isquemiado (grupo 02). Todos esses déficits podem ser atribuídos à lesão neuronal que afeta áreas sensório-motoras. A área motora cortical de roedores, o córtex anterior dorsal, inclui áreas correspondentes ao membro posterior e a pata dianteira que são quase sempre

danificados por isquemia, resultando em perda de força muscular (WAHL et al. 1992). O tratamento dos animais isquemiados e EtOH/isquemiado (grupo 03 e 06, respectivamente) com MNC, foi capaz de reverter o dano motor, possibilitando a estes animais atingirem ângulos semelhantes ao controle. Este desempenho mantém relação com a redução do edema cerebral (TOMINAGA e OHNISHI, 1989), pois como evidenciado em outros estudos, o tratamento de roedores com MNC induziu cerca de 65% de diminuição da área de infarto cortical e cerca de 45% de diminuição na área de infarto estriatal (YRJANHEIKKI et al., 1998; YRJANHEIKKI et al., 1999). Este fármaco também foi capaz de aumentar a neurogênese endógena no cérebro adulto após AVC experimental, repercutindo positivamente no desempenho comportamental dos animais (LIU et al., 2007; LAMPL et al., 2007).

A elevada vulnerabilidade dos neurônios recém-gerados à inflamação pode ter implicações negativas para a neurogênese em outras áreas do cérebro (ZHAO et al. 2003), como áreas encefálicas relacionadas à organização e ao controle do movimento: M1, AMS, APM e motora cingular (HE et al. 1993; KURATA, 1994; WISE, 1996). Essas áreas influenciam vias descendentes e interneurônios medulares através de suas conexões com o tronco encefálico, núcleos da base e cerebelo para possibilitar a ocorrência do movimento (GRILLNER e WALLEN, 1985; NAIR et al., 2003). O cerebelo, juntamente com o estriado, é um componente de circuitos cortical-subcorticais envolvidos em aspectos distintos do aprendizado e controle motor (MIDDLETON e STRICK, 2002). As alterações inflamatórias nestas regiões poderiam suprimir a neurogênese e contribuir para a progressão da doença (EKDAHL et al. 2003). Além disso, mais de 80% dos novos neurônios estriatais que são gerados a partir da zona subventricular, em ratos pós-AVC, morrem nas primeiras semanas (ARVIDSSON et al. 2002). O bloqueio e /ou inibição da ativação micrógliar é uma possível estratégia para melhorar a eficácia dos precursores neuronais endógenos, em distúrbios neurodegenerativos e no AVC (EKDAHL et al. 2003).

Baseado nestas informações, e observando os resultados apresentados no teste do rota-rod, na fase adaptação, pelo grupo isquemiado tratado com MNC (grupo 03), acredita-se que este fármaco atue positivamente em regiões encefálicas relacionadas a aprendizagem motora, como o cerebelo e estriado, amenizando os danos difusos decorrentes do AVCi. Nesta etapa dos teste, todos os animais expostos ao EtOH (isquemizados ou não), tiveram a aprendizagem motora

comprometida, pois a exposição crônica a esta droga provoca alterações estruturais em diversas regiões do cérebro, causando deficiência na expressão de proteínas relacionadas com funcionamento do citoesqueleto, NF-200 e MAP-2, sinapses e ciclo celular, e muitas destas proteínas estão envolvidas na formação e manutenção de novos neurônios e conexões sinápticas, eventos que estão criticamente envolvidos com a neurogênese, e por conseguinte com o reparo de dano tecidual (CARPENTER e CHANDLER, 2007; CREWS et al. 2007.; HARGREAVES et al. 2009).

Após a fase de adaptação, os animais foram reexposto três vezes ao aparato, e em todas as fases os grupos tratados com MNC (grupos 03 e 06) exibiram coordenação motora e equilíbrio similar ao grupo controle, evidenciando a capacidade deste fármaco em reverter os déficits motores analisados. Nesta fase, a MNC foi capaz de reverter os danos mesmo em presença de EtOH, devido o envolvimento de vias diferentes das que estão relacionadas com o aprendizado motor.

Na fase de teste 2 e 3, no rota-rod, todos os grupos permaneceram por 180 s sobre o cilindro, exceto o grupo 05 (EtOH/isquêmico), no qual os efeitos deletérios do EtOH agravou o dano isquêmico, reduzindo o tempo de permanência destes animais sobre o aparato. Crews et al. (2004), sugeriram que o aumento progressivo do consumo de EtOH induz alterações nas estruturas do cérebro levando a redução do controle comportamental, promovendo o uso abusivo e ainda a neurodegeneração.

Tem sido sugerido que o EtOH pode aumentar a formação de ERO's através da indução do citocromo P-450_{2E1} (CYP2E1), que é amplamente distribuído no cérebro. As ERO's formadas a partir destes sistemas são uma fonte de estresse oxidativo (MONTOLIU et al. 1994;). Uma correlação entre a indução de CYP2E1, aumento da formação de ERO's e redução das enzimas antioxidantes, foi mostrado no cérebro de ratos expostos cronicamente ao EtOH (MONTOLIU et al. 1994; ROUACH et al. 1997; YANG e CEDERBAUM, 1997; BAILEY et al. 2001). Portanto, considerando o fato de que o dano oxidativo é um importante mecanismo pelo qual o EtOH agrava o dano isquêmico, foi explorada a possibilidade de que a MNC poderia proteger os novos neurônios, bem como aumentar a neurogênese endógena no cérebro adulto após AVC experimental (EVRARD et al. 2006; LIU et al. 2007), e com

isto favorecer a melhora dos animais isquemiados, mesmo quando expostos cronicamente ao EtOH, desta forma melhorando os indicadores comportamentais.

VI CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que:

- Todos os animais submetidos à lesão isquêmica focal apresentaram déficits na função motora. Entretanto, em presença do EtOH, estes efeitos foram exarcebados no testes do campo aberto e do rota-rod;
- A presença de EtOH não exarcebou os danos associados a força muscular e equilíbrio motor, avaliados no teste do plano inclinado;
- Nas condições do presente estudo, a MNC foi capaz de reverter os déficits motores induzidos por isquemia cerebral focal em ratos expostos cronicamente ao EtOH, de forma semelhante ao observado em ratos isquemizados, não expostos ao neurotóxico.

O conjunto de resultados apresentados neste estudo evidenciam a necessidade de estudos complementares que possam investigar as vias pelas quais a MNC minimiza/reverte os danos do AVC, mesmo em presença de EtOH. Em estudos posteriores é importante levar em consideração a hipótese de que a este fármaco exerça influências positivas sobre a neurogênese endógena, o que parece ser relevante no processo de recuperação motora. Assim, torna-se necessário a utilização de métodos bioquímicos e imunoistoquímicos que possam explicar essas respostas comportamentais encontradas e possíveis mecanismos de dano. Além disso, estudos futuros, utilizando tempos de sobrevida mais longos após bloqueio micrógliol, são necessários para verificar se os efeitos encontrados são duradouros.

VII REFERÊNCIAS

ADAMS, H.P.; BENDIXEN, B.H.; KAPPELLE, L.J.; BILLER, J.; LOVE, B.B.; GORDON, D.L.; MARSH, E.E. **Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical Trial. TOAST.** Trial of Org in Acute Stroke Treatment. Stroke. 24: 35-41; 1993.

ADKINS, D.L.; BOYCHUK, J.; REMPLE, M.S.; KLEIM, J.A. **Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord.** J Appl Physiol. 101: 1776-82; 2006.

AGAR, E.; BOSNAK, M.; AMANVERMEZ, R.; DEMIR, S.; AYYILDIZ, M.; CELIK, C. **The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat.** Neuroreport. 10: 1799–1801. 1999.

AGUIAR, M.S.S. **Análise do Comportamento Defensivo Induzido pela Microinjeção do Neuropeptídeo Substância P na Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal de Ratos.** Departamento de Psicologia e Educação, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1995.

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. 2011; 48(1): 19-47.

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

ANTONENKO, Y.N.; ROKITSKAYA, T.I.; COOPER, A.J.; KRASNIKOV, B.F. **Minocycline chelates Ca^{2+} , binds to membranes, and depolarizes mitochondria by formation of Ca^{2+} -dependent ion channels.** J Bioenerg Biomembr. 42:151–163. 2010.

ARCHER, J. **Tests for emotionality in rats and mice: a review.** Anim. Behav. 21: 205–235. 1973.

ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. **Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury.** Cellular and Molecular Life Sciences. 61: 657-668; 2004.

ARVIDSSON, A; COLLIN, T; KIRIK, D; KOKAIA, Z; LINDVALL, O. **Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke.** Nat Med. 2002; 8: 963-970.

ASANUMA, H.; PAVLIDES, C. **Neurobiological basis of motor learning in mammals.** Neuro Report. 8(4): R1-R6. 1997.

ASTRUP, J.; SIESJÖ, B.K.; SYMON, L. **Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra.** Stroke; 12: 723–725; 1981.

AURIEL, E.; BORNSTEIN, N. **Neuroprotection in acute ischemic stroke – current status.** Journal of Cellular and Molecular Medicine. 14: 2200–2202; 2010.

BAILEY, S.M.; PATEL, V.B.; JOVEM, T.A.; ASAYAMA, K.; CUNNINGHAM, CC. **Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver.** Clin Alcohol Exp Res. 25: 726-733; 2001.

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

BATES, M.E.; BRICK, J.; WHITE, H.R. **The correspondence between saliva and breath estimates of blood alcohol concentration: advantages and limitations of the saliva method.** J Stud Alcohol. 54(1): 17-22; 1993.

BERLIOCCI, L.; BANO, D.; NICOTERA, P. **Ca²⁺ signals and death programmes in neurons.** Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 360: 2255–2258; 2005.

BIGGIO, G.; CONCAS, A.; FOLLESA, P.; SANNA, E.; SERRA, M. **Stress, ethanol, and neuroactive steroids.** Pharmacology Therapeutics. 116:140-171; 2007.

BLEICH, S.; DEGNER, D.; SPERLING, W.; BÖNSCH, D.; THÜRAUF, N.; KORNHUBER, J. **Homocysteine as a neurotoxin in chronic alcoholism.** Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 28(3):453-64; 2004.

BLOCK, M.L.; ZECCA, L.; HONG, J.S. **Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms.** Nat. Rev. Neurosci. 8: 57–69; 2007.

BLUM, D.; CHTARTO, A.; TENENBAUM, L.; BROTCHE, J.; LEVIVIER, M. **Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders.** Neurobiology of Disease. 17: 359-366; 2004.

BONITA, R. **EPIDEMIOLOGY OF STROKE.** LANCET. 339: 342–44; 1992.

BORDIN, S.; FIGLIE, N. B.; LARANJEIRA, R. **Álcool.** In: **Aconselhamento em dependência química.** São Paulo: Roca, p. 30-54; 2004.

BORGHESE, C.M.; BLEDNOV, Y.A.; QUAN, Y.; IYER, S.V.; XIONG, W.; MIHIC, S.J.; ZHANG, L.; LOVINGER, D.M.; TRUDELL, J.R.; HOMANICS, G.E.; HARRIS, R.A. **Characterization of Two Mutations, M287L and Q266I, in the $\alpha 1$ Glycine Receptor Subunit That Modify Sensitivity to Alcohols.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 340: 304-316; 2012.

BOFFETTA, P.; HASHINE, M. **Alcohol and cancer.** Lancet Oncol. 7:149-156; 2006.

BREAKSPEAR, M.; TERRY, J.R.; FRISTON, K.J. **Modulation of excitatory synaptic coupling facilitates synchronization and complex dynamics in a biophysical model of neuronal dynamics.** Network. 14:703–32; 2003.

BROCARD, P.S.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B.R. **The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders.** Brain Research Reviews. 67: 209-225; 2011.

BROTT, T.; BOGOUSSLAVSKY, J. **Treatment of acute ischemic stroke.** The New England Journal of Medicine. 343:710-722; 2000.

BROUGHTON, B.R.S.; REUTENS, D.C.; SOBEY, C.G. **Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia.** Stroke; 40: 331-339; 2009.

BROUNS, R.; DE DEYN, P.P. **The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke.** Clinical Neurology and Neurosurgery. 111: 483-495; 2009.

BROWN, L.L.; SHARP, F.R. **Metabolic mapping of rat striatum: somatotopic organization of sensorimotor activity.** Brain Res. 686 (2): 207-222, 1995.

BROWN, M.M. **Brain attack: a new approach to stroke.** Clinical Medicine. 2: 60-65; 2002.

BROWN, V.J.; ROBBINS, T.W. **Deficits in response space following unilateral striatal dopamine depletion in the rat.** J Neurosci. 9: 983-989; 1989.

BRUNDULA, V.; REWCASTLE, N.B.; METZ, L.M.; BERNARD, C.C.; YONG, V.W. **Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis.** Brain. 125: 1297–308; 2002.

BUITRAGO, M.M.; SCHULZ J.B.; DICHGANS J.; LUFT, A.R. **Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm.** Neurobiol. Learn. Mem. 81: 211–216; 2004.

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_A receptors.** Mol Pharmacol. 63: 53-64; 2003.

CAICOYA, M.; RODRIGUEZ, T.; CORRALES, C.; CUELLO, R.; LASHERAS, C. **Alcohol and stroke: a community case-control study in Asturias, Spain.** J Clin Epidemiol. 52(7):677-84; 1999.

CARDINAL, R.N.; PARKINSON, J.A.; HALL, J.; EVERITT, B.J. **Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex.** Neurosci Biobehav Ver. 26: 321-352; 2002.

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

CARPENTER, H.E.P.; CHANDLER, L.J. **Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction.** Pharm Biochem Behav. 86:200–208; 2007.

CARVALHO V, PINSKY I, DE SOUZA E SILVA R, CARLINI-COTRIM B. **Drug and alcohol use and family characteristics: a study among Brazilian high-school students.** *Addiction* 90: 65-72. 1995.

CASO, J.R.; PRADILLO, J.M.; HURTADO, O.; LEZA, J.C.; MORO, M.A.; LIZASOAIN, I. **Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke.** *Stroke*. 39: 1314-1320; 2008.

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.

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. **II Levantamento Domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país.** São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) e Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD); 2007.

CHAMBERS, R.A.; TAYLOR, J.R.; POTENZA, M.N. **Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability.** *Am J Psychiatry*. 2003; 160:1041–52.

CLEOPHAS, T.J. **Wine, beer and spirits and the risk of myocardial infarction: a systematic review.** *Biomed Pharmacother*. 53(9):417-23; 1999.

COIMBRA, V.C.C.; OLIVEIRA, M.M.; VILA, T.C.; ALMEIDA, M.C.P. **A atenção em saúde mental na estratégia saúde da família.** *Ver. Eletrônica de Enfermagem, UFG*; 7(1):113-117. 2005.

CORRAO, G.; BAGNARDI, V.; ZAMBON, A.; LA VECCHIA, C. **A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases.** *Prev. Med*. 38(5):613-9; 2004.

CORRAO, G.; RUBBIATI, L.; BAGNARDI, V.; ZAMBON, A.; POIKOLAINEN, K. **Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis.** *Addiction*. 95(10):1505-23; 2000.

CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. **Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment.** *Science*. 284, 1670-1672; 1999.

CRABBE, J.C. **Sensitivity to ethanol in inbred mice: genotypic correlations among several behavioral responses.** *Behav Neurosci*. 97: 280–9; 1983.

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.

DANTON, G.H.; DIETRICH, W.D. **Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke.** J Neuropathol Exp. Neurol. 62: 127–36; 2003.

DAVIES, M. **The role of GABA_A receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system.** J. Psychiatry. Neurosci. 28: 263-74; 2003.

DELONG, M.R.; WICHMANN, T. **Circuits and circuit disorders of the basal ganglia.** Arch Neurol. 64: 20-4, 2007.

DEMIRCI, S.; EŞEL, E. **Öğrenme ve hafızanın hücresel düzenekleri ve psikiyatrik hastalıklarla ilişkisi.** Anadolu Psikiyatri Dergisi. 5: 239-248; 2004.

DI CASTELNUOVO, A.; ROTONDO, S.; IACOVIELLO, L.; DONATI, M.B.; DE GAETANO, G. **Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk.** Circulation. 105(24):2836-44; 2002.

DIETLER, M. **Alcohol: Anthropological/Archaeological Perspectives.** Annual Review of Anthropology.; 35: 229-49; 2006.

DIETZ, V. **Interaction between central programs and afferent input in the control of posture and locomotion.** Journal of biomechanics. 29:841–844; 1996.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S.F. **The glutamate receptor ion channels.** Pharmacological Reviews. 51: 7-61; 1999.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M.A. **Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view.** Trends Neuroscience; 22:391–397. 1999.

DODD, P.R.; BECKMANN, A.M.; DAVIDSON, M.S.; PETER, W.A. **Glutamate-mediated transmission, alcohol, and alcoholism.** Neurochemistry International. 37: 509-533; 2000.

DOMERCQ, M.; MATUTE, C. **Neuroprotection by tetracyclines.** Trends in Pharmacological Sciences. 25: 609-612; 2004.

DONNAN, G.A.; FISHER, M.; MACLEOD, M.; DAVIS, S.M. **Stroke.** Lancet 371:1612–1623; 2008.

DOREMUS-FITZWATER, T.L.; VARLINSKAYA, E.I.; SPEAR, L. P. **Impact of repeated stress on responsivity to ethanol induced changes in social behavior in adolescent and adult rats.** Poster Presented at the Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA., 2007.

DOYLE, K.P.; SIMON, R.P.; STENZEL-POORE, M.P. **Mechanisms of ischemic brain damage.** *Neuropharmacology*. 2008; 55: 310-318.

DUDEK, B.C.; PHILLIPS, T.J. **Distinctions among sedative, disinhibitory, and ataxic properties of ethanol in inbred and selectively bred mice.** *Psychopharmacology (Berl)*. 101:93–9; 1990.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. **A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice.** *J Am Pharm*. 46: 208-209; 1957.

EGGERS, E.D.; BERGER, A.J. **Mechanisms for the modulation of native glycine receptor channels by ethanol.** *J. Neurophysiol*. 91: 2685–2695; 2004.

EKDAHL, C.T.; CLAASEN, J.H.; BONDE, S.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. **Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain.** *Proc Natl. Acad. Sci*. 100: 13632-13637; 2003.

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

ENGELHORN, T.; DOERFLER, A.; FORSTING, M.; HEUSCH, G.; SCHULZ, R. **Does a Relative Perfusion Measure Predict Cerebral Infarct Size?** *Am. J. Neuroradiol*. 26: 2218–2223; 2005.

ENGELHORN, T.; GOERIKE, S.; DOERFLER, A.; OKORN, C.; FORSTING, M.; HEUSCH, G.; SCHUL, R. **The angiotensin II type 1–receptor blocker candesartan increases cerebral blood flow, reduces infarct size, and improves neurologic outcome after transient cerebral ischemia in rats.** *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 24: 467–474; 2004.

ENOCH, M.A. **The Role of GABA_A Receptors in the Development of Alcoholism.** *Pharmacol. Biochem. Behav*. 90: 95–104; 2008.

EVERS, S.M.; STRUIJS, J.N.; AMENT, A.J.; VAN GENUGTEN, M.L.; JAGER, J.C.; VAN DEN BOS, G.A. **International comparison of stroke cost studies.** *Stroke*. 35:1209–1215; 2004.

EVRARD, S. G.; DUHALDE-VEGA, M.; TAGLIAFERRO, P.; MIROCHNIC, S.; CALTANA, L. R.; BRUSCO, A. **A low chronic ethanol exposure induces morphological changes in the adolescent rat brain that are not fully recovered even after a long abstinence: An immunohistochemical study.** *Experimental Neurology*, 200, 438 – 459; 2006.

FAGAN, S.C.; CRONIC, L.E.; HESS, D.C. **Minocycline Development for Acute Ischemic Stroke.** *Transl. Stroke Res*. 2: 202–208; 2011.

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.

FEIGIN, V.L.; LAWES, C.M.; BENNETT, D.A.; BARKER-COLLO, S.L.; PARAG, V. **Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review.** Lancet. Neurol. 8: 355-369; 2009.

FENG, J.; CAI, X.; ZHAO, J.; YA, Z. **Serotonin receptors modulate GABA_A receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons.** Journal Neuroscience. 21: 6502–6511; 2001.

FEUERSTEIN, G.Z.; WANG, X.K. **Animal models of stroke.** Molecular Medicine 6: 133-135; 2000.

FILLMORE, K.M.; KERR, W.C.; STOCKWELL, T.; CHIKRITZHS, T.; BOSTROM, A. **Moderate alcohol use and reduced mortality risk: systematic error in prospective studies.** Addiction Res Theory. 14:101-32; 2006.

FORTES, J.R.A.; CARDO, W.N. **Alcoolismo: diagnóstico e tratamento.** São Paulo: Sarvier; 1991.

FRITSCH, B.; REIS, J.; MARTINOWICH, K.; SCHAMBRA, H. M.; JI, Y.; COHEN, L. G.; LU, B. **Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning.** Neuron. 66: 198-204; 2010.

FULLGRABE, M.; VENGELIENE, V.; SPANAGEL, R. **Influence of age at drinking onset on the alcohol deprivation effect and stress-induced drinking in female rats.** Pharmacol Biochem Behav. 86: 320–327; 2007.

GALDUROZ, J.C.F.; CAETANO, R. **Epidemiology of alcohol use in Brazil.** Rev Bras Psiquiatr. 26: 3-6; 2004.

GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, V.H. **What is immune privilege (not)?** Trends Immunol. 28: 12-18; 2007.

GARCIA-MARTINEZ, E.M.; SANZ-BLASCO, S.; KARACHITOS, A.; BANDEZ M.J.; FERNANDEZ-GOMEZ, F.J.; PEREZ-ALVAREZ, S.; MERA, R.M.; JORDAN, M.J.; AGUIRRE, N.; GALINDO, M.F.; VILLALOBOS, C.; NAVARRO, A.; KMITA, H.; JORDÁN, J. **Mitochondria and calcium flux as targets of neuroprotection caused by minocycline in cerebellar granule cells.** Biochem. Pharmacol. 79: 239–250; 2010.

GASCHE, Y.; COPIN, J.C.; SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; CHAN, P.H. **Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia.** Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 21: 1393–1400; 2001.

GASPAROVIC, C.R. **Perturbation of the Glutamate–Glutamine System in Alcohol Dependence and Remission.** Neuropsychopharmacology. 36: 1359-1365; 2011.

GHIKA, J.; BOGOUSLAVSKY, J. **Abnormal movements.** In: Bogousslavsky J, Caplan L, editors. Stroke Syndromes. 2nd edition. Cambridge University Press; p. 162-81. 2001.

GIGLIOTTI, A.; BESSA, M.A. **Síndrome de Dependência do Álcool: critérios diagnósticos.** Rev. Bras. Psiquiatria. 32(3):122-126. 2009.

GILL, J.; ZEZULKA, A.; SHIPLEY, M.; GILL, S.; BEEVERS, D. **Stroke and alcohol consumption.** N Engl J Med. 315: 1041–6. 1986.

GILLIGAN, A.K.; THRIFT, A.G.; STURM, J.W.; DEWEY, H.M.; MACDONELL, R.A.; DONNAN, G.A. **Stroke units, tissue plasminogen activator, aspirin and neuroprotection: which stroke intervention could provide the greatest community benefit?** Cerebrovasc. Dis. 20: 239–44; 2005.

GILMAN, S. **Pharmacologic management of ischemic stroke: relevance to stem cell therapy.** Exp Neurol. 199: 28-36. 2006.

GINSBERG, M.D. **The new language of cerebral ischemia.** J. Neuroradiol. 18:1435–1445; 1997.

GIULIAN, D.; VACA, K. **Inflammatory glia mediate delayed neuronal damage after ischemia in the central nervous system.** Stroke. 24(12 Suppl):I84–I90; 1993.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D.J.; FREIRE, M.A.M.; PICANÇO-DINIZ, C.W.P.; PERRY, V.H. **Astrocytosis, Microglia Activation, Oligodendrocyte Degeneration and Pyknosis Following Acute Spinal Cord Injury.** Experimental Neurology. 190: 456-467. 2004.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D.J.; PICANÇO-DINIZ, C.W.P.; PERRY, V.H. **Systematic Analysis of Axonal Damage and Its Possible Correlation with Inflammatory Response in Different White Matter Tracts of Acutely Injured Rat Spinal Cord.** Brain Research. 1066: 57-70. 2005.

GOOD, M.L.; HUSSEY, D.L. **Minocycline stain devil?** Br J Dermatol. 2003; 149: 237–9.

GORELICK, P.B.; RULAND, S. **Diagnosis and management of acute ischemic stroke.** Disease-a-Month. 56: 72-100. 2010.

GRAEBER, M.B.; LI, W.; RODRIGUEZ, M.L. **Role of microglia in CNS inflammation.** Federation of European Biochemical Societies. 585: 3798-3805. 2011.

GRANT, B.F.; DAWSON, D.A. **Age at onset of alcohol use and its association with DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey.** J Subst Abuse. 1997; 9: 103–110.

GREFKES, C.; FINK, G.R. **Reorganization of cerebral networks after stroke: new insights from neuroimaging with connectivity approaches.** Brain. 134(5): 1264–1276; 2011.

GREFKES, C.; NOWAK, D.A.; EICKHOFF, S.B.; DAFOTAKIS, M.; KUST, J.; KARBE, H. **Cortical connectivity after subcortical stroke assessed with functional magnetic resonance imaging.** Ann Neurol. 63:236–46; 2008.

GRIFFIN, M.O.; FRICOVSKY, E.; CEBALLOS, G.; VILLARREAL, F. **Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature.** Am. Journal Physiol. Cell Physiol. 2010; 299: 539–548.

GRIFFITH, E. **A Política do álcool e o bem comum.** Tradução: Gisele Klein. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. p241.

GRILLNER, S.; WALLEN, P. **Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates.** Annu. Rev. Neurosci. 1985; 233–261.

GUAN, Q.H.; PEI, D.S.; LIU, X.M.; WANG, X.T.; XU, T.L.; ZHANG, G.Y. **Neuroprotection against ischemic brain injury by SP600125 via suppressing the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis.** Brain Res. 1092:36–46; 2006.

GUPTA, Y.K.; CHAUHAN, A. **Potential of immunosuppressive agents in cerebral ischaemia.** Indian J Med Res. 2011; 133:15-26.

GUPTA, Y.K.; GUPTA, M.; KOHLI, K. **Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain.** Indian J Physiol Pharmacol. 47: 373–86; 2003.

HAILER, N.P. **Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: It is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells.** Progress in Neurobiology; 84: 211-233; 2008.

HALL, C.S. **Emocional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality.** J. Comp. Psychol. 1934; 18:385-403.

HANKEY, G.J. **Stroke: How large a public health problem, and how can the neurologist help?** Arch Neurol. 56, 748-754; 1999.

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

HARGREAVES, G.A.; QUINN, H.; KASHEM, M.A.; MATSUMOTO, I.; MCGREGOR, I.S. **Proteomic analysis demonstrates adolescent vulnerability to lasting**

hippocampal changes following chronic alcohol consumption. Alcohol Clin Exp Res. 33:86–94; 2009.

HARPER, C.; MATSUMOTO, I. **Ethanol and brain damage.** Current Opinion in Pharmacology. 5: 73–78. 2005.

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

HART, C.L.; SMITH, G.D.; HOLE, D.J.; HAWTHORNE, V.M. **Alcohol consumption and mortality from all causes, coronary heart disease, and stroke: results from a prospective cohort study of Scottish men with 21 years of follow up.** Br Med J. 31: 1725–1729. 1999.

HAYAKAWA, K.; MISHIMA, K.; NOZAKO, M.; HAZEKAWA, M.; MISHIMA, S.; FUJIOKA, M.; ORITO, K.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. **Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism.** Stroke. 2008; 39: 951-958.

HAZEM, F.; ELEWA, B.S.; HEND-HILALI, B.S.; HESS, D.C.; LIVIA, S.; MACHADO, B.S.; FAGAN, S.C.; PHARM, D. **Minocycline for Acute Neuroprotection.** Pharmacotherapy. 2006; 26: 515–521.

HE, B.J.; SNYDER, A.Z.; VINCENT, J.L.; EPSTEIN, A.; SHULMAN, G.L.; CORBETTA, M. **Breakdown of functional connectivity in frontoparietal networks underlies behavioral deficits in spatial neglect.** Neuron. 53:905–18; 2007.

HE, S.Q.; DUM, R.P. e STRICK, P.L. **Topographic organization of corticospinal projections from the frontal lobe: motor areas on the lateral surface of the hemisphere.** J. Neurosci. 1993; 13: 952-980.

HEILIG, M.; GOLDMAN, D.; BERRETTINI, W.; O'BRIEN, C.P. **Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction.** Nature Reviews Neuroscience. 2011; 12: 670-684.

HERTZ, L. **Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective.** Neuropharmacology. 2008; 55: 289-309.

HEWLETT, K.A.; CORBETT, D. **Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia.** Neuroscience. 2006; 141: 27-33.

HILLBOM, M.; SALOHEIMO, P.; JUVELA, S. **Alcohol consumption, blood pressure, and the risk of stroke.** Curr Hypertens Rep. 13(3):208-13; 2011.

HOBART, J.C.; WILLIAMS, L.S.; MORAN, K.; THOMPSON, A.J. **Quality of life measurement after stroke: uses and abuses of the SF-36.** Stroke. 2002; 33: 1348-56.

HOLSCHNEIDER, D.P.; YANG, J.; GUO, Y.; MAAREK, J. M. **Reorganization of functional brain maps after exercise training: Importance of cerebellar-thalamic-cortical pathway.** Brain Res. 12: 96-107; 2007.

HORNE, M.K.; BUTLER, E.G. **The role of the cerebello-thalamo-cortical pathway in skilled movement.** Prog. Neurobiol. 46, 199–213, 1995.
HOSP, J.A.; LUFT, A.R. **Cortical plasticity during motor learning and recovery after ischemic stroke.** Neural Plast. 2011.

HOSSMANN, K.A. **Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes.** Neuropharmacology. 55: 257-270; 2008.

HUGHES, P.M.; ANTHONY, D.C.; RUDDIN, M.; BOTHAM, M.S.; RANKINE, E.L.; SABLONE, M.; BAUMANN, D.; MIR, A.K.; PERRY, V.H. **Focal Lesions in the Rat Central Nervous System Induced by Endothelin-1.** Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 2003; 62: 1276-1286.

HUGHES, P.M.; ANTHONY, D.C.; RUDDIN, M.; BOTHAM, M.S.; RANKINE, E. L.; SABLONE, M.; BAUMANN, D.; MIR, A.K.; PERRY, V.H. **Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1.** Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 62: 1276-1286; 2003.

HUMMEL, F.; CELNIK, P.; GIRAU, P.; FLOEL, A.; WU, W.H.; GERLOFF, C. **Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke.** Brain. 128:490–9; 2005.

HUNT, W.A.; MAJCHROWICZ, E. **Studies of neurotransmitter interactions after acute and chronic ethanol administration.** Pharmacol Biochem Behav. 1983; 18:371-374.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. **The immunology of stroke: from mechanisms to translation.** Nat Med. 2011; 17: 796–808.

INSIGHT[®] BRASIL. **Equipamento estereotáxico.** Disponível em: <http://insightltda.com.br/insight-equipamento-cientifico-326-Estereotáxico-1-torre>. Acessado em: 12 mar. 2012.

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 fev. 2012.

ISO, H.; BABA, S.; MANNAMI, T.; SASAKI, S.; OKADA, K.; KONISHI, M.; TSUGANE, S. **Alcohol consumption and risk of stroke among middle-aged men: the JPHC Study Cohort I.** Stroke. 2004; 35: 1124-1129.

JERNIGAN, T.L.; TRAUNER, D.A.; HESSELINK, J.R.; TALLAL, P.A. **Maturation of human cerebrum observed in vivo during adolescence.** Brain 1991; 114: 2037–2049.

JEYASINGHAM, R.A.; BAIRD, A.L.; MELDRUM, A.; DUNNETT, S.B. **Differential effects of unilateral striatal and nigrostriatal lesions on grip strength, skilled paw reaching and drug-induced rotation in the rat.** Brain Res Bull. 55(4): 541-548; 2001.

JIANG, Z.L.; YE, J.H. **Protein kinase C epsilon is involved in ethanol potentiation of glycine-gated Cl⁻ current in rat neurons of ventral tegmental area.** Neuropharmacology. 2004; 44:493–502.

JOHNSON, A.L. **Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles.** Anim Reprod Sci. 2003; 78: 185-201.

JOHNSON, B.A.; ROACHE, J.D.; AIT-DAOUD, N.; ZANCA, N.A.; VELAZQUEZ, M. **Ondansetron reduces the craving of biologically predisposed alcoholics.** Psychopharmacology. 2002; 160: 408-13.

JOHNSTON, S.C.; MENDIS, S.; MATHERS, C.D. **Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modeling.** Lancet Neurol. 2009; 8: 345-54.

JONES, B. J.; ROBERTS, D. J. **The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod.** J Pharm Pharmac. 1968; 20: 302-304.

JUAN, M.B.L.; HORNO, S.M.; BOSCH, I.B.; MORENO, J.C.; PONS, J.L.; FARINA, D.; IOSA, M.; MOLINARI, M.; TAMBURELLA, F.; RAMOS, A.; CARIA, A.; ESCALANTE, T.S.; BRUNNER, C.; REA, M. **Rehabilitation of gait after stroke: a review towards a top-down approach.** J Neuroeng Rehabil. 8: 66; 2011.

JUNG, M.E.; GATCH, M.B.; SIMPKINS, J.W. **ESTROGEN NEUROPROTECTION AGAINST THE NEUROTOXIC EFFECTS OF ETHANOL WITHDRAWAL: POTENTIAL MECHANISMS.** Exp. Biol. Med. (Maywood) 2005; 230: 8–22.

JUNG, S.; AKABAS, M.H; HARRIS, R.A. **Functional and structural analysis of the GABA_A receptor α_1 subunit during channel gating and alcohol modulation.** J. Biol. Chem.; 2005, 280: 308-316.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Princípios da neurociência.** Editora Manole. 4ª edição. 2003.

KARNATH, H.O.; HIMMELBACH, M.; RORDEN, C. **The subcortical anatomy of human spatial neglect: putamen, caudate nucleus and pulvinar.** Brain. 125: 350–360; 2002.

KAUR, C.; LING, E.A. **Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions.** Curr Neurovasc Res. 5:71–8; 2008.

KELM, M.K.; CRISWELL, H.E.; BREESE, G.R. **Ethanol-enhanced GABA release: A focus on G protein-coupled receptors.** Brain Res Rev. 65(2): 113–123; 2011.

KHALSA JH, TREISMAN G, MCCANCE-KATZ E, TEDALDI E. **Medical consequences of drug abuse and co-occurring infections: research at the National Institute on Drug Abuse.** Subst Abus 2008; 29: 5-16.

KILIC, U.; KILIC, E.; MATTER, C.M.; BASSETTI, C.L.; HERMANN, D.M. **TLR-4 deficiency protects against focal cerebral ischemia and axotomy-induced neurodegeneration.** Neurobiol. Dis. 2008; 31: 33-40.

KIM, H.S.; SUH, Y.H. **Minocycline and neurodegenerative diseases.** Behavioural Brain Research. 2009; 196: 168-179.

KNOPIK, V.S.; JACOB, T.; HABER, J.R.; SWENSON, L.P.; HOWELL, D.N. **Paternal alcoholism and offspring ADHD problems: a children of twins design.** Twin Res Hum Genet. 2009; 12: 53-62.

KNOTT, A.B.; PERKINS, G.; SCHWARZENBACHER, R.; BOSSY-WETZEL, E. **Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration.** Nature Reviews Neuroscience. 2008; 9: 505-518.

KONDO, T.; REAUME, A.G.; HUANG, T.T.; CARLSON, E.; MURAKAMI, K.; CHEN, S.F.; HOFFMAN, E.K.; SCOTT, R.W.; EPSTEIN, C.J.; CHAN, P.H. **Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia.** J. Neurosci. 1997; 17: 4180–9.

KRAFT, A.D.; HARRY, G.J. **Features of Microglia and Neuroinflammation Relevant to Environmental Exposure and Neurotoxicity.** Int. J. Environ. Res. Public Health. 2011; 8: 2980-3018.

KRAUS, R.L.; PASIECZNY, R.; LARIOSAWILLINGHAM, K.; TURNER, M.S.; JIANG, A.; TRAUGER, J.W. **Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity.** J. Neurochem. 2005; 94: 819–827.

KRYSTAL, J.H.; PETRAKIS, I.L.; LIMONCELLI, D.; NAPPI, S.K.; TREVISAN, L.; PITTMAN, B.; D'SOUZA, D.C. **Characterization of the interactive effects of glycine and d-cycloserine in men: further evidence for enhanced NMDA receptor function associated with human alcohol dependence.** Neuropsychopharmacology. 2010; 36: 701–710.

KUBOTA, M.; NAKAZAKI, S.; HIRAI, S. **Alcohol consumption and frontal lobe shrinkage: study of 1432 non-alcoholic subjects.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2001; 71:104–6.

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

KUMAR, S.; PORCU, P.; WERNER, D.; MATTHEWS, D.; DIAZ-GRANADOS, J.; HELFAND, R.; MORROW, A. **The role of GABA receptors in the acute and**

chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology*. 2009; 205: 529-564.

KUMARI M., TICKU M.K. **Regulation of NMDA receptors by ethanol.** *Prog. Drug Res.* 2000; 54: 153–189.

KURATA, K. **Information processing for motor control in primate premotor cortex.** *Behav. Brain Res.* 1994; 61: 135-142.

KWAKKEL, G.; KOLLEN, B.J.; WAGENAAR, R.C. **Therapy Impact on Functional Recovery in Stroke Rehabilitation: A critical review of the literature.** *Physiotherapy*. 85:377–391; 1999.

LAKHAN, S.E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. **Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches.** *Journal of Translational Medicine*. 2009, 7:97.

LAMPL, Y.; BOAZ, M.; GILAD, R.; LORBERBOYM, M.; DABBY, R.; RAPOPORT, A.; ANCA-HERSHKOWITZ, M.; SADEH, M. **Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study.** *Neurology*. 2007; 69: 1404-1410.

LARANJEIRA, R.; PINSKY, I.; ZALESKI, M.; CAETANO, R. **I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira.** Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas; 2007.

LE MAREC, N.; LALONDE, R. **Sensorimotor learning and retention during equilibrium tests in Purkinje cell degeneration mutant mice.** *Brain Res.* 1997; 768: 310–316.

LEE, D.H.; KANG, D.W.; AHN, J.S.; CHOI, C.G.; KIM, S.J.; SUH, D.C. **Imaging of the Ischemic Penumbra in Acute Stroke.** *Korean J Radiol.* 2005; 6: 64-74.

LEHNARDT, S.; LEHMANN, S.; KAUL, D.; TSCHIMMEL, K.; HOFFMANN, O.; CHO, S.; KRUEGER, C.; NITSCH, R.; MEISEL, A.; WEBER, J.R. **Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia.** *J. Neuroimmunol.* 2007; 190: 28-33.

LI, J.; MCCULLOUGH, L.D. **Sex differences in minocycline-induced neuroprotection after experimental stroke.** *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009; 29: 670-674.

LIAN, C. **L'alcoolisme, cause d'hypertension artérielle.** *Bull Acad Natl Méd Paris.* 74:525–8; 1915.

LINSENBARDT, D.N.; MOORE, E.M.; GRIFFIN, K.D.; GIGANTE, E.; BOEHM, S.L. **Tolerance to ethanol's ataxic effects and alterations in ethanol-induced locomotion following repeated binge-like ethanol intake using the did model.** *Alcohol Clin Exp Res.* 35(7): 1246–1255; 2011.

LIPTON, P. **Ischemic Cell Death in Brain Neurons**. *Physiol Rev.* 1999; 79: 1431–1568.

LIU, J.; WU, D.C.; WANG, Y.T. **Allosteric potentiation of glycine receptor chloride currents by glutamate**. *Nature Neuroscience.* 2010; 13: 1225–1232.

LIU, Z.; FAN, Y.; WON, S. J.; NEUMANN, M.; HU, D.; ZHOU, L.; WEINSTEIN, P. R.; LIU, J. **Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia**. *Stroke.* 2007; 38: 146-152.

LO, E.H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M.A. **Mechanism, challenges and opportunities in stroke**. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 399-415.

LOTUFO, P.A.; BENSEÑOR, I.M. **Trends of stroke subtypes mortality in Sao Paulo, Brazil (1996-2003)**. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005; 63: 951-955.

LOVINGER, D.M. **5-HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic**. *Neurochem Int.*; 1999; 35: 125–130.

MACHADO, A.R.; MIRANDA, P.S.C. **Fragmentos da história da atenção à saúde para usuários de álcool e outras drogas no Brasil: da Justiça à Saúde Pública**. *Rev. Hist. Cienc. Saúde Manguinhos.* 9(1):07-14; 2007.

MACLURE, M. **Demonstration of deductive meta-analysis: ethanol intake and risk of myocardial infarction**. *Epidemiol Rev.* 15:328-51; 1993.

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.* 2009; 30: 23-30.

MAIA, E.C.P.; SILVA, P.P.; ALMEIDA, W.B.; SANTOS, H.F.; MARCIAL, B.L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. **Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral**. *Quim. Nova.* 2010; 33: 700-706.

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.

MANDIĆ, M.; RANCIĆ, N. **Risk factors for stroke**. *Med. Pregl.*, v. 64, p. 600-5, 2011.

MANSUR, A.P.; SOUZA, M.F.M.; FAVARATO, D.; AVAKIAN, S.D.; CÉSAR, L.A.M.; ALDRIGUI, J.M. **Stroke and ischemic heart disease mortality trends in Brazil from 1979 to 1996**. *Neuroepidemiology.* 2003; 22: 179-83.

MATSUKAWA, N.; YASUHARA, T.; HARA, K.; XU, L.; MAKI, M.; YU, G.; KANEKO, Y.; OJIKAWA, K.; HESS, D.C.; BORLONGAN, C.V. **Therapeutic targets and limits of**

minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. BMC Neurosci. 2009; 10: 126.

MATSUMOTO, I. **Molecular neurobiology of alcohol withdrawal.** J Neurochem; 70 (2):45; 1998.

MAZZAGLIA, G.; BRITTON, A.R.; ALTMANN, D.R.; CHENET, L. **Exploring the relationship between alcohol consumption and non-fatal or fatal stroke: a systematic review.** Addiction. 96:1743–56; 2001.

MCBAIN, C.J.; MAYER, M.L. **N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function.** Physiol Rev. 1994; 74:723–760.

MCINTOSH, C.; CHICK, J. **Alcohol and the nervous system.** J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2004; 75: 16–21.

MEHTA, S.L.; MANHAS, N.; RAGHUBIR, R. **Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics.** Brain Research. 2007; 54: 34 – 66.

MELCER, T.; GONZALEZ, D.; SOMES, C.; RILEY, E.P. **Neonatal Alcohol Exposure and Early Development of Motor Skills in Alcohol Preferring and Nonpreferring Rats.** Neurotoxicol Teratol. 1995; 17: 103-110.

MELO, A.; MONTEIRO, L.; LIMA, R.M.; OLIVEIRA, M.S.; CERQUEIRA, M.D.; EL-BACHA, R.S. **Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives.** Oxid Med Cell Longev. 2011:467180; 2011.

MENDEHALL, C.L.; MACGEE, J.; GREEN, E.S. **Simple rapid and sensitive method for the simultaneous quantitation of ethanol and acetaldehyde in biological materials using headspace gas chromatography.** J Chromatogr.; 1980; 190: 197-200.

MERA, R.M. M. F., MARTÍNEZ, E. G., GÓMEZ, F.J. F., GUIJO, J.M. H., AGUIRRE, N., GALINDO, M.F., JORDÁN, J. **¿Es la vieja minociclina un nuevo fármaco neuroprotector?.** REV NEUROL 2008; 47: 31-38.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. **Pathophysiology of stroke: lessons from animal models.** Metab Brain Dis. 2004; 19:151–167.

MICHAEL, K.M.; SHAUGHNESSY, M. **Stroke prevention and management in older adults.** Journal of Cardiovascular Nursing. 2006; 21: 21-26.

MIDDLETON, F.A.; STRICK, P.L. **Basal-ganglia ‘projections’ to the prefrontal cortex of the primate.** Cereb. Cortex. 2002; 12: 926–935.

MIHIC, S.J.; YE, Q.; WICK, M.J.; KOLTCHINE, V.V.; KRASOWSKI, M.D.; FINN, S.E.; MASCIA, M.P.; VALENZUELA, C.F.; HANSON, K.K.; GREENBLATT, E.P.; HARRIS, R.A.; HARRISON, N.L. **Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors.** Nature. 25: 385-9; 1997.

MILLER, T.R., LEVY, D.T., COHEN, M.A., COX, K.L.C. **Costs of alcohol and drug-involved crime.** Prev Science. 7: 333-42; 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Uma análise da situação de saúde: Evolução da mortalidade no Brasil.** Secretária de Vigilância em Saúde. Brasília/DF. 2004.

MOLLER, H.H.T. **Alcohol drinking, social class and cancer.** In: Kogevinas M, Pearce N, editors. Social inequalities and cancer. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 251-263; 1997.

MONTOLIU, C.; SANCHO-TELLO, M.; AZORIN, I.; BURGAL, M.; VALLES, S.; RENAU-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. **Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption.** J. Neurochem. 65: 2561-2570; 1995.

MONTOLIU, C.; VALLES, S.; RENAU-PIQUIERAS, J.; GUERRI, C. **Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption.** Journal of Neurochemistry. 1994; 63: 1855–1862.

MOYANOVA, S.G.; KORTENSKA, L.V.; MITREVA, R.G.; PASHOVA, V.D.; NGOMBA, R.T.; NICOLETTI, F. **Multimodal assessment of neuroprotection applied to the use of MK-801 in the endothelin-1 model of transient focal brain ischemia.** Brain Research. 2007; 1153: 58-67.

MUKHERJEE, D.; PATIL, C.G. **Epidemiology and the global burden of stroke.** World Neurosurgery. 2011; 76: 85-90.

MURASE, N.; DUQUE, J.; MAZZOCCHIO, R.; COHEN, L.G. **Influence of interhemispheric interactions on motor function in chronic stroke.** Ann Neurol. 55:400–9; 2004.

MURPHY, M.P.; RICK, J.T.; MILGRAM, N.W.; IVY, G.O. **A simple and rapid test of sensorimotor function in the aged rat.** Neurobiol Learn Mem. 1995; 64: 181-186.

NAGY, J. **The NR2B subtype of NMDA receptor: a potential target for the treatment of alcohol dependence.** Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2004; 3:169–179.

NAHAS, T.R. In: XAVIER, G.F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso.** São Paulo: FeSBE. 1997; 135-146.

NAHAS, T.R. **O teste do Campo Aberto.** Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2001.

NAIR, D.G.; PURCOTT, K.L.; FUCHS, A.; STEINBERG, F.; KELSO, J.A. **Cortical and cerebellar activity of the human brain during imagined and executed unimanual and bimanual action sequences: a functional MRI study.** Cogn Brain Res. 2003; 15: 250-260.

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

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.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE – NICE. **Technology appraisal guidance 122 - Alteplase for the treatment of acute ischaemic stroke**. 2008. Disponível em <<http://www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/CG68NICEGuideline.pdf>> Acessado em: 10 jan. 2012.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE \ NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NINDS/NIH). **United States of America statistics of health**. Disponível em <<http://www.ninds.nih.gov>>. Acesso em 23 jun 2011.

NELSON, M. L.; LEVY, S. B. **The history of the tetracyclines**. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011; 1241: 17–32.

NICCOLS, A. **Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain**. *Brain Cogn.* 2007; 65: 135–142.

NOBLE, W.; GARWOOD, C.J.; HANGER, D. **Minocycline as a potential therapeutic agent in neurodegenerative disorders characterised by protein misfolding**. *Prion*. 2009; 3: 78–83.

NOMURA, E.M.; GRATTON, C.; VISSER, R.M.; KAYSER, A.; PEREZ, F.; D'ESPOSITO, M. **Double dissociation of two cognitive control networks in patients with focal brain lesions**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:12017–22; 2010.

NUCLEUS MEDICAL MEDIA INC. **Hemorrhagic vs. Ischemic Stroke - Medical Illustration, Human Anatomy Drawing**. Disponível em: <<http://catalog.nucleusmedicalmedia.com/nucleusindex.php>>. Acessado em: 06 fev. 2012.

NUDO, R.J.; NELSON, R.J. **Animal models of stroke and rehabilitation - Introduction**. *Ilar. Journal* 44: 81-82; 2003.

O'DONNELL, M.J.; XAVIER, D.; LIU, L.; ZHANG, H.; CHIN, S.L.; RAO-MELACINI, P.; RANGARAJAN, S.; ISLAM, S.; PAIS, P.; MCQUEEN, M.J.; MONDO, C.; DAMASCENO, A.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; HANKEY, G.J.; DANS, A.L.; YUSOFF, K.; TRUELSEN, T.; DIENER, H.C.; SACCO, R.L.; RYGLEWICZ, D.; CZLONKOWSKA, A.; WEIMAR, C.; WANG, X.; YUSUF, S. **Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study**. *Lancet*. 2010; 376: 112–123

OMODEO-SALE, F.; GRAMIGNA, D.; CAMPANIELLO, R. **Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: effect of chronic alcohol consumption.** *Neurochemical Research*. 1997; 22: 577–582.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. OMS. **Classificação de transtornos mentais e do comportamento da CID-10. Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas.** Porto Alegre: Artes Médicas; 1993.

OSCAR, B.M.; HUTNER, N. **Frontal lobe changes after chronic alcohol ingestion.** *Alcohol Induced Brain Damage*. Edited by Hunt WA, Nixon SJ. Rockville, MD: NIH Publications. 121-156; 1993:

OTAOLA, P.; DE LA VILLA, F.M. **Value of the MSH classification in the hemiplegic stroke patient.** *Rev Neurol*. 2000; 31: 1151-4.

OTERO, P.M.M.; BARBAGELATA, L.C. **Etiologic subtypes of ischemic stroke in young adults aged 18 to 45 years: a study of a series of 93 patients.** *Rev Clin Esp*. 2007; 207: 158-165.

PACIARONI, M.; CASO, V.; AGNELLI, G. **The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities.** *Eur. Neurol*. 2009; 61: 321–330.

PAEMEN, L.; MARTENS, E.; NORGA, K.; MASURE, S.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. **The gelatinase inhibitory activity of tetracyclines and chemically modified tetracycline analogues as measured by a novel microtiter assay for inhibitors.** *Biochem Pharmacol*. 52: 105–11; 1996.

PAIS, T.F.; FIGUEIREDO, C.; PEIXOTO, R.; BRAZ, M.H.; CHATTERJEE, S. **Necrotic neurons enhance microglial neurotoxicity through induction of glutaminase by a MyD88-dependent pathway.** *J. Neuroinflammation*. 2008; 5: 43.

PATRA, J.; TAYLOR, B.; IRVING, H.; ROERECKE, M.; BALIUNAS, D.; MOHAPATRA, S.; REHM, J. **Alcohol consumption and the risk of morbidity and mortality for different stroke types—a systematic review and meta-analysis.** *BMC Public Health*. 10:258; 2010.

PAXINOS, G. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** San Diego, Elsevier, 1982.

PAZAITI, A.; SOUBASI, V.; SPANDOU, E.; KARKAVELAS, G.; GEORGIU, T.; KARALIS, P.; GUIBA-TZIAMPURI, O. **Evaluation of long-lasting sensorimotor consequences following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: the neuroprotective role of MgSO₄.** *Neonatology*. 2009; 95: 33-40.

PERRY, V.H.; NEWMAN, T.A.; CUNNINGHAM, C. **The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease.** *Nat. Rev. Neurosci*. 2003; 4: 103–112.

PLANE, J.M.; SHEN, Y.; PLEASURE, D.E.; DENG, W. **Prospects for Minocycline Neuroprotection.** *Arch. Neurol*. 2010; 67: 1442–1448.

POLAZZI E.; CONTESTABILE, A. **Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology.** Rev. Neurosci. 2002; 13: 221–42.

POPOVICH, P.G.; GUAN, Z.; MCGAUGHY, V.; FISHER, L.; HICKEY, W.F.; BASSO, D.M. **The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation.** Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. 2002; 61: 623-633.

PROCTOR, W.R.; POELCHEN, W.; BOWERS, B.J.; WEHNER, J.M.; MESSING, R. O.; DUNWIDDIE, T. V. **Ethanol differentially enhances hippocampal GABAA receptor mediated responses in protein kinase C γ (PKC γ) and PKC ϵ Null Mice.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2003; 305: 264–270.

PROSKE, U.; GANDEVIA, S.C. **The kinaesthetic senses.** J Physiol. 587, 4139-4146; 2009.

PUDDEY, I.B.; ZILKENS, R.R.; BEILIN, L.J. **Alcohol, blood pressure and hypertension.** In: Preedy, V.R. and Watson, R.R., Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology, Volume 2. Elsevier, 607–625; 2005.

QUOILIN, C.; DIDONE, V.; TIRELLI, E.; QUERTEMONT, E. **Chronic ethanol exposure during adolescence alters the behavioral responsiveness to ethanol in adult mice.** Behavioural Brain Research. 2011; 229: 1-9.

RAMOS, A.; MORMÈDE, P. **Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach.** Neurosci. Biobehav. Rev. 1998; 22: 33–57.

RANSOHOFF, R.M.; PERRY, V.H. **Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses.** Annu. Rev. Immunol; 27: 119–145; 2009.

RAVAGLIA, S.; COSTA, A.; RATTI, M.T.; SAVOLDI, F.; BO, P.; MOGLIA A. **Cognitive impairment and central motor conduction time in chronic alcoholics.** Funct Neurol; 2002; 17: 83-86.

REDGRAVE, P.; PRESCOTT, T.J.; GURNEY, K. **The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem?** Neurosci. 89: 1009-1023; 1999.

REHM, J.; ROOM, R.; MONTEIRO, M.; GMEL, G.; GRAHAM, K.; REHN, N. **Alcohol as a risk factor for global burden of disease.** Eur Addict Res 2003; 9: 157–64.

REYNOLDS, K.; LEWIS, B.; NOLEN, J.D.; KINNEY, G.L.; SATHYA, B.; HE, J. **Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis.** JAMA. 289:579-88; 2003.

RIMM, E.B.; KLATSKY, A.; GROBBEE, D.; STAMPFER, M.J. **Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits?** BMJ. 312:731-6. 1996.

RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. **Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat.** J. Neurosurg. 1977; 47: 577–581.

ROGERS, D. C.; CAMPBELL, C. A.; STRETTON, J. L.; MACKAY, K. B. **Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat.** Stroke. 1997, 28, 2060-2066.

ROGERS, L.M.; MADHAVAN, S.; ROTH, H.; STINEAR, J.W. **Transforming neurorehabilitation of walking following stroke: the promise of non-invasive brain stimulation-a review.** Restor Neurol Neurosci. 29(6):507-16. 2011.

ROMANO, M. **Mecanismos inflamatorios involucrados en el daño cerebral isquémico agudo. Posibles blancos terapéuticos. Factores pronósticos.** Neurología Argentina. 2011; 3: 176-181.

RONKSLEY, P.E.; BRIEN E.S.; TURNER, B.J.; MUKAMAL, K.J.; GHALI, W.U. **Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis.** BMJ. 342: d671; 2011.

ROUACH, H.; FATACCIOLI, V.; GENTIL, M.; FRANCÊS, S.W.; MORIMOTO, M.; NORDMANN, R. **Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology.** Hepatology. 25: 351-355; 1997.

ROUQUAYROL, M.Z. **Epidemiologia e saúde.** 4 ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 1993.
SANCHIS C, ARAGÓN CM. **What we drink when we drink? The role of the acetaldehyde in the alcohol consumption.** Adicciones. 2007; 19: 5-11.

SAPADIN, A.; FLEISCHMAJER, R. **Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications.** J Am Acad Dermatol; 54(2):258–65, 2006.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. **Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity.** Journal of Molecular Medicine. 2000; 78: 3-13.

SCHAECHTER, J.D. **Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke.** Progress in neurobiology. 73:61–72; 2004.

SCHILDKNECHT, S.; PAPE, R.; MULLER, N.; ROBOTTA, M.; MARQUARDT, A.; BURKLE, A.; DRESCHER, M.; LEIST, M. **Neuroprotection by Minocycline Caused by Direct and Specific Scavenging of Peroxynitrite.** The journal of biological chemistry. 2011; 286: 4991–5002.

SCHMIDT, H.; WERNER, C.; BERNHARDT, R.; HESSE, S.; KRÜGER J. **Gait rehabilitation machines based on programmable footplates.** Journal of neuroengineering and rehabilitation. 2007.

SCHUCKIT, M.A. **Alcohol-use disorders.** Lancet. 2009; 373: 492-501.

SELMAN, W.R.; LUST, W.D.; PUNDIK, S. **Metabolic failure leads to the deterioration of the border zone in reversible focal ischemia.** Abstracts of Society for Neuroscience. 1992; 18: 1579-1585.

SHARKO, A.C.; HODGE, C.W. **Differential modulation of ethanol-induced sedation and hypnosis by metabotropic glutamate receptor antagonists in C57BL/6J mice.** Alcohol Clin. Exp. Res. 2006; 32: 67-76.

SHARMA, D.J.; SUNKARIA, A.; BAL, A.; BHUTIA, Y.D.; VIJAYARAGHAVAN, R.; FLORA, S.J.S.; GILL, K.D. **Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of pro-apoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain.** Toxicol Appl Pharmacol. 2009; 240: 208-218.

SIEGMUND, S.; VENGELIENE, V.; SINGER, M.V.; SPANAGEL, R. **Influence of age at drinking onset on long-term ethanol self-administration with deprivation and stress phases.** Alcohol Clin Exp Res. 2005; 29: 1139 –1145.

SLAWECKI, C.J.; THORSELL, A.; EHLERS, C.L. **Long-term neurobehavioral effects of alcohol or nicotine exposure in adolescent animal models.** Ann NY Acad Sci. 2004; 1021: 448 – 452.

SOARES, P.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F.; PATOCINIO, M.C.A.; ASSEREUY, A.M.S.; CARVALHO, K.M.; ESCUDEIRO, S.S.; LIMA, N.M.; VIANA, G.S.B. **Aminophylline (a theophylline-ethylenediamine complex) blocks ethanol behavioral effects in mice.** Behavioural Pharmacology. 2009; 20: 297-302.

SOUZA, M.F.M.; ROCHA, F.M.M.; MALTA, D.C.; MORAIS NETO, O.L.; SILVA J.B.J. **Epidemiologia das doenças do aparelho circulatório no Brasil: uma análise da tendência da mortalidade.** Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. 2006; 16: 48-62.

SOUZA-RODRIGUES, R.D.; COSTA, A.M.; LIMA, R.R.; dos SANTOS, C.D.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; GOMES-LEAL, W. **Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum.** Brain Res. 1200:78-88; 2008.

SPANAGEL, R. **Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior.** Physiol Rev. 2009; 89: 649-705.

SPEAR, L.; VARLINSKAYA, E.I. **Sensitivity to Ethanol and Other Hedonic Stimuli in an Animal Model of Adolescence: Implications for Prevention Science?** Dev. Psychobiol. v. 52, p. 236–243, 2010.

SPEAR, L.P.; VARLINSKAYA, E.I. **Adolescence. Alcohol sensitivity, tolerance and intake.** Recent Dev Alcohol. 2005; 17: 143–159.

STANSFIELD, K.H.; KIRSTEIN, C.L. **Chronic cocaine or ethanol exposure during adolescence alters novelty-related behaviors in adulthood.** Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2007; 86: 637-642.

STIRLING, D.P.; KOOCHESFAHANI, K.M.; STEEVES, J.D.; TETZLAFF, W. **Minocycline as a neuroprotective agent.** Neuroscientist. 2005; 11: 308-322.

STREIT, W.J. **Micröglial senescence: Does the brain's immune system have an expiration date?** Trends Neurosci. 2006; 29: 506-510.

STRONG, K.; MATHERS, C.; LEEDER, S.; BEAGLEHOLE, R. **Preventing chronic diseases: how many lives can we save?** Lancet 2005, 366:1578-1582.

SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G.W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C.M.; CHAN, P.H. **Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia.** *NeuroRx*. 2004; 1: 17-25.

SULLIVAN, E.V.; PFEFFERBAUM, A. **Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair.** *Psychopharmacology*, 2005; 180:583 – 594.

SUN, A.Y.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; NEVE, E.; MATSUMOTO, H.; NISHITANI, Y.; MINOWA, Y.; FUKUI, Y.; BAILEY, S.M.; PATEL, V.B.; CUNNINGHAM, C.C.; ZIMA, T.; FIALOVA, L.; MIKULIKOVA, L.; POPOV, P.; MALBOHAN, I.; JANEBOVA, M.; NESPOR K.; SUN, G.Y. **Ethanol and oxidative stress.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2001; 25: 237–243.

SUN, H.; MOLACEK, E.; ZHENG, H.; FANG, Q.; PATEL, K.P.; MAYHAN, W.G. **Alcohol-induced impairment of neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-dependent dilation of cerebral arterioles: role of NAD(P)H oxidase.** *J. Mol. Cell Cardiol*. 2006; 40: 321–8.

SUN, H.; PATEL, K.P.; MAYHAN, W.G. **Impairment of neuronal nitric oxide synthase-dependent dilatation of cerebral arterioles during chronic alcohol consumption.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2002; 26: 663–670.

SUN, H.; ZHAO, H.; SHARPE, G.M.; ARRICK, D.M.; MAYHAN, W.G. **Effect of Chronic Alcohol Consumption on Brain Damage Following Transient Focal Ischemia.** *Brain Res*. 2008; 1194: 73–8.

TAKASHIMA, Y.; MIWA, Y.; MORI, T.; HASHIMOTO, M.; UCHINO, A.; YUZURIHA T.; SASAGURI, T.; YAO, H. **Sex differences in the risk profile and male predominance in silent brain infarction in community-dwelling elderly subjects: the Sefuri brain MRI study.** *Hypertens Res*. 3:748–52; 2010.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. **Apoptosis: controlled demolition at the cellular level.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9: 231–241.

TAYLOR, T.N.; DAVIS, P.H.; TORNER, J.C.; HOLMES, J.; MEYER, J.W.; JACOBSON, M.F. **Lifetime cost of stroke in the United States.** *Stroke*. 1996; 27: 1459-1466.

THEILE, J.W.; MORIKAWA, H.; GONZALES, R.A.; MORRISETT, R.A. **Ethanol enhances GABAergic transmission onto dopamine neurons in the ventral area of the rat.** *Alcohol Clin. Exp. Res*. 2008; 32:1040-1048.

THRIFT, A.; DONNAN, G.; MCNEIL, J. **Heavy drinking, but not moderate or intermediate drinking, increases the risk of intracerebral hemorrhage.** *Epidemiol*. 10:307–312; 1999.

THRIFT, A.G.; DEWEY, H.M.; STURM, J.W.; PAUL, S.L.; GILLIGAN, A.K.; SRIKANTH, V.K.; MACDONELL, R.A.L.; MCNEIL, J.J.; MACLEOD, M.R.; DONNAN, G.A. **Greater incidence of both fatal and nonfatal strokes in disadvantaged**

areas: The northeast melbourne stroke incidence study. Stroke. 2006; 37: 877-82.

TIKKA, T.M.; KOISTINAHO, J.E. **Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia.** J Immunol. 2001; 166: 7527-7533.

TIRAPELLI, L.F.; TAMEGA, O.J.; PETRONI, S. **Ultrastructural alterations of choroid plexuses of lateral ventricles of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism.** Arq. Neuro-Psiquiatr. 2000; 58: 25-31.

TOBAMIDANIK L.; ZABKIEWICZ, D. **Indicators of sense of coherence and alcohol consumption related problems: the 2000 U.S. National alcohol survey.** Subst. Use Misuse. 2009; 44: 357-373.

TOMINAGA, T.; OHNISHI, S.T. **Interrelationship of brain edema, motor deficits, and memory impairment in rats exposed to focal ischemia.** Stroke. 1989; 20: 513-518.

TZSCHENTKE, T.M.; SCHMIDT, W.J. **Glutamatergic mechanisms in addiction.** Mol Psychiatry. 2003; 8: 373–382.

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

VAN DEN BUUSE, M.; VAN ACKER, S. A.; FLUTTERT, M.; DE KLOET, E. R. **Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological “novelty” stress in freely moving rats.** Psychophysiology. 2001; 38: 490–499.

VANVLEET, T.M.; HELDT, S.A.; GUERRETTAZ, K.R. **Unilateral destruction of the dorsocentral striatum in rats produces neglect but not extinction to bilateral simultaneous stimulation.** Behav Brain Res. 136: 375–387; 2002.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. **Acute effects of ethanol on social behavior of adolescent and adult rats: Role of familiarity of the test situation.** Alcoholism, Clinical and Experimental Research, v. 26, p. 1502–1511, 2002.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. **Acute ethanol withdrawal (hangover) and social behavior in adolescent and adult male and female Sprague-Dawley rats.** Alcoholism, Clinical and Experimental Research v. 28, p. 40–50, 2004.

VASCONCELOS, S.M.M.; CAVALCANTE, R.A.; AGUIAR, L.M.V.; 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.** Braz. J. Med. and Biol. Res. 2004; 37: 1839-1846.

VASCONCELOS, S.M.M.; LIMA, N.M.; SALES, G.T.; SOARES, P.M.; Pereira, E.C.; FONTELES, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. **Determination of amino acid levels in the rat striatum, after administration of ethanol alone and associated with ketamine, a glutamatergic antagonist.** Neuroscience Letters. Supplement. 2008; 444: 48-51.

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

VERMA, R.; ARYA, K.N.; SHARMA, P.; GARG, R.K. **Understanding gait control in post-stroke: Implications for management**. Journal of Bodywork and Movement Therapies. 2010.

WÄCHTER, T.; RÖHRICH, S.; FRANK, A. Motor skill learning depends on protein synthesis in the dorsal striatum after training. Exp Brain Res. 200; 319-323; 2010.

WAHL, F.; ALLIX, M.; PLOTKINE, M.; BOULU, R. G. **Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats**. Stroke. 1992; 23: 267-272.

WALKER, D.W.; FREUND, G. **Impairment of shuttle box avoidance learning following prolonged alcohol consumption in rats**. Physiol. Behav. 1971; 7: 773-778.

WALLNER, M.; HANCHAR, H.J.; OLSEN, R.W. **Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans**. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 15218–15223.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. **The Open-Field Test: a critical review**. Psychol Bull. 1976; 83: 482-504.

WANG, L.; YU, C.; CHEN, H.; QIN, W.; HE, Y.; FAN, F. **Dynamic functional reorganization of the motor execution network after stroke**. Brain. 133:1224–38; 2010.

WEINBERGER, J.M. **Evolving therapeutic approaches to treating acute ischemic stroke**. J. Neurol. Sci. 2006; 249: 101–9.

WEIR, C.J.; KASTE, M.; LEES, K.R. **Glycine antagonist in neuroprotection (gain) international steering committee and investigators. Targeting neuroprotection clinical trials to ischemic stroke patients with potential to benefit from therapy**. Stroke. 2004; 35: 2111-2116.

WELLS, J.E.A.; HURLBERT, R.J.; FEHLINGS, M.G.; YONG, V.W. **Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice**. Brain. 1628-1637; 2003.

WHISHAW, I.Q.; HAUN, F.; KOLB, B. **Analysis of Behavior in Laboratory Rodents**. Springer. 1999; 44: 1243-1275.

WHITE, A.M.; SWARTZWELDER, H.S. **Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol**. Ann NY Acad Sci. 2004;1021: 206 –220.

WHOSIS. **WHO Statistical Information System**. Disponível em: <<http://www.who.int/whosis>>. 2003. Acessado em: 23 fev. 2012.

WILLIAMS, K.; RUSSEL, S.L.; SHEN, Y.M.; MOLINOFF, P.B. **Developmental switch in the expression of NMDA receptors occurs in vivo and in vitro.** *Neuron*. 1993; 10: 267-278.

WILLIS, B.R.; ANDERSON, R.A.; OSWALD, C.; ZANEVELD, L.J. **Ethanol-induced male reproductive tract pathology as a function of ethanol dose and duration of exposure.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983; 225: 470-478.

WIRKNER, K.; POELCHEN, W.; KÖLES, L.V.A. **Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels.** *Neurochem Int.* 1999; 35: 153-162.

WISE, S.P. In: **Luders HO, editor. Evolutionary and comparative neurobiology of the supplementary sensorimotor area, Supplementary sensorimotor area, advances in neurology.** Philadelphia: Lippincott-Raven; p. 71-84. 1996.

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

WOODWARD, J.J. **A comparison of the effects of ethanol and the competitive glycine agonist 7-chlorokynurenic acid on N-methyl-D-aspartate acid-induced neurotransmitter release from rat hippocampal slices.** *J Neurochem.* 62:987-91; 1994.

WOODWARD, J.J. **Ethanol and NMDA receptor signaling.** *Crit. Rev. Neurobiol.* 2000; 14: 69–89.

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

_____. **The Atlas of Heart Disease and Stroke.** ISBN 92 4 156276. 2004.

_____. **Project Investigators: The World Health Organization – MONICA Project (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease).** *J Clin Epidemiol.* 1988; 41: 105-114.

XERRI, C.; COQ, J.O.; MERZENICH, M.M.; JENKINS, W.M. **Experience-induced plasticity of cutaneous maps in the primary somatosensory cortex of adult monkeys and rats.** *Journal of Physiology Paris.* 90 (3-4):277-287; 1996.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. **A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells.** *Nature.* 1988; 332: 411-415.

YANG, M.X.; CEDERBAUM, A.I. **Characterization of cytochrome P4502E1 turnover in transfected HepG2 cells expressing human CYP2E1.** *Arch. Biochem. Biophys.* 341: 25-33; 1997.

YEVENES, G.E.; ZEILHOFER, H.U. **Allosteric modulation of glycine receptors.** British Journal of Pharmacology. 2011; 164: 224–236.

YONEMORI, F.; YAMAGUCHI, T.; YAMADA, H.; TAMURA, A. **Evaluation of a Motor Deficit After Chronic Focal Cerebral Ischemia in Rats.** J Cereb Blood Flow Metab. 1998; 18: 1099-1106.

YONG, V.W.; WELLS, J.; GIULIANI, F.; CASHA, S.; POWER, C.; METZ, L.M. **The promise of minocycline in neurology.** The Lancet Neurology. 2004; 3: 744-751.

YRJANHEIKKI, J.; KEINANEN, R.; PELLIKKA, M.; HOKFELT, T.; KOISTINAHO, J. **Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998; 95: 15769-15774.

YRJANHEIKKI, J.; TIKKA, T.; KEINANEN, R.; GOLDSTEINS, G.; CHAN, P.H.; KOISTINAHO, J. **A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999; 96: 13496-13500.

ZHANG, Y.; LASTER, M.J.; HARA, K.; HARRIS, R.A.; EGER, E. 2nd, STABERNACK, C.R.; SONNER, J.M. **Glycine receptors mediate part of the immobility produced by inhaled anesthetics.** Anesth Analg. 2003; 96: 97–101.

ZHAO, H.; MAYHAN, W.G.; ARRICK, D.M.; XIONG, W.; SUN, H. **Alcohol-induced exacerbation of ischemic brain injury: role of NAD(P)H oxidase.** Alcohol Clin Exp Res. 2010; 34: 1948-1955.

ZHAO, M.; MOMMA, S.; DELFANI, K.; CARLÉN, M.; CASSIDY, R.M.; JOHANSSON, C.B.; BRISMAR, H.; SHUPLIAKOV, O.; FRISÉN, J.; JANSON, A.M. **Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra.** Neuroscience. Proc Natl Acad Sci. 100(13): 7925–7930; 2003.

ZHU, S.; STAVROVSKAYA, I.; DROZDA, M.; KIM, B.; ONA, V.; LI, M. **Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice.** Nature. 417: 74–8; 2002.

ZIERATH, D.; THULLBERY, M.; HADWIN, J.; GEE, J.M.; SAVOS, A.; KALIL A.; BECKER, K.J. **CNS immune responses following experimental stroke.** Neurocrit Care. 12:274–284; 2010.

ZIV, I.; FLEMINGER, G.; DJALDETTI, R.; ACHIRON, A.; MELAMED, E.; SOKOLOVSKY, M. **Increased Plasma Endothelin-1 in Acute Ischemic Stroke.** Stroke. 1992; 23: 1014-1016.

VIII ANEXO



comitê de ética em pesquisa
com animais de experimentação

PARECER BIO007-09

Projeto: Efeitos Neurocomportamentais e Neuroprotetores na recuperação funcional após bloqueio da ativação microglial com minociclina em ratos submetidos à isquemia focal no cortex motor quando tratados cronicamente com etanol da adolescência à fase adulta

Coordenador: Prof. Dra Cristiane do Socorro Ferraz Maia

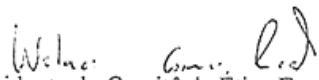
Área Temática: Biologia

Vigência: 01/2009 a 01/2011

Nº no CEPAE-UFPA: BIO001-09

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 1568/2005 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, 01 de janeiro de 2009


Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa
Com Animais de Experimentação da Universidade
Federal do Pará