

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

LYVIA MARIA VASCONCELOS CARNEIRO

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO ETANOL EM
FILHOTES DE RATAS EXPOSTAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL**

FORTALEZA

2007

LYVIA MARIA VASCONCELOS CARNEIRO

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO ETANOL EM FILHOTES
DE RATAS EXPOSTAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

Dissertação submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.

FORTALEZA

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- C287e Carneiro, Lyvia Maria Vasconcelos.
Efeitos comportamentais e neuroquímicos do etanol em filhotes de ratas expostas durante o período gestacional / Lyvia Maria Vasconcelos Carneiro. – 2007.
113 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2007.
Área de Concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.
1. Deficiência Intelectual. 2. Etanol. 3. Gravidez. 4. Teratogênese. I. Título.

CDD 615.1

LYVIA MARIA VASCONCELOS CARNEIRO

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO ETANOL EM FILHOTES
DE RATAS EXPOSTAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

Dissertação submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição.

Data da Defesa: __/__/__

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Glauce Socorro de Barros Viana

Prof^ª. Dr^ª. Marta Maria de França Fonteles

Prof. Dra. Luzia Kalyne Almeida Leal

A Deus

Pela vida e por este momento.

Aos meus Pais

*Pelo apoio incondicional e amor,
principalmente nos momentos de
indecisão e incertezas.*

Aos meus Irmãos

*Pelo carinho e apoio de estarem
sempre junto a mim.*

AGRADECIMENTOS

** À Profa. Glauce Socorro de Barros Viana pela atenção, dedicação, competência, qualidades humanas e pela confiança em mim depositada ao aceitar-me como orientando na realização deste trabalho.*

** Aos Profs. do curso de pós-graduação em Farmacologia, que de maneira direta ou indireta fizeram parte deste trabalho, em especial as professoras Cléa Florenço de Sousa e Marta Maria de França Fonteles.*

**Ao Gislei Frota Aragão pela grande e valiosa cooperação, onde também me motivou bastante para a conclusão deste trabalho.*

** À Emanuelle Coelho Noronha e Patrícia Bezerra Gomes por sempre estarem dispostas a ajudar, auxiliando muito neste trabalho.*

** Aos amigos da pós-graduação, em especial ao João Paulo, Viviane, Cícero, Lissiana, Silvânia, Kalyne, Aline pela amizade, ajuda mútua e alegre convivência no período do curso.*

** A Vilani Rodrigues Bastos e Jaqueline pela amizade e imprescindível auxílio técnico.*

** Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, com os quais tive ótimo convívio e pude contar com suas colaborações.*

** Ao CNPq pela concessão dos recursos financeiros*

Encontra-se na Bíblia uma das primeiras advertências sobre os riscos do álcool na gravidez quando um anjo aparece para a mãe se Sansão e diz: *“Bem sabes que és estéril e que não tens filhos, mas tu conceberás e darás a luz a um filho. Agora pois, guarda-te de beber vinhos e também nenhuma bebida fermentada...”* (Juízes 13: 3-4). Também o anjo mais adiante fala para Manoel (Pai de Sansão), quando este nasce *“Não provarás nada do que procedes da vinha, nem beberás vinho e nem bebida fermentada...”* (Juízes 13:14).

RESUMO

Neste trabalho procuramos estudar os aspectos comportamentais como também as alterações neuroquímicas em filhotes de 21 dias de ambos os sexos em média com 26g de peso, nascidos de fêmeas de ratos Wistar onde foi administrados diariamente etanol em duas doses diferentes (0,5 e 4 g/Kg, via oral), por 30 dias antes da gravidez e durante todo o período gestacional. Os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e nado forçado foram utilizados para avaliar os efeitos do etanol na locomoção, ansiedade e depressão, respectivamente. Ensaios de *binding* foram usados para identificar receptores dopaminérgicos (D_1 e D_2) e muscarínicos ($M_1 + M_2$). Os resultados no teste de labirinto em cruz elevado indicaram aumento significativo e dose-dependente no número de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, nos filhotes expostos ao etanol no período pré-natal quando comparado com o controle, indicando um efeito ansiolítico. No teste do campo aberto, estes grupos apresentaram diminuição na atividade locomotora espontânea assim como na ocorrência de *rearing* e *grooming*. Os filhotes também apresentaram aumento do tipo dose-dependente no tempo de imobilidade no teste de nado forçado, caracterizando um comportamento depressivo. Diminuições observadas através de *binding* dopaminérgico nas áreas do hipocampo ($D_2= 32\%$ e $D_1= 25\%$) e corpo estriado ($D_2= 30\%$ e $D_1= 52\%$) foram detectados nos filhotes expostos ao etanol por outro lado, aumentos significantes foram observados no *binding* muscarínico no hipocampo (40%) como no corpo estriado (42%). Este estudo mostra evidências que exposições ao etanol na fase uterina produz efeitos em longo prazo no desenvolvimento e nas características farmacológicas dos sistemas cerebrais que podem ter importantes implicações no comportamento e respostas neuroquímicas que ocorrem nos filhotes.

Palavras-Chave: Retardo Mental. Etanol. Gravidez. Teratogênese.

ABSTRACT

Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol. The work studied behavioral and neurochemical alterations in 21-day-old pups, from both sexes (26 g on average) born from female Wistar rats administered daily with ethanol (0.5 or 4.0 g/kg, p.o.), for 30 days before mating, and throughout their gestational period. Ethanol administration continued from delivery up to weaning. The open field, elevated plus maze and forced swimming tests were used to evaluate effects of ethanol on locomotion, anxiety and depression, respectively. Binding assays were used to identify dopaminergic (D₁- and D₂-like) and muscarinic (M₁ plus M₂) receptors. Results of the plus maze test indicated significant and dose-dependent increases in the number of entrances in the open arms and in the time of permanence in the open arms, in the prenatally ethanol-exposed offspring, as compared to controls, indicating an anxiolytic effect. In the open field test, this group presented decreases in spontaneous locomotor activity as well as in the occurrences of rearing and grooming. Offspring also showed dose-dependent increases in their immobility time in the forced swimming test, characterizing despair behavior. Decreases in the hippocampal (D₂: 32%; D₁: 25%) and striatal (D₂: 30%; D₁: 52%) dopaminergic binding were detected in ethanol-exposed offspring. On the other hand, significant increases were observed in muscarinic binding in the hippocampus (40%) as well as in the striatum (42%). This study shows evidence that in utero ethanol exposure produces a long-lasting effect on development and pharmacological characteristics of brain systems that may have important implications in behavioral and neurochemical responsiveness occurring in adulthood.

Keywords: Mental Retardation. Ethanol. Pregnancy. Teratogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplo de criança de 8 anos de idade com Síndrome Álcool Fetal.....51
- Figura 2:** Recém-nascido com sintomas característicos da SAF.....52
- Figura 3:** Efeito do etanol sobre filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame na diminuição de receptores D1 do hipocampo.....75
- Figura 4:** Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame na diminuição de receptores D1 do núcleo da base analisado conforme técnica de *Binding*77
- Figura 5:** Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame na diminuição de receptores D₂ do hipocampo analisado conforme técnica de *Bindin*.....79
- Figura 6:** Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame na diminuição de receptores D₂ do núcleo da base analisado conforme técnica de *Binding*81
- Figura 7:** Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame no aumento de receptores M₁ + M₂ do núcleo da base analisado conforme técnica de *Binding*.....83
- Figura 8:** Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame no aumento de receptores M₁ + M₂ do núcleo da base analisado conforme técnica de *Bindin*.....85

Figura 9: Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame no teste do labirinto	88
Figura 10: Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame no teste do labirinto.....	89
Figura 11: Efeitos comportamentais em nível de SNC do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame.	92
Figura 12: Efeitos comportamentais em nível de SNC do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame.	93
Figura 13: Efeitos comportamentais em nível de SNC do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame.....	94
Figura 14: Efeitos do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do etanol no teste do labirinto em cruz elevado em filhotes de ratos de 21 dias.....	87
Tabela 2: Efeito da exposição de etanol em filhotes de ratas que foram submetidas a ingestão diária durante o período pré e gestacional no teste do Campo Aberto.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

[³H] - NMS – [³H] - N-metilescopolamina

[³H]-SCH – [³H]-espiroperidol

°C – grau centígrado

5-HT – serotonina

A.C. – antes de Cristo

ACECC – administração crônica de etanol em culturas de células

ACTH – hormônio adenocorticotrófico

AMPc – adenosina monofosfato cíclica

ATV – área tegumentar ventral

BAR – barbituratos

BDZ – benzodiazepínicos

BSA – albumina sérica bovina

CCVS – canais de cálcio voltagem sensíveis

cm – centímetro

CuSO₄.5H₂O – sulfato de cobre penta hidratado

DAS – defeito do septo atrial

DZP – diazepam

EAF – efeito alcoólico fetal

ERE – estoques do retículo endoplasmático

EtOH – etanol

g – grama

GABA – ácido gama aminobutírico

GMPc – guanidina monofosfato cíclica

h – hora

HCl – ácido clorhídrico

KCl – cloreto de potássio

Kg – kilograma

L – litro
mg – miligrama
MgCl₂ – cloreto de magnésio
μg – micrograma
μM – micromolar
mL – mililitro
mM – milimolar
N – normal
NaEDTA – Etilenodiamino tetracético sódico
Na₂CO₃ – bicarbonato de sódio
Nacc – núcleo *accubens*
NaCl – cloreto de sódio
NaH₂PO₄ – fosfato monossódico
NaKC₄H₄O₆.4H₂O – tartarato de sódio e potássio tetra hidratado
NaOH – hidróxido de sódio
nm – nanômetro
nM – nanomolar
NMDA – N-metil-D-aspartato
NO – óxido nítrico
P.A. – para análise
pg – picograma
pmol – picomol
RI – receptores ionotrópicos
RM – receptores metabotrópicos
RN – recém nascido
RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro
SAF – síndrome álcool fetal
SIAT – sistema de informações sobre agentes teratogênicos
SNC – sistema nervoso central
TRH – terapêutica de reposição hormonal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1	Álcool.....	18
1.1.1	Aspectos Históricos.....	18
1.2	Neurofarmacologia do álcool.....	20
1.2.1	Mecanismo de ação do etanol.....	21
1.2.2	Transmissão Glutamatérgica.....	22
1.2.3	Transmissão Gabaérgica.....	26
1.2.4	Transmissão Dopaminérgica.....	28
1.3	Alcoolismo.....	32
1.3.1	Prevalência e problemas sociais.....	32
1.3.2	Problema multifatorial.....	34
1.3.3	Bases moleculares do alcoolismo.....	35
1.3.4	Genes candidatos no SNC.....	36
1.3.5	Heterogeneidade no alcoolismo.....	37
1.3.6	Variabilidade genética e resposta a tratamentos.....	39
1.3.7	Particularidades do alcoolismo feminino.....	42
1.3.8	Alcoolismo e ciclo menstrual.....	44
1.3.9	Impacto sobre os aspectos endócrinos.....	45
1.3.10	Alcoolismo e câncer.....	47
1.3.11	Alcoolismo e osteoporose.....	47
1.3.12	Alcoolismo, menopausa e Terapêutica de Reposição Hormonal.....	48
1.4	Síndrome Álcool Fetal.....	50
1.4.1	Causas, incidências e fatores de riscos.....	52
2 OBJETIVOS		
2.1	Geral	57
2.2	Específicos.....	57

3 MATERIAIS

3.1 Animais.....	58
3.2 Material Utilizado nos experimentos.....	58
3.3 Preparo da droga.....	58

4 MÉTODOS

4.1 Tratamento dos grupos experimentais.....	61
4.2 Teste Comportamentais.....	62
4.2.1 Teste de Labirinto em Cruz elevado.....	62
4.2.2 Nado Forçado.....	63
4.2.3 Teste de Campo Aberto.....	64
4.3 Dissecção da área cerebral.....	64
4.3.1 Determinação da densidade de receptores muscarínicos.....	65
4.3.2 Determinação da densidade dos receptores dopaminérgicos.....	68
4.3.3 Dosagem de proteína.....	71
4.4 Soluções Reagentes.....	67
4.5 Análise Estatística.....	72

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do etanol sobre filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame na diminuição de receptores D1 do hipocampo.....	75
5.2 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame na diminuição de receptores D1 do núcleo da base.....	77
5.3 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame na diminuição de receptores D ₂ do hipocampo.....	79
5.4 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame na diminuição de receptores D ₂ do núcleo da base	81
5.5 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame no aumento de receptores M ₁ + M ₂ do hipocampo.....	83
5.6 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame no aumento de receptores M ₁ + M ₂ do núcleo da base	85

5.7 Efeito do etanol no teste do labirinto em cruz elevado em filhotes de ratos de 21 dias.....	63
5.8 Efeito da exposição de etanol em filhotes de ratas que foram submetidas a ingestão diária durante o período pré e gestacional no teste do Campo Aberto.....	79
5.9 Efeitos do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.....	88
6 DISCUSSÃO.....	98
7 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Álcool

1.1.1 Aspectos Históricos

O álcool etílico, etanol ou simplesmente álcool é a droga mais antiga utilizada pelo homem. O nome é de origem árabe, AL-KOHOL, indicando inicialmente as substâncias voláteis em geral. Toda a história da humanidade está permeada pelo consumo de álcool, registros arqueológicos revelam que os primeiros indícios sobre consumo de álcool pelo ser humano, datam de aproximadamente 6.000 A.C., sendo, portanto, um costume extremamente antigo e que tem persistido por milhares de anos. A noção do álcool (vinho) como uma substância divina, por exemplo, talvez seja um dos fatores responsáveis pela manutenção do hábito de beber ao longo dos tempos.

Inicialmente, as bebidas tinham conteúdo alcoólico relativamente baixo, como, por exemplo, o vinho e a cerveja, já que dependiam exclusivamente do processo de fermentação. Com o advento do processo de destilação, introduzido na Europa pelos árabes da Idade Média, surgiram novos tipos de bebidas alcoólicas, que passaram a ser utilizadas na sua forma destilada. Nesta época, este tipo de bebida passou a ser considerado como um remédio para todas as doenças, pois “dissipavam as preocupações mais rapidamente do que o vinho e a cerveja, além de produzirem um alívio mais eficiente da dor”, surgindo, então, a palavra whisky (do gálico “usquebaugh”, que significa “água da vida”).

A partir da revolução industrial, registrou-se um grande aumento da oferta deste tipo de bebida, contribuindo para um maior consumo e, conseqüentemente, gerando um aumento no número de pessoas que passaram a apresentar algum tipo de problema devido ao uso excessivo de álcool.

Os efeitos adversos do consumo de álcool durante a gestação já são bem reconhecidos do ponto de vista histórico. Há referências na Bíblia, em Juízes 13 : 7,

nas leis de Cartago e citações de Aristóteles na Grécia denunciando os perigos de tal uso. Este problema foi discutido na literatura médica durante o final do século XIX e início do século XX por Sullivan, que avaliou filhos de alcoólatras em Liverpool, denominando-os de “doentes e pequenos”, porém nos anos posteriores, até o final da década de 60, o problema deixou de ser abordado ou foi subestimado na literatura (Streissguth et al., 1980).

Em 1968, Lemoine e col. Descreveram 127 casos de exposição fetal ao álcool em filhos de mulheres alcoólatras, resultando em um espectro de 25 indivíduos com dismorfias faciais e distúrbios psicomotores. Em 1973, Jones e Smith descreveram o mesmo padrão de alterações na morfogênese e disfunção do sistema nervoso central em oito crianças, cujas mães eram alcoólatras crônicas. A partir deste estudo foi introduzido o termo síndrome do Álcool Fetal (SAF) para descrever este conjunto de características associadas ao alcoolismo materno, caracterizado por malformações, dismorfias principalmente faciais, retardo de crescimento, retardo da maturação psicomotora e desenvolvimento intelectual diminuído. Após o surgimento de centenas de relatos de casos e de estudos epidemiológicos nos últimos 25 anos, atualmente esta síndrome é reconhecida como a principal causa de retardo mental em países desenvolvidos (Jones & Smith, 1973; Spohr e col., 1993).

No momento, o álcool está bem estabelecido como uma droga teratogênica capaz de causar abortamentos, aumento na taxa de natimortalidade e disfunção do sistema nervoso central por interferir com a proliferação normal e a migração de células neuronais e gliais, seja direto do etanol e do acetaldeído no meio intracelular, seja por hipóxia induzida hemodinamicamente ou por outros mecanismos (Sampson e col., 1997).

Adicionalmente a estes dados, cabe ressaltar que análises populacionais estimam que 2 % a 5 % das mulheres norte-americanas abusam do álcool, sendo que em 1993 foi estimado pelo National Household Survey on Drug Abuse que 2 % das mulheres são consideradas consumidoras pesadas, termo definido como ingerir cinco ou mais drinques por ocasião em cinco ou mais dias do mês anterior. Igualmente, uma análise populacional de 29 mil amostras de urinas de gestantes no período do parto

estimou que a prevalência de uso de álcool foi de 6,7 %. Em 1998, Ebrahim e col. Demonstraram em um estudo abrangendo 5.983 grávidas nos Estados Unidos que 14,6 % das gestantes consumiam álcool e que 2,1 % fizeram uso de álcool frequentemente durante a gestação (Stein & Cyr, 1997).

No Brasil não localizamos estudos epidemiológicos sobre o consumo de álcool na gestação. Em uma amostra de puérperas, Montoya (1991) encontrou que 32,8 % das mulheres haviam consumido bebidas alcoólicas em algum momento da gestação. Na amostra de pacientes que consultam o Sistema de Informações sobre Agentes Teratogênicos (SIAT) de Porto Alegre – RS, em torno de 30,4 % das gestantes referem o consumo de álcool, em quantidade não especificada, durante a gravidez (Schuler e col., 1993).

Sendo assim, a alta prevalência de consumo de álcool durante a gestação torna necessário um maior esforço em termos de saúde pública para educar as mulheres sobre os potenciais malefícios para a saúde embriofetal do uso de álcool durante o período gestacional (Ebrahim e col., 1998).

1.2 A Neurofarmacologia do álcool

O álcool etílico (etanol) é um depressor do Sistema Nervoso Central, e esta depressão é dose-dependente. Apesar de ser consumido especialmente pela sua ação estimulante, esta é apenas aparente e ocorre com doses moderadas, resultando da depressão de mecanismos controladores inibitórios. O córtex, que tem um papel integrador, sob o efeito do álcool é liberado desta função, resultando em pensamento desorganizado e confuso, bem como interrupção adequada do controle motor.

O etanol se difunde pelos lipídeos, alterando a fluidez e a função das proteínas. Altas concentrações de álcool pode diminuir as funções das bombas Na^+K^+ /ATPase no transporte de elétrons, este efeito compromete a condução elétrica.

1.2.1 O mecanismo de ação do etanol

O fenômeno da excitotoxicidade resulta da ativação excessiva da neurotransmissão glutamatérgica, onde pode ocorrer degeneração neuronal em algumas regiões específicas do SNC, sendo o receptor NMDA o principal canal envolvido na morte neuronal.

A administração aguda de etanol produz uma diminuição significativa na concentração de Ca^{2+} , enquanto o uso crônico dessa droga sensibiliza neurônios hipocâmpais a excitotoxicidade mediada por receptores NMDA.

Muitos compostos novos como, por exemplo, abecarnil e tiaprida têm sido desenvolvidos para ajudar no tratamento da síndrome de dependência ao etanol. Essas drogas atuam, respectivamente, como agonista parcial na síndrome de abstinência, causando efeito ansiolítico e bloqueando os efeitos estimulantes do etanol.

O aspecto mais interessante, no contexto deste estudo, é a aplicação do conhecimento científico na elaboração de novas drogas que poderão, num futuro próximo, contribuir para o tratamento efetivo da síndrome de dependência ao etanol.

Já é fato conhecido que o álcool é a segunda substância psicoativa mais consumida no mundo depois da cafeína. Em consequência do seu uso, aparecem os acidentes automobilísticos, os acidentes de trabalho, as doenças orgânicas como, por exemplo, hepatopatias e neuropatias, além dos quadros de dependência que geram inúmeros transtornos familiares e graves problemas sociais. Por isso, é imprescindível o desenvolvimento de estudos sobre o mecanismo pelo qual o álcool produz sua atividade psicotrópica, na tentativa de tratar e prevenir os problemas relacionados ao seu consumo.

De uma maneira geral, o tratamento farmacológico da dependência ao álcool envolve, atualmente, os agentes para o tratamento da síndrome de abstinência,

os agentes aversivos e os agentes para diminuir o desejo ou evitar a reincidência (Besson, 1997).

Um dos aspectos mais importantes e relevantes são os recentes dados mostrando que o etanol altera seletiva e especificamente a função de várias proteínas ligadas à membrana, desafiando a hipótese, chamada de "hipótese de membrana, de que o etanol é considerado uma droga não-específica" e que produz certos efeitos fisiopatológicos, desequilibrando os componentes lipídicos das membranas neuronais. Entretanto, pelo fato de essa droga afetar vários sistemas de neurotransmissores, o conhecimento de como isso ocorre, provavelmente, é a chave para explicar as suas ações psicoativas " (Tabakoff e Hoffman, 1987; Gonzales e Hoffman, 1991; Samson e Harris, 1992).

Este trabalho relata os avanços recentes sobre o mecanismo de ação do etanol e o envolvimento dos sistemas de neurotransmissores no tratamento da síndrome de dependência ao álcool. Entretanto, como é impossível incluir todos os sistemas de neurotransmissores, que são afetados por essa droga, no espaço limitado deste trabalho, serão abordadas somente as pesquisas relacionadas à transmissão glutamatérgica, gabaérgica e dopaminérgica.

1.2.2 Transmissão Glutamatérgica

O glutamato é o principal transmissor excitatório do SNC, sendo as suas respostas mediadas por vários subtipos de receptores, classificados como ionotrópicos (RI) ou metabotrópicos (RM), dependendo da via de transdução envolvida. Os RI (AMPA, kainato ou NMDA) são canais iônicos de membrana, permeáveis aos cátions quando ativados, enquanto os RM (RM1 _ RM8) estão relacionados à via de segundos mensageiros, que regulam a atividade dos canais iônicos de membrana e outros processos celulares (Hollmann e Heinemann, 1994; Leslie et al., 1990).

Uma função importante dos receptores do glutamato é a propriedade de eles desenvolverem excitotoxicidade, que está relacionada à degeneração de neurônios em

regiões específicas do SNC (sistema nervoso central), como, por exemplo, o hipocampo, o córtex e o estriado (Lovinger, 1993).

A ativação dos RI aumenta o Ca^{2+} (cálcio) intracelular utilizando várias vias, como o influxo por meio do canal do RI, influxo por meio dos canais de cálcio voltagem sensíveis (CCVS), que são ativados por despolarização da membrana, e a liberação de Ca^{2+} dos estoques do retículo endoplasmático (ERE), controlado pelo receptor rianodine, o qual é ativado pela concentração de Ca^{2+} intracelular (Gruol et al., 1996).

Pesquisas recentes demonstraram que o aumento de Ca^{2+} relacionado à ativação de RI (AMPA/kainato), RM e despolarização de K^+ , são alterados pela administração aguda de etanol em cultura cerebelar de neurônios de Purkinje, conhecidos por possuírem abundantes canais de Ca^{2+} (Gruol et al., 1997).

Assim sendo, é sugerido que o uso de agonista do receptor AMPA aumenta a concentração de Ca^{2+} nas regiões somáticas e dendríticas dos neurônios de Purkinje, entretanto, o etanol altera essa resposta, de maneira dose-dependente, sendo que com a dose de 10 mM não é observado nenhum efeito, enquanto com as doses de 33 mM e 66 mM, produz uma significativa diminuição. Da mesma forma, a utilização de agonistas do RM também aumenta a concentração de Ca^{2+} em ambas as regiões dos neurônios de Purkinje, porém, com a administração de 10 mM de etanol, há um aumento desses sinais, o que não ocorre com as doses de 33 mM e 66 mM. Os resultados desse estudo indicam que os componentes da via de sinalização do Ca^{2+} , sensíveis ao etanol, estão localizados nos neurônios de Purkinje; o etanol produz um efeito máximo na dose de 33 mM sobre os receptores AMPA e a ativação do RM é altamente sensível ao etanol agudo. Entretanto, a sensibilidade ao etanol, relacionada à transmissão glutamatérgica, é provavelmente dependente do subtipo de receptor do glutamato, visto que os sinais de Ca^{2+} relacionados à ativação dos RI e RM variam na sensibilidade e na resposta ao etanol (Gruol et al., 1997).

Por outro lado, o receptor NMDA é o principal canal envolvido na morte neuronal devido ao aumento da permeabilidade do canal de Ca^{2+} que está associado a esse receptor e, possivelmente, desempenha uma função importante na

neurotoxicidade observada no abuso de álcool ou na síndrome de abstinência ao álcool (Mayer e Westbrook, 1987; Hartley et al., 1993; Tymianski et al., 1993; Lovinger, 1993).

Sabe-se, no entanto, que o receptor NMDA é sensível à inibição pela administração aguda de 5 a 100 mM de etanol, que corresponde ao limite que produz intoxicação in vivo. Também tem sido observado que a exposição aguda de etanol previne a excitotoxicidade produzida pela ativação de receptores NMDA, em cultura de neurônios do SNC, sendo que esse efeito parece estar relacionado à inibição de influxo de Ca^{2+} por meio dos canais iônicos, acoplados a esse tipo de receptor (Bhave et al., 1996; Lovinger, 1993).

Ao contrário da administração aguda, o uso de etanol crônico parece induzir um aumento adaptativo na função do receptor NMDA (Ahern et al., 1994; Blevins et al., 1995).

Estendendo essa informação, recentemente, vários estudos de binding evidenciaram que, após ACECC ou abuso crônico de etanol, há um aumento do número de receptores do glutamato, mas nenhuma mudança na sua afinidade. Já outros achados da literatura sugerem uma complexa alteração da função do receptor NMDA na (ACECC), que pode envolver outras mudanças, além de um aumento na densidade de receptores, como, por exemplo, mudanças na liberação de glutamato nos terminais pré-sinápticos. Também é possível sugerir que haja alterações na composição das subunidades do receptor NMDA, pois elas podem afetar as propriedades do receptor, a afinidade agonista, a permeabilidade ao cálcio ou o aumento de Ca^{2+} intracelular (Freund e Anderson, 1996; Hoffman et al., 1995; Grant et al., 1997; Koltchine et al., 1996; Kuner e Schoepfer, 1996; Lovinger, 1993).

Outra observação interessante está relacionada ao fato de que a administração crônica de etanol em cultura de células (ACECC) sensibiliza neurônios hipocámpais a excitotoxicidade mediada por receptores NMDA, não envolvendo, entretanto, os receptores AMPA/kainato ou os CCVS do tipo L. Pelo fato de que não houve um aumento da excitotoxicidade induzida por AMPA ou kainato, é possível

sugerir que não haja uma resposta adaptativa desses receptores nessas condições experimentais.

Já a ativação dos CCVSs não induz morte celular, mas é possível que esses canais estejam associados com a excitotoxicidade mediada por receptores NMDA, visto que a administração de nifedipina, bloqueador de canal de cálcio do tipo L, em neurônios-controle, diminui a excitotoxicidade induzida por esses receptores. A ausência desse efeito após ACECC, em neurônios hipocâmpais, sugere que haja uma diminuição no número de canais ou uma alteração na função ou nas propriedades farmacológicas desse canal, nesse tipo de exposição. Entretanto, a excitotoxicidade induzida por NMDA parece ser mediada pela ativação de CCVS em culturas-controle (Smothers et al., 1997).

Por outro lado, estudos comportamentais sugerem o envolvimento da ativação excessiva do receptor NMDA na expressão e, talvez, até no desenvolvimento das crises relacionadas à síndrome de abstinência ao etanol. Todavia, em virtude das inúmeras evidências, relatando a presença de excitotoxicidade após a ativação excessiva dos receptores NMDA, é possível de se imaginar o potencial que esses receptores possuem para desenvolver excitotoxicidade durante a síndrome de abstinência ao etanol. Entretanto, a redução da gravidade das crises presentes na síndrome de abstinência ao etanol é obtida com a administração de MK801 ou de outros antagonistas do receptor NMDA, quando administrados antes ou durante o período máximo dessas crises (Lovinger, 1993).

Curiosamente, alguns estudos demonstram que os maiores determinantes de morte celular envolvem a duração da exposição agonista, a via de entrada de cálcio e a capacidade de tamponamento do neurônio, e não o pico de concentração de Ca^{2+} , enquanto outros dados recentes mostram que a elevação da excitotoxicidade, observada após ACECC, está associada ao aumento da resposta de Ca^{2+} proveniente do receptor NMDA (Tymianski et al., 1993; Smothers et al., 1997).

1.2.3 Transmissão Gabaérgica

O ácido g-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor inibitório no SNC de mamíferos, sendo que sua ação se deve à ativação de, pelo menos, duas classes de receptores denominados de GABA-A e GABA-B.

O receptor ionóforo GABA-A é o mais distribuído no SNC e sua ativação causa a abertura dos canais de CL⁻ (cloreto), que estão associados a esse receptor, hiperpolarizando, conseqüentemente, a membrana e produzindo um potencial pós-sináptico inibitório. Esse receptor é composto de várias classes de subunidades (α, β, γ, δ e ρ) que podem lhe conferir diferentes propriedades farmacológicas (Smith e Olsem, 1995; Lüddens et al., 1994; Mohler et al., 1996; Sieghart, 1995).

Em animais dependentes de etanol, há uma diminuição significativa dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) das subunidades α1 e α2 do receptor GABA-A, enquanto há um aumento significativo dos níveis de RNAm das subunidades α4, γ1 e γ2S. Já outros estudos mostram resultados conflitantes, ou seja, baixos níveis de peptídeos α4 e nenhuma diferença nos níveis da subunidade γ2 (Devauld et al., 1995b; Mohler et al., 1996; Devauld et al., 1997).

Por outro lado, durante o pico comportamental da síndrome de abstinência ao etanol, a expressão de RNAm das subunidades α1, α4 e γ2S retorna aproximadamente aos níveis controle, enquanto é observado um aumento significativo no RNAm das subunidades β2, β3 e γ1 (Devauld et al., 1996).

As alterações na expressão dos genes das subunidades do receptor GABA-A podem resultar em populações de receptores com propriedades diferentes daquelas do estado de não-dependência ao etanol. Assim sendo, estudos de biologia molecular, utilizando *xenopus laevis* oocytes, indicam que o etanol potencia somente os receptores que contêm a variante longa da subunidade γ2. Pelo fato de que apenas a subunidade longa, e não a curta, possui um sítio de fosforilação, é possível que esse estado de fosforilação seja importante no efeito do etanol (Devauld et al., 1997; Lovinger, 1993).

Os benzodiazepínicos (BDZ) e os barbituratos (BAR) parecem exercer seus efeitos terapêuticos interagindo com os receptores GABA-A, sendo que muitos desses efeitos comportamentais, como, por exemplo, ação anticonvulsivante, ansiolítica, sedativa/hipnótica e propriedades anestésicas, são compartilhados com o etanol. Quando ocorre o consumo de etanol, por longo tempo, é produzida tanto a dependência quanto a tolerância a esses efeitos, as quais podem estar relacionadas a uma diminuição da atividade dos receptores GABA-A (Morrow, 1995; Sanna et al., 1993).

Acredita-se que os sintomas da síndrome de abstinência (ansiedade, disforia, insônia e tremores) possam estar relacionados com a repercussão da hiperexcitabilidade do SNC, manifestada com a retirada abrupta do etanol. Dessa forma, sugere-se que a síndrome de Abstinência, provocada pelo etanol, possa ser mediada, pelo menos em parte, por redução da função dos receptores GABA-A no cérebro (Devauld et al., 1997).

Embora muitos dos sintomas da síndrome de abstinência ao álcool sejam benignos, podendo ser tratados com apenas medidas de suporte, a síndrome de abstinência, de moderada à severa, é mais bem tratada farmacologicamente (Anton e Becker, 1995).

Os objetivos do tratamento da síndrome de abstinência ao álcool são direcionados a minimizar os distúrbios fisiológicos, a inibir o surgimento dos sintomas mais sérios de abstinência, assim como as crises e o *delírio tremens*, e a estimular o início da reabilitação do alcoolismo.

Apesar da eficácia já demonstrada com os BDZ no tratamento da síndrome de abstinência não complicada, há algumas referências sobre a implicação de abuso dessas drogas durante a detoxificação alcoólica, além dos efeitos colaterais desses compostos que incluem a inibição cognitiva e a sedação (Jaffe et al., 1983).

O desenvolvimento de drogas relacionadas aos BDZ, como, por exemplo, a beta-carbolina e o abecarnil, que têm alta afinidade pelos receptores benzodiazepínicos, mas atuam farmacologicamente como agonistas parciais, podem

ser mais específicas em seus efeitos terapêuticos enquanto minimizam os efeitos comportamentais indesejáveis (Stephens et al., 1990).

Inúmeros trabalhos têm demonstrado que abecarnil causa efeito ansiolítico, demonstra um menor efeito sedativo em comparação ao diazepam, possui pouco potencial para abuso quando comparado com alprazolam e diazepam e demonstra ser mais potente que o diazepam em diminuir as convulsões (Ozowa et al., 1994^a; Friedman et al., 1993; Mumford et al., 1995; Crabbe, 1992).

Com base nos dados acima relacionados, é possível sugerir que abecarnil possa ser relativamente seguro e efetivo no tratamento da síndrome de abstinência ao álcool, bem como ser uma alternativa favorável à terapêutica com BDZ. Entretanto, esse mesmo estudo observou a presença de um caso de alucinação severa e outro de delírio tremens, o que sugere a necessidade de mais estudos, com esse medicamento, dando a devida atenção ao aparecimento de efeitos colaterais e à deficiência na supressão da síndrome de abstinência ao álcool (Anton et al., 1997).

1.2.4 Transmissão Dopaminérgica

A dopamina é um importante neurotransmissor do SNC, estando presente em grande proporção no corpo estriado, uma parte do sistema motor extrapiramidal, relacionada à coordenação do movimento, e em algumas partes do sistema límbico. Atualmente, são conhecidos cinco tipos de receptores da dopamina (D₁ - D₅), porém, somente os mecanismos de transdução dos receptores D₁, D₂, e D₅ estão totalmente esclarecidos.

Com base na hipótese de que drogas de abuso aumentam a atividade locomotora, por meio de mecanismos que estão relacionados ao reforço (via da dopamina mesolímbica), vários estudos foram desenvolvidos para investigar os efeitos do etanol sobre a via de recompensa.

Basicamente, o principal sistema envolvido na via de recompensa é o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico _ corpos celulares localizados na área tegumental ventral, com projeções no núcleo *accumbens* (Nacc), no tubérculo

olfatório, no córtex frontal, na amígdala e na área septal. Dentre essas estruturas, as que projetam ao Nacc formam o núcleo central do sistema de recompensa (Moreau, 1996).

Sabe-se, portanto, que, pelo menos em parte, o álcool estimula o sistema de recompensa atuando sobre o sistema nervoso dopaminérgico central e que a dopamina está envolvida na mediação da estimulação locomotora induzida por essa droga. Um perfil importante é que essa atividade locomotora parece estar freqüentemente associada ao bloqueio de receptores D₂ da dopamina, visto que o haloperidol e outros antagonistas D₂ reduzem a hiperatividade induzida com baixas doses de etanol (Koob, 1992a; Samsom e Harris, 1992; Broadbent et al., 1995).

Pelo fato de que o haloperidol possui afinidade pelos receptores s, α₁ e 5-HT₂, além dos receptores D₂/D₃ da dopamina, outros trabalhos têm utilizado drogas mais específicas.

Dessa forma, estudos recentes têm demonstrado que a tiaprida, antagonista seletivo de receptores D₂/D₃ da dopamina, bloqueia a hiperatividade induzida por etanol, sem potenciar seus efeitos sedativos, sugerindo que esses receptores estão envolvidos na mediação do efeito estimulante do etanol e que outros mecanismos, não-dopaminérgicos, podem estar relacionados com a sedação produzida por etanol (Grant, 1994).

Entretanto, com relação aos receptores D₁ da dopamina, o SCH23390 também inibe a hiperatividade induzida por etanol, nas doses que não afetam a locomoção espontânea, sugerindo um efeito específico desse antagonista. Pelo fato desse efeito inibitório ser revertido, com doses maiores de etanol, é confirmada a presença de antagonismo do tipo competitivo nessa interação farmacológica (Cohen et al., 1997).

Com base nos dados acima relacionados, tanto o haloperidol quanto a tiaprida bloqueiam os efeitos estimulantes do etanol, sugerindo que essas drogas possam ter efeitos benéficos em pacientes alcoólatras, por interferirem no efeito reforçador do álcool. Entretanto, a tiaprida pode ser mais bem tolerada pelo fato de ter

uma atividade depressora pequena e não interagir com os efeitos depressivos do etanol.

Por outro lado, tem sido observado, recentemente, um aumento da afinidade de [3H]SCH23390, antagonista seletivo de receptores D₁, aos seus sítios, no corpo estriado, durante a exposição crônica ao etanol e na síndrome de abstinência, sugerindo a mediação da via dopaminérgica estriatal nas respostas à intoxicação por etanol (Martin et al., 1997).

Distribuição dos neurônios dopaminérgicos

Os neurônios dopaminérgicos originam-se de três grupos de células localizadas no cérebro. Estes grupos de células são classificados em A8, A9 e A10, e corresponde às regiões cerebrais chamadas campo retrorubral (A8), substância negra pars compacta (A9), e área tegumentar ventral (ATV) (A10). Provenientes destes grupos celulares, os axônios dos neurônios dopaminérgicos se estendem para regiões do mesencéfalo, formando os três sistemas neuronais: sistema nigroestriatal compreende os neurônios dopaminérgicos que se originam no grupo de células A9 e terminam na região chamada de corpo estriado dorsal. Esta região inclui o núcleo caudado e putamen. A degeneração dopaminérgica no corpo estriado dorsal causa distúrbios motores que ocorrem na doença de Parkinson; sistema mesolímbico origina-se no grupo de células A10 e parte do A9. Estes neurônios terminam na região chamada de corpo estriado ventral, que incluem o núcleo accumbens e o tubérculo olfatório, o septo, amígdala central e o núcleo profundo de formação reticular. O corpo estriado ventral tem um papel importante no aprendizado e motivação. Sistema mesocortical formado pelo terceiro grupo de neurônios dopaminérgicos que se originam no grupo de células A9 e A10 e terminam em várias regiões do córtex cerebral que estão envolvidas com a atenção e memória recente. (Dahlstrom & Fuxe, 1964, Björklund & Lindvall, 1984; Ungerstedt, 1971; Therry et al, 1973).

Dentre as áreas cerebrais afetadas pelos neurônios dopaminérgicos, o núcleo accumbens tem um papel central. Ele interage com os três maiores sistemas cerebrais e recebe informações do sistema cerebral chamado de septo-hipocampal, o qual está envolvido no aprendizado e memória. O núcleo accumbens envia esta informação para outras partes que se estendem a amígdala e o sistema pálido-estriatal para executar resposta motora voluntária, resposta motora visceral e resposta hormonal.

Os neurônios dopaminérgicos atingem não somente o núcleo accumbens, mas também outras áreas que se estendem a amígdala tanto quanto as partes do sistema septo-hipocampal. Conseqüentemente a dopamina atua em locais múltiplos para controlar a integração de informações biológicas que determinam a resposta motivada (Di Chiara et al., 1994).

Ações celulares da dopamina

Para afetar as células alvo, a dopamina interage com os receptores localizados na superfície das células alvos. Os receptores dopaminérgicos estão divididos em duas famílias: a família D₁-símile, a qual inclui os subtipos de receptores D₁ e D₅ e a família D₂-símile, a qual inclui os subtipos de receptores D₂, D₃ e D₄. Quando a dopamina interage com esses receptores, eles ativam certas proteínas dentro da célula, chamadas proteínas G. Estas proteínas podem afetar a atividade dos canais na membrana celular que permitem o fluxo de íons dentro e fora da célula. Alterações na atividade desses canais de íons facilitam ou dificultam a excitabilidade celular. Além disso, a proteína G regula a produção de pequenas moléculas sinalizadoras, denominadas de segundos mensageiros dentro da célula.

A dopamina não afeta diretamente a atividade dos canais de íons e, portanto, é incapaz de excitar ou inibir as células alvos e freqüentemente por isso não é considerada um neurotransmissor, mas é chamada de neuromodulador (Kitai and Surmeier, 1993; Di Chiara et al., 1994).

1.3 Alcoolismo

O alcoolismo pode ser definido como uma síndrome multifatorial, com comprometimento físico, mental e social. Os critérios diagnósticos atuais são baseados na Classificação Internacional de Doenças (CID-10) da Organização Mundial da Saúde (1993), e no Manual de Diagnóstico e Estatística dos Distúrbios Mentais da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (DSM-IV; American Psychiatric Association, 1994). O consumo de bebidas alcoólicas faz parte da história da humanidade há milhares de anos. Nas populações do antigo Oriente Médio do quarto milênio antes de Cristo, as bebidas fermentadas já eram um elemento pelo qual as elites emergentes controlavam a produção de bens (incluindo os recipientes), estabeleciam símbolos de *status* e praticavam o comércio entre populações distantes (Edwards & Gross, 1976; Edwards *et al.*, 1976; Joffe, 1998).

A partir da Idade Média, as bebidas destiladas, que apresentam uma maior concentração de álcool, tiveram sua produção intensificada. Assim, os problemas relacionados com o álcool tornaram-se socialmente relevantes nos últimos séculos ((Valle, 1998; Berridge, 1990).

1.3.1 Prevalência e problemas sociais

Estima-se que mais do que dois terços das pessoas em países ocidentais bebem mais do que apenas ocasionalmente. Nos Estados Unidos, aproximadamente 10% das mulheres e 20% dos homens preenchem critérios diagnósticos para abuso do álcool, e 3-5% das mulheres e 10% dos homens preenchem critérios para dependência ao longo da vida. Neste país, o risco de alcoolismo é influenciado por fatores sociais como o sexo, o nível socioeconômico, a profissão e a religião. Assim como nos Estados Unidos, também na Suécia o risco é maior entre homens de nível

socioeconômico mais baixo (Kaplan *et al.*, 1994; Schuckit, 1991; Hemmingsson *et al.*, 1997).

No Brasil, um estudo de morbidade psiquiátrica em áreas urbanas indicou que a prevalência combinada de abuso e dependência de álcool ao longo da vida seria de aproximadamente 8% no conjunto das amostras estudadas, representativas de São Paulo, Brasília e Porto Alegre. A avaliação em cada sexo revelou uma prevalência de 15-16% entre os homens e de 0-2,5% entre as mulheres (Almeida-Filho *et al.*, 1997).

O programa nacional de controle dos problemas relacionados com o consumo do álcool estimou que no Brasil o alcoolismo seria: (1) a terceira principal causa de absenteísmo ao trabalho; (2) responsável pela ocupação de 9% a 32% dos leitos hospitalares e (3) relacionado com até 75% dos acidentes de trânsito (Ministério da Saúde, 1987).

O uso do álcool pelas mulheres grávidas também merece atenção especial na saúde pública, devido à grande prevalência e ao dano por ele provocado. A incidência da forma completa da síndrome do álcool fetal, que envolve alterações no crânio, face e outras malformações, além de retardo mental e déficit de crescimento, é estimada em aproximadamente 2,8-4,6 a cada 1000 nascimentos nos Estados Unidos. Esta prevalência sobe para 9,1 a cada 1000 se forem adicionados os casos de crianças com transtornos do desenvolvimento neurológico relacionado com o álcool, que não caracterizam a síndrome do álcool fetal. Este conjunto de problemas torna as conseqüências do uso de álcool pela mulher grávida, uma das mais importantes causas de retardo mental. Por este motivo, e pelo desconhecimento de uma dose limite segura, é recomendada a abstinência total de álcool durante a gravidez. Existe uma grande carência de estudos sobre a epidemiologia dos efeitos do álcool sobre o feto no Brasil, mas acredita-se que ele represente um grande problema de saúde pública (Sampson *et al.*, 1997; Robinson & Linden, 1993).

1.3.2 Alcoolismo como problema multifatorial

Genes ou ambiente – estes dois fatores sempre polarizaram as discussões sobre a causa do alcoolismo, mesmo antes do surgimento da genética e da psiquiatria modernas. No início do século 20, o movimento eugênico incluía o alcoolismo em um grupo de "degenerescências mentais" hereditárias. Este movimento era repleto de preconceitos, e os seus participantes propunham até a esterilização dos doentes mentais, para que não transmitissem os seus males para as gerações futuras. Paralelamente, surgiam a psicologia e a psicanálise, propondo, em contraposição, uma forte influência ambiental. Atualmente, a dependência química, assim como a maioria dos outros problemas mentais são incluídos na categoria das doenças multifatoriais. Nestas afecções, os fatores determinantes interagem entre si de maneira tão complexa que se torna difícil determinar um agente etiológico presente em todos os indivíduos afetados (Pessotti, 1984; Vogel & Motulsky, 1997).

A maioria dos estudos com gêmeos observou uma concordância maior entre os monozigóticos em relação aos dizigóticos, sugerindo um efeito genético, principalmente no caso do alcoolismo masculino de início precoce. Nos últimos anos, vários estudos de herdabilidade foram realizados utilizando uma grande amostra de gêmeos com base na população geral do estado norte-americano de Virgínia. A herdabilidade foi estimada em aproximadamente 50-60%, tanto para homens quanto para mulheres. Os autores também puderam inferir que embora a magnitude da influência genética seja igualmente elevada nos dois sexos, os genes envolvidos seriam apenas parcialmente compartilhados entre homens e mulheres (Cook & Gurling, 1991; Pickens *et al.*, 1991; McGue *et al.*, 1992; Prescott *et al.*, 1999; Prescott & Kendler, 1999; Kendler *et al.*, 1992, 1994).

A herdabilidade do alcoolismo é compartilhada em parte com a do tabagismo, o que explica a forte associação entre os dois problemas. Já o abuso de

drogas não parece ser preditivo do alcoolismo em parentes (True *et al.*, 1999; Goldman & Bergen, 1998).

A existência de uma predisposição genética também foi proposta em diversos estudos com pessoas adotadas: filhos de pais biológicos alcoolistas, quando criados por pais adotivos não-alcoolistas, apresentam um risco maior de desenvolver o alcoolismo, quando comparados aos filhos de não-alcoolistas sujeitos ao mesmo tipo de adoção (Goodwin *et al.*, 1973; Cadoret & Gath, 1978; Bohman, 1978).

Outro indício de existência de um componente genético vem de uma intensidade diminuída de reação ao etanol nos filhos de alcoolistas, quando comparados aos controles. Esta diferença fisiológica pode estar relacionada com uma maior suscetibilidade ao alcoolismo, devido a uma exposição mais freqüente. Tais alterações menos intensas estariam relacionadas com sensações subjetivas de intoxicação, e performance motora; níveis séricos de prolactina, níveis de cortisol e de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) plasmáticos; e alterações no eletroencefalograma. Além disso, Begleiter *et al.* (1984) verificaram que, independentemente de receberem ou não uma dose de etanol antes do exame, tanto os próprios alcoolistas como os filhos de alcoolistas apresentavam um déficit no potencial cerebral P 3, em relação aos controles (Schuckit, 1991; Schuckit, 1988; Schuckit *et al.*, 1987^a; Schuckit *et al.*, 1987b, 1988b; Schuckit *et al.*, 1988a; Ehlers & Schuckit, 1991).

1.3.3 Bases moleculares do alcoolismo (Variações no metabolismo do álcool)

Variações genéticas nas enzimas responsáveis pelo metabolismo do álcool (aldeído desidrogenase e álcool desidrogenase) determinam diferenças interpopulacionais na prevalência do alcoolismo, e constituem os únicos genes com um papel confirmado no alcoolismo. Um modelo bem estudado se refere a uma variação genética que confere uma menor atividade do aldeído desidrogenase

mitocondrial, freqüente em populações orientais, responsável por um menor risco de alcoolismo entre os portadores. A enzima aldeído desidrogenase converte o acetaldeído, o primeiro produto do metabolismo do álcool, em ácido acético. A deficiência nesta enzima provoca um aumento no nível sérico de acetaldeído após o consumo de álcool. Estes indivíduos tendem, então, a beber menos, já que esse aumento do acetaldeído, que é tóxico, provoca uma reação desagradável, que inclui vasodilatação periférica, náusea, cefaléia e taquicardia. No entanto, esta deficiência não é prevalente em populações ocidentais, e, portanto não deve influenciar o risco de alcoolismo nestes países (Agarwal & Goedde, 1992; Suzuki *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1995).

1.3.4 Genes candidatos no sistema nervoso

Os estudos com gêmeos, pessoas adotadas e variações fisiológicas anteriormente descritas, embora demonstrem a existência de um componente genético, não permitem a identificação do mecanismo patológico e dos genes predisponentes à dependência. Além disso, os estudos familiares de ligação, que permitiram a identificação de inúmeros genes causadores de doenças mendelianas, não geraram resultados replicáveis por grupos independentes para loci ligados ao alcoolismo. Um dos motivos levantados é a grande heterogeneidade e número de genes envolvidos neste problema. Por este motivo, os estudos caso-controle baseados no modelo de genes candidatos são hoje considerados mais promissores. Vale destacar que no caso de problemas multifatoriais, presume-se que existam muitos genes participantes, a maioria deles com um pequeno efeito, fazendo que seja muito difícil identificá-los em estudos de ligação. É preciso, então, focalizar o interesse em certos genes que apresentam maiores chances de aumentar a suscetibilidade (Comings, 1998; Vogel & Motulsky, 1997).

Entre os sistemas neurofisiológicos possivelmente envolvidos na fisiopatologia da dependência estão aqueles relacionados com os efeitos depressores, de prazer e de recompensa provocados pelo álcool no sistema nervoso central. O efeito depressor é mediado principalmente pela ação sobre os receptores de GABA, sendo este sistema também responsável por grande parte do mecanismo de neuroadaptação que gera a síndrome de abstinência. Já as sensações de prazer e recompensa estão intimamente relacionadas com a ativação do sistema dopaminérgico (Grant *et al.*, 1990; McKinney *et al.*, 2000).

A partir do relato de Blum *et al.* (1990) de uma associação significativa entre o alelo TaqI A1 gene do receptor D₂ da dopamina (DRD₂) e o alcoolismo, uma série de estudos independentes do tipo caso-controle e familiares sugeriram que o alelo TaqI A₁ localizado na região 5' à jusante do gene do receptor D₂ da dopamina poderia ser um marcador para a predisposição ao alcoolismo. No entanto outro conjunto significativo de investigações não detectou o mesmo efeito (Noble, 1998; Noble *et al.*, 2000; Bau *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 1999; Bolos *et al.*, 1990, Edenberg *et al.*, 1998).

Estudando o efeito fisiológico do alelo TaqI A₁ do receptor D₂, Noble *et al.* (1991) observaram em exames de cérebros *post-mortem* um menor número de sítios de ligação dopaminérgicos nos portadores do alelo A1, resultado corroborado *in vivo*. Outro resultado na mesma direção foi obtido em um estudo de tratamento de alcoolistas, utilizando a bromocriptina, agonista do receptor D₂. Os portadores do alelo A1 apresentaram uma diminuição mais acentuada na fissura e na ansiedade (Pohjalainen *et al.*, 1998; Lawford *et al.*, 1995).

Como o polimorfismo está fora da região codificadora, a melhor explicação para uma menor expressão do receptor nos portadores do alelo TaqI A₁ seria o desequilíbrio de ligação com alguma variante funcional nas regiões regulatória ou codificadora do gene. Tentando resolver esta controvérsia, estudos com haplótipos incluíram variações funcionais do gene na análise, mas os resultados ainda não

puderam fornecer uma explicação fisiológica para a associação previamente descrita para o alelo TaqI A₁ (Goldman *et al.*, 1997; Gelernter *et al.*, 1997; Noble *et al.*, 2000).

O alelo de 7 repetições do VNTR no terceiro exon do gene do receptor D4 da dopamina (DRD4) tem sido associado em estudos caso-controle e familiares com um conjunto de comportamentos considerados capazes de predispor ao alcoolismo. Essas associações incluem escores mais elevados na característica de personalidade, procura de novidades, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, tabagismo e abuso de drogas. O alelo de 10 repetições de um VNTR na região 3' não traduzida do gene do transportador da dopamina (DAT1) também foi associado com o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (Strobel *et al.*, 1999; Barr *et al.*, 2000; Shields *et al.*, 1998; Kotler *et al.*, 1997; Franke *et al.*, 2000; Waldman *et al.*, 1998, Daly *et al.*, 1999).

No Brasil, foram realizados estudos de associação envolvendo o RFLP TaqI A do DRD₂, VNTR do exon 3 do DRD₄ () e VNTR da região 3' do DAT₁. Os resultados sugeriram uma associação positiva do DRD₂ com o alcoolismo, e também efeitos mais complexos para o DRD₂, DRD₄ e DAT₁. Partindo do fato de que nos problemas multifatoriais o papel de cada gene envolvido depende da presença de outros fatores, foram exploradas possíveis interações envolvendo genótipos candidatos e temperamento sobre o curso do alcoolismo. Verificou-se uma interação significativa entre o alelo TaqI A₁ do DRD₂ com o estresse e a prevenção de dano em medidas de gravidade. Além disso, uma análise de regressão demonstrou interações entre os genótipos contendo o alelo de sete repetições do DRD₄ e homocigotos 10/10 para o DAT₁ com procura de novidades no nível de consumo de álcool. Se replicados tais achados podem indicar para estes genes um efeito modificador do curso do alcoolismo, agravando a dependência ou aumentando o consumo em indivíduos com determinadas características de comportamento (Bau *et al.*, 1999; Roman *et al.*, 1999; Bau *et al.*, 2000; Bau *et al.*, 2001a)

Estudos caso-controle demonstraram uma associação entre um polimorfismo no gene do transportador da serotonina (5-HT) e o alcoolismo. Schuckit

et al. (1999) constataram uma associação entre esse polimorfismo e um menor nível de resposta ao álcool, variável considerada uma possível mediadora da vulnerabilidade ao problema. Comparando homens e mulheres com alcoolismo e controles, Hwu & Chen (2000) detectaram uma associação entre uma variação no gene do receptor 2 A da serotonina (5HT2A) e o abuso de álcool em homens. Nielsen *et al.* (1998) obtiveram resultados positivos para associação e ligação entre o alcoolismo e comportamento suicida e um polimorfismo no intron 7 do gene da enzima triptofano hidroxilase, responsável pela síntese de serotonina (Sander *et al.*, 1997; Turker *et al.*, 1998; Schuckit, 1991).

O repertório de genes candidatos para o alcoolismo não se restringe apenas aos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico. Genes em outros sistemas apresentaram resultados preliminares positivos para a predisposição ao alcoolismo. Estes incluem o Promotor do gene da Colecistoquinina, a Monoamino Oxidase e o receptor GABA_A6 (Harada *et al.*, 1998; Gade *et al.*, 1998; Schuckit *et al.*, 1999).

1.3.5 Heterogeneidade no alcoolismo

Tipos clínicos do alcoolismo

Embora praticamente todas as estratégias terapêuticas para o alcoolismo apresentem resultados positivos, incluindo psicoterapias e grupos de Alcoólicos Anônimos, muitos pacientes não apresentam melhora senão após várias tentativas fracassadas de tratamento ao longo dos anos. A explicação para este aparente paradoxo está justamente na variabilidade genética e ambiental que compõe a heterogeneidade clínica do problema. Um tipo de tratamento válido para um paciente pode ser inútil para outro. Portanto, a busca por estratégias mais eficazes pode se valer da aplicação do conhecimento sobre esta variabilidade.

Uma série de tentativas tem sido desenvolvida para estabelecer tipos de alcoolismo, tendo como um de seus principais objetivos gerar condições para o desenvolvimento de pesquisas sobre abordagens terapêuticas específicas para cada grupo de pacientes. Embora cada classificação tenha algumas particularidades, dois tipos básicos costumam estar presentes, representados, respectivamente, pelos tipos delta e gama de Jellinek (1960), B e C de Morey *et al.* (1984), de desenvolvimento progressivo e anti-social de Zucker *et al.*, (1996), 1 e 2 de Cloninger (1987) e A e B de Babor *et al.* (1992).

As diferenças fundamentais entre os dois tipos estão relacionadas com a idade de início dos problemas – um grupo apresentaria início precoce, um curso mais grave e tendência para associação com outros problemas psiquiátricos, incluindo a personalidade anti-social, enquanto o outro grupo teria um início mais tardio e menor gravidade.

No entanto, o mais importante estudo voltado para a avaliação da resposta ao tratamento não foi capaz de confirmar a utilidade da classificação em dois grupos. Uma das possíveis explicações para este insucesso poderia ser a persistência de heterogeneidade residual significativa dentro dos grupos. Reforça esta hipótese o fato de que alguns estudos têm sugerido a existência de três tipos de alcoolistas. Dois deles foram realizados no Brasil e outro foi desenvolvido na Polônia. Estes estudos sugerem a existência de dois grupos de início precoce, os quais diferem em relação aos problemas psiquiátricos associados, características de temperamento e resposta ao estresse (Project Match Research Group, 1997; Bau & Salzano, 1995; Bau *et al.*, 2001b ; Hauser & Rybakowski, 1997).

Até o momento, nenhum dos estudos clínicos sobre a heterogeneidade foi capaz de apresentar uma estratégia simples e confiável para a identificação de subgrupos válidos de alcoolistas. A própria comparação entre os trabalhos é difícil, tendo em vista as variações nos instrumentos utilizados, na gravidade do problema nas amostras e em outras diferenças epidemiológicas.

1.3.6 Variabilidade genética e resposta ao tratamento

Nos últimos anos, vários polimorfismos genéticos têm sido descritos em genes candidatos nos sistemas neuronais alvo das drogas utilizadas no tratamento psiquiátrico. O estudo do efeito de polimorfismos genéticos na resposta ao tratamento oferece uma perspectiva promissora para uma medicina mais individualizada, que permita maior eficácia com menos efeitos colaterais. Quando comparadas às avaliações clínicas e do comportamento descritas anteriormente, as informações moleculares apresentam as vantagens de ser estáveis ao longo da vida e permitirem uma avaliação mais objetiva.

Embora estes estudos ainda estejam em uma fase inicial, pelo menos no caso da depressão maior, patologia frequentemente associada ao alcoolismo, alguns resultados já são promissores. Um polimorfismo funcional do tipo inserção/deleção localizado no gene da proteína transportadora da serotonina (5-HTT), associado à depressão e comportamento suicida, demonstrou também um efeito importante sobre a resposta ao tratamento. Os indivíduos homocigotos para o alelo longo e os heterocigotos apresentaram uma melhor resposta ao antidepressivo fluvoxamina do que os heterocigotos para o alelo curto. Como o polimorfismo tem efeito funcional e os resultados correspondem à hipótese prévia, os autores sugeriram que este genótipo pode ser um instrumento útil na individualização do tratamento para a depressão (Du *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Bellivier *et al.*, 2000; Smeraldi *et al.*, 1998).

Destaca-se também um trabalho envolvendo o receptor de opióides e o consumo de drogas opióides e cocaína. Embora ainda não exista um resultado positivo de associação com o alcoolismo, esse gene pode ser considerado um forte candidato para uma resposta diferencial ao Naltrexone no tratamento do problema, visto ser este um antagonista de opióides (Hoehe *et al.*, 2000).

O alcoolismo é um problema de grande prevalência populacional e elevado custo social. Embora o componente genético na vulnerabilidade seja significativo, a

grande complexidade que o caracteriza tem dificultado a identificação de genes específicos. No entanto, a recente descrição de milhões de polimorfismos genéticos no genoma humano está abrindo uma perspectiva muito promissora para os estudos genéticos de associação com o alcoolismo. Além disso, muitos estudos estão sendo iniciados para avaliar o papel de variações genéticas na resposta ao tratamento farmacológico.

Pode-se imaginar que o progresso nos anos posteriores à publicação da seqüência do genoma humano será muito mais rápido do que nas décadas precedentes. Tendo em conta a complexidade das interações entre fatores genéticos e do ambiente que caracteriza o alcoolismo, é desejável a realização de estudos sobre a etiologia e resposta ao tratamento em populações com características sociais, econômicas, culturais e genéticas distintas.

1.3.7 Particularidades do alcoolismo feminino

A prevalência do alcoolismo entre as mulheres ainda é significativamente menor que a encontrada entre os homens. Ainda assim, o consumo abusivo e/ou a dependência do álcool traz, reconhecidamente, inúmeras repercussões negativas sobre a saúde física, psíquica e "social" da mulher (Blume, 1994; Grant, 1997).

Um estudo de coorte constatou um maior risco relativo para suicídio e acidentes fatais entre mulheres que consumiam acima de três doses diárias de bebidas alcoólicas (Ross et al., 1990).

Dados recentes confirmam que, mesmo que o consumo de álcool seja realmente menor entre as mulheres, seu impacto pode ser maior que entre os homens, avaliado por meio do relato de problemas associados ao álcool (Bongers et al., 1997).

A identificação do alcoolismo feminino em atendimentos primários de saúde parece ser deficiente e pouco valorizada. Apesar disso, observa-se um crescente aumento do abuso de álcool e de outras drogas ilícitas, como a cannabis e a cocaína, além do já conhecido abuso de anfetaminas. O consumo abusivo de álcool e de outras

substâncias já é maior em algumas populações específicas, como entre os adolescentes avaliados em estudos nos EUA. Nessa população, a adolescência representava o período de maior risco de consumo de drogas entre as mulheres, consumo este já significativamente maior que o dos homens para cocaína (Chang et al., 1997; Kandel et al., 1997; Yarnold, 1997).

Como podemos observar, estes números já atingiram valores preocupantes, colhidos em alguns países com dados epidemiológicos mais precisos. Griffin et al. (1986) já apontavam nos anos 80 para o fato de dois terços da população feminina do Estado de New York (EUA), até 25 anos de idade, já ter feito uso de cannabis. Além disso, boa parte (20%) dessa população ainda se utilizava desta substância com uma frequência importante.

A preocupação com o impacto do abuso e dependência de álcool entre as mulheres, com suas particularidades, também já foi alvo de pesquisas em nosso meio; dentre as principais observações realizadas, destaca-se o fato de que o início e o aumento do consumo de álcool, entre as mulheres estudadas, era mais tardio; elas também relatavam mais tentativas de suicídio, além de menor utilização concomitante de outras drogas ilícitas comparativamente aos homens (Hochgraf et al., 1995).

O aumento tardio no consumo de álcool também foi encontrado em trabalho de Wojnar et al. (1997), avaliando dados retrospectivos de 1.179 pacientes poloneses (13,8% mulheres). Este mesmo estudo apontou para uma maior prevalência, entre as mulheres, de transtornos de personalidade co-existent, transtornos depressivos, transtornos de ansiedade, além de abuso de benzodiazepínicos e barbitúricos. O referido estudo está de acordo com outros anteriores, exceto no que se relaciona à prevalência de transtornos de personalidade, encontrados, até então, de forma mais frequente entre os homens. Dados obtidos de pacientes internadas por alcoolismo apontaram para o abuso frequente de mais de uma substância psicoativa entre as mulheres, principalmente analgésicos e tranqüilizantes (Hesselbrock et al., 1985; Ross et al., 1988; Wilcox e Yates, 1993, Kubicka et al., 1993).

Aspectos socioculturais também influenciariam de forma particular o padrão de consumo de álcool entre as mulheres. Mulheres acima de 40 anos estariam

expostas a um maior aumento do consumo alcoólico, associado a uma falta de estrutura familiar, o que não ocorreria entre os homens (Neve et al., 1996).

1.3.8 Alcoolismo e ciclo menstrual

As relações entre o alcoolismo e o ciclo menstrual podem ser observadas basicamente sob dois aspectos:

- As interações entre as diversas fases do ciclo e uma possível modificação nos padrões de consumo de álcool.
- As repercussões clínicas do uso/abuso ou dependência do álcool sobre o ciclo menstrual.

Impacto das fases do ciclo menstrual sobre o consumo de álcool

Diversos trabalhos têm abordado uma eventual exacerbação do consumo alcoólico em determinadas fases do ciclo menstrual, particularmente na fase lútea tardia, ou pré-menstrual, atribuindo ao álcool uma ação ansiolítica durante esta fase, o que tornaria seu consumo uma "automedicação" durante as fases disfóricas pré-menstruais (Tate e Charette, 1991; McLeod et al., 1994).

A hipótese do "alcoolismo pré-menstrual", entretanto, tem sido contestada por outros estudos, em que um aumento considerável do consumo de tabaco, e não o de álcool, surgiu como fator ligado ao período pré-menstrual (Lex et al., 1989; Tate e Charette, 1991).

Alcoolismo e ciclo menstrual: repercussões sobre seu funcionamento

Se, por um lado, a influência das fases do ciclo menstrual sobre os padrões de consumo alcoólico ainda é um tema controverso, a influência do consumo de álcool sobre o funcionamento hormonal feminino já encontra referências consistentes (Mello et al., 1989; Pettersson et al., 1990; Eriksson et al., 1996).

Estudos animais revelaram que o consumo de álcool levaria a uma resposta pituitária deficiente, com uma menor liberação de hormônio luteinizante (LH) após o

estímulo de E2 (b-estradiol). Esse fato poderia estar associado a uma maior frequência de ciclos anovulatórios em alcoolistas crônicas (Mello et al., 1992).

De fato, o consumo abusivo ou a dependência alcoólica parecem estar associados a diversas alterações do ciclo reprodutivo, desde a ocorrência de amenorréia, disfunções ovarianas com ciclos anovulatórios, menopausa prematura, além de relatos de maior risco para infertilidade, abortamento espontâneo, intervenções cirúrgicas ginecológicas, além de trazer prejuízos para o desenvolvimento fetal (Roman, 1988; Mello et al., 1989; Becker et al., 1989; Teoh et al., 1992; Carrara et al., 1993).

Um estudo mais recente de Valimaki et al. (1995), utilizando controles hormonais e ultra-sonográficos, não revelou alterações significativas na função ovariana de mulheres alcoolistas. Confirmou-se, entretanto, níveis significativamente maiores de testosterona (65%) durante a fase lútea dessas mulheres, quando comparadas com controles, refletindo um desequilíbrio hormonal.

Algumas particularidades dos efeitos desagradáveis do álcool em mulheres estariam associadas a uma maior elevação nestas dos níveis séricos de acetaldeído, metabólito primário do etanol, durante as fases de maior liberação estrogênica. Assim, elevados níveis de estrógenos poderiam estar associados a um maior desconforto com o consumo alcoólico (Eriksson et al., 1996).

1.3.9 Consumo crônico de álcool: impacto sobre os aspectos endócrinos

Sabe-se que o consumo abusivo de álcool estaria associado, freqüentemente, à ocorrência de hiperprolactinemia (níveis séricos duas a quatro vezes maiores que os normais). As concentrações séricas de estrona (E1) e estradiol (E2), durante a fase folicular dos ciclos de mulheres alcoolistas duas a, estariam reduzidas, enquanto haveria um aumento de duas a três vezes dos níveis de androstenediona (Valimaki et al., 1990; Teoh et al., 1992).

Um estudo antropométrico, hormonal e hepático de 18 mulheres com história de abuso crônico de álcool revelaram prejuízo do funcionamento hepático, por

meio do aumento discreto das transaminases, sem que houvesse outros sinais clínicos ou laboratoriais de prejuízo hepático (Pettersson et al.,1990).

As mesmas pacientes apresentavam, porém, aumento da "razão cintura-quadril" (em língua inglesa, waist to hip ratio). Essa medida simples tem demonstrado ser um fator preditivo positivo de doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais e diabetes mellitus em estudos populacionais. Independentemente da presença de obesidade, a razão cintura-quadril reflete a distribuição de gordura abdominal e está relacionada à presença de massa gordurosa intra-abdominal. Diversas anormalidades endócrinas _ níveis séricos reduzidos de estrógenos, progesterona e de globulinas ligantes dos hormônios sexuais, além de níveis aumentados de testosterona livre _ estariam, então, associadas às observações clínicas apresentadas, justificando a distribuição de gordura abdominal nessas pacientes, indicativa de hiperandrogenismo (Larsson et al.,1984; Ohlsson et al.,1985).

As mesmas pacientes apresentavam, ainda, ciclos irregulares ou amenorréia, enfatizando as repercussões do alcoolismo sobre a regulação do ciclo menstrual.

Outra consequência clínica do consumo crônico de álcool é a hipersecreção de corticosteróides adrenais, resultando, em casos graves, no surgimento de quadros de "pseudo-Cushing", com prevalência de 6% a 40% entre os alcoolistas em geral. Os tecidos adiposos intra-abdominais seriam particularmente sensíveis a esta hipersecreção, dado o grande número de receptores glicocorticóides (Smals et al., 1976; Groote-Veldman e Meinders, 1996; Rebufflé-Scrive et al., 1985).

De um modo geral, a influência do consumo de álcool por homens ou mulheres sobre o eixo hipotálamo _ hipófise _ adrenal poderia ser dividida em: 1) Ação direta sobre as adrenais, pelo efeito estimulante do etanol ou de seu metabólito, acetaldeído. 2) Ação sobre a pituitária, levando a um aumento dos níveis plasmáticos de ACTH. 3) Alterações no metabolismo do cortisol e/ou na produção das proteínas ligantes de cortisol, acarretando maiores níveis séricos de cortisol livre, particularmente em alcoolistas com função hepática bastante comprometida. 4) Diminuição das proteínas ligantes de cortisol. 5) Influências genéticas em sua

expressão, associadas à presença de histórico familiar para alcoolismo (Groote-Veldman e Meinders, 1996).

1.3.10 Alcoolismo e câncer

Smith-Warner et al. (1998), analisando seis estudos de coorte conduzidos em quatro países distintos, investigaram a associação entre o risco do câncer de mama do tipo invasivo e o consumo de álcool. Mais de 300 mil mulheres avaliadas por até 11 anos foram incluídas no estudo, com cerca de 4.300 diagnosticadas com câncer mamário. A quantidade, bem como o tipo de bebida alcoólica consumida pela grande maioria das pacientes, não interferiu no aumento do risco relativo para câncer de mama. Entre aquelas alcoolistas que bebiam em maior quantidade e frequência, entretanto, o aumento do consumo esteve linearmente relacionado com o aumento do risco para câncer, assim como a redução do consumo alcoólico interferiu positivamente na diminuição do mesmo risco.

1.3.11 Alcoolismo e osteoporose

Outro aspecto importante do consumo crônico de álcool pelas mulheres é a sua relação com a osteoporose. Considera-se que a osteoporose resulta do desequilíbrio de um complexo sistema, mantido por vários fatores nutricionais, hormonais e metabólicos. Pacientes alcoolistas apresentam frequentemente hipocalcemia, hipomagnesemia e hipoparatiroidismo, acarretando disfunções que levam à osteoporose (Halbreich e Palter, 1996; Laitinen et al., 1991).

O uso concomitante de tabaco e álcool, a existência prévia ou concomitante de outros distúrbios psiquiátricos (como a anorexia nervosa e a esquizofrenia), certas características do padrão reprodutivo e de determinados "estilos de vida" das alcoolistas, para alguns autores, seriam mais importantes na relação álcool/osteoporose, questionando o papel do consumo alcoólico per se (Laitinen et al., 1993; Clark e Sowers, 1996).

De fato, alguns trabalhos revelaram que o hipogonadismo e a amenorréia induzidos pelo uso de alguns medicamentos (por ex., neurolépticos) teriam sua participação na gênese da osteoporose em mulheres alcoolistas. Isto porque a ação desses medicamentos, levando a um bloqueio da ação dopaminérgica central, resultando em hiperprolactinemia, e incrementando o desbalanço ósseo (Halbreich e Palter, 1996).

Além disso, patologias psiquiátricas citadas (transtornos alimentares, esquizofrenia) estariam associadas à presença de polidipsia, desbalanço de fluidos e eletrólitos (particularmente de cálcio), maior consumo de tabaco, deficiências vitamínicas, menor exposição ao sol e menor frequência de atividades físicas, colaborando para o agravamento do quadro (Halbreich e Palter, 1996).

1.3.12 Alcoolismo, menopausa e terapêutica de reposição hormonal (TRH): possíveis interações.

Sabe-se que os estrógenos desempenham um papel fundamental na manutenção do equilíbrio ósseo. A presença de receptores específicos em osteoblastos, induzindo o aumento da produção de proteínas de colágeno tipo I, além da inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos, seriam alguns dos mecanismos envolvidos (Steele et al., 1995).

A redução dos níveis de estrógenos por ocasião da menopausa e a introdução de terapêuticas de reposição hormonal impõem cuidados especiais entre as alcoolistas, uma vez que o consumo alcoólico influencia diretamente o delicado equilíbrio hormonal dessas pacientes.

Ginsburg et al. (1996) estudaram 12 mulheres em pós-menopausa, recebendo 1mg/dia de estradiol, via oral, além de 12 mulheres também em pós-menopausa, sem reposição estrogênica. Estas pacientes foram submetidas a um estudo randomizado, duplo-cego, do tipo cruzado, com ingestão de álcool (0,7 gramas/kg) ou placebo (isocalórico).

A ingestão de etanol provocou um aumento de até três vezes nos níveis de estradiol circulantes, atingindo valores entre 297 e 973 pmol/l (valores normais de 81 a 265 pg/ml) em 50 minutos, durante a fase ascendente de pico dos níveis séricos de etanol, permanecendo acima dos níveis basais por até 5 horas. Assim, os níveis séricos de estradiol chegaram a 300% acima do esperado para a terapêutica de reposição hormonal, sob a influência do uso concomitante de etanol.

Os níveis séricos de etanol, entretanto, não foram abalados pela utilização ou não de estrógenos.

Felson et al. (1995) já haviam demonstrado que o consumo regular de, pelo menos, 206,99 ml de álcool por semana seria capaz de gerar maior densidade óssea (aumento médio de 7,7%) em mulheres idosas, aventando a possibilidade de sua ação sobre os níveis circulantes de estradiol endógeno.

Um estudo com 244 mulheres em pós-menopausa revelou que o consumo moderado de bebidas alcoólicas altera os níveis de estrógenos, de testosterona, além da resposta hipofisária aos níveis estrogênicos. O mesmo estudo destacou a presença de cirrose alcoólica como condição clínica grave nas pacientes com as alterações hormonais descritas (Gavaler, 1995).

Dada a complexidade das interações álcool/estrógenos, não há um consenso sobre a indicação da terapêutica de reposição estrogênica para mulheres alcoolistas, dependendo esta, inclusive, de uma cuidadosa avaliação clínica da paciente, particularmente de um possível comprometimento de sua função hepática. Há de se considerar, portanto, todos os riscos/benefícios que esta interação pode gerar para cada paciente.

1.4 Síndrome do álcool fetal

A síndrome do álcool fetal representa um conjunto de anormalidades físicas, comportamentais e cognitivas observadas em indivíduos expostos ao álcool *in utero*⁴². Foi citada como a causa mais comum de RM nos países desenvolvidos, com estimativas de que até 8% dos casos de RM seriam afetados⁴¹. As características clínicas da síndrome incluem uma fácies típica, com lábio superior fino e filtro labial plano e alongado (**Figura 1**), fissuras palpebrais curtas, ptose, nariz arrebitado e face média achatada⁴². As manifestações adicionais são fendas labiais ou palatina, atraso do crescimento pré e pós-natal, microcefalia, agenesia do corpo caloso, cardiopatia congênita e anormalidades do comportamento. A exposição no primeiro trimestre de gravidez afeta a organogênese e o desenvolvimento craniofacial, enquanto o desenvolvimento do sistema nervoso central é influenciado durante toda a gravidez, devido à maturação continuada dos neurônios. A fisiopatologia da síndrome é mal compreendida, mas parece envolver a formação de radicais livres com resultante lesão celular nos tecidos em formação⁴².

1: Exemplo de criança de 8 anos de idade com Síndrome Álcool Fetal



É importante frisar que a síndrome do álcool fetal é uma das principais causas preveníveis de RM. Assim, as mulheres que planejam engravidar e as gestantes devem abster-se totalmente do consumo de bebidas alcoólicas. Além disso, as evidências sugerem que um diagnóstico e intervenção precoces podem reduzir a ocorrência de deficiências secundárias⁴³.

1.4.1 Causas, incidência e fatores de risco:

O abuso ou consumo de álcool pela gestante a submete ao mesmo índice de risco que o álcool tem na população em geral. No entanto, representa riscos graves e únicos ao feto e está associado à síndrome alcoólica fetal. A etapa da gestação na qual há o consumo de álcool também é importante. O consumo de álcool durante o primeiro trimestre é mais perigoso do que durante o segundo trimestre que é, por sua vez, mais perigoso do que durante o terceiro. O álcool ingerido por uma gestante atravessa facilmente a barreira placentária até chegar ao feto. Por isso, o consumo de álcool pode adversamente afetar o desenvolvimento do bebê.

A incidência da síndrome alcoólica fetal varia entre 1 em cada 1.500 e 1 em cada 600 nascimentos de bebês vivos. Esta ampla variação está relacionada às diferenças nas práticas de consumo. Uma gestante que bebe qualquer quantidade de álcool está correndo risco, uma vez que um nível "seguro" de consumo de álcool durante a gestação não foi estabelecido. No entanto, quanto maiores as quantidades, maiores parecem ser os riscos. Defeitos múltiplos ao nascimento associados à síndrome alcoólica fetal "clássica" estão associados com mais frequência ao consumo excessivo de álcool ou ao alcoolismo.

A síndrome alcoólica fetal apresenta as seguintes anormalidades:

- atraso no crescimento intra-uterino: deficiências de crescimento do feto e do recém-nascido em todos os parâmetros: perímetro da cabeça, peso, altura)

- atraso no desenvolvimento acompanhado de redução da função mental (de moderada a grave)

- anormalidades faciais incluindo cabeça pequena (microcefalia); maxilar superior pequeno; nariz pequeno e curvado para cima; sulco labial liso (ranhura no lábio superior); lábio superior liso e fino; olhos com aparência incomum com pregas epicânticas proeminentes

- defeitos cardíacos como o defeito do septo ventricular (VSD) ou o defeito do septo atrial (DAS).

- anormalidades dos membros nas articulações, mãos, pés, dedos das mãos e dos pés.

O consumo de álcool pelas gestantes apresenta grandes chances de lesar o feto, levando a alterações físicas, cognitivas e comportamentais permanentes e irreversíveis (Grinfeld H, Segre CAM, Chadi G, Goldenberg e 1-2. Cook JD). Pode se manifestar por um quadro completo, denominado Síndrome Alcoólica Fetal (SAF), ou incompleto, conhecido como Efeito Alcoólico Fetal (EAF) (Grinfeld H, Segre CAM, Chadi G, Goldenberg 1).

Não existe nenhum critério para o diagnóstico pré e pós-natal da SAF/EAF. (Cook JD 2). No recém-nascido (RN) depende da suspeita e/ou da confirmação da exposição ao álcool na vida intra-uterina, da restrição do crescimento e das características neonatais. As malformações congênitas e as manifestações neurológicas não são específicas, sendo os sinais faciais os mais favoráveis para o diagnóstico (Thackray H, Tiff C 3). Estes manifestam-se por fissura palpebral pequena, ptose, hemiface achatada, orifícios nasais orientados mais anteriormente (narinas antevertidas), filtro do lábio superior liso e fino (**Figura 2**).

Figura 2: Recém-nascido com sintomas característicos da SAF



A microcefalia, a hipotonia, a irritabilidade e a dificuldade de vínculo são outros sinais e sintomas da SAF no RN (Thackray H, Tiff C 3).

Embora desconhecida,, dados mostram que a prevalência da SAF no Brasil está em torno de 1/1000 nascidos vivos (Grinfeld H, Segre CAM, Chadi G, Goldenberg 1). Deve estar subestimada, uma vez que é uma afecção de difícil diagnóstico, não é de notificação compulsória e o consumo de bebidas alcoólicas pelas gestantes é alto (Grinfeld H, Segre CAM, Chadi G, Goldenberg 1).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Atualmente o consumo de álcool é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. De acordo com dados da Organização mundial da Saúde, o uso e abuso de álcool são os maiores fatores de risco à saúde do brasileiro, sendo em média duas vezes maior que os riscos decorrentes do tabagismo (The World Health Report, 2002). Além disso, estima-se que o consumo de álcool esteja relacionado com boa parte dos suicídios, homicídios, agressões a mulheres e crianças, estupros e acidentes de trânsito fatais. O uso repetido e prolongado do álcool pode provocar graves transtornos mentais e de comportamento. De acordo com o Conselho Nacional de Alcoolismo e Dependência de Drogas dos Estados Unidos, a dependência para o álcool é uma doença primária crônica, sendo frequentemente progressiva e fatal. Cabe alertar que até o momento, não se tem conhecimento da remissão total dos dependentes químicos e, portanto considera-se o alcoolismo uma doença incurável. Baseados em estudos anteriores que demonstram que o álcool pode trazer graves transtornos a um recém nascido que fora exposto ao álcool durante o período gestacional é que procuramos avaliar efeitos deletérios do álcool em filhotes de ratas após a exposição destas, antes e durante o período gestacional, desta forma contribuir para que cada vez mais possamos conhecer melhor os mecanismos por onde o álcool exerce seus efeitos (Hiroeh et al, 2001; Vizcarra et al, 2001; White e Chen, 2002).

2.2 Específicos

Determinar as alterações provocadas pela administração crônica do álcool em filhotes de ratas expostas a esta droga antes e durante o período gestacional, procurando identificar alterações a nível molecular como também alterações comportamentais.

MATERIAL

2 - MATERIAIS

2.1 – Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas, adultos – jovens, com peso variando entre 150-200g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Durante todos os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.

2.2 – Material utilizado nos experimentos

- Agitador de tubos, modelo 251, FANEN, SP, Brasil.
- Balança analítica, modelo H5, Mettler, Suíça.
- Banho Maria, modelo 102/1, FANEN, SP, Brasil.
- Centrífuga refrigerada, modelo Marathon 26 KMR, Fisher Scientific.
- Contador de cintilação líquida, modelo LS 6500, Beckman, Fullerton, Ca, USA.
- Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro, Sarstedt, Alemanha Oriental.
- Espectrofotômetro, modelo Beckman DU 640B, Fullerton, CA, USA.
- Estufa para secagem, modelo 315 SE FANEM, SP, Brasil.
- Filtros de fibra de vidro GF/B Whatman, Maidstone, England.
- Freezer, modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C., USA.
- Frascos de vidro para contagem de cintilação, Vials Beckman, Fullerton, CA, USA.
- Guilhotina, Harvard, USA.
- Homogeneizadores manuais, Bellico, USA.
- Medidor de pH, modelo B374 Micronal, SP, Brasil.
- Micropipetas, H.E., Pedersen, Dinamarca.

2.3 – Preparo da droga

O álcool etílico a 95 %, P.A. (Lab. VETEC, Brasil) foi utilizado para o preparo de solução a 20 % (em água bidestilada). Esta foi administrada em volume que variou conforme a concentração final desejada, obtendo-se as seguintes concentrações finais:

Droga	Concentração final	Volume administrado (animal de 20g)
Etanol 0,5 g/kg	0,2 g/ml	0,5 mL
Etanol 4 g/kg	0,2 g/ml	4 mL

MÉTODOS

4 - Métodos

4.1 – Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com solução de etanol a 20% nas doses de 0,5 e 4g/kg diariamente durante trina dias iniciais. Após esse período foi colocado um macho a cada grupo. Durante todo o período gestacional os animais continuaram sendo tratados até o desmame dos filhotes (21º dia após o nascimento). Os animais controle foram tratados com água destilada.

4.2 - Testes Comportamentais

Foram utilizados três testes comportamentais: campo aberto (“open field”), labirinto em cruz elevado (“pluz maze”) e nado forçado.

Estes testes foram realizados nos 21º e 22º dia após o nascimento dos filhotes.

4.2.1 - Teste de labirinto em Cruz Elevado

Método

Muitos achados em relação à ansiedade foram obtidos através do uso de modelos animais indutores de ansiedade. O mais utilizado e aceito pela comunidade científica é o labirinto em cruz elevado. Este modelo consiste na utilização de um aparelho composto de dois braços adjacentes abertos e outros dois fechados, conectados por uma plataforma central de 10 cm x 10 cm e dispostos a 50 cm do solo. Os braços abertos apresentam medidas de 50 cm x 10 cm x 40 cm, medidas estas relacionadas respectivamente ao comprimento, largura e altura. Neste modelo, os roedores evitam os braços abertos do labirinto, restringindo a maioria de suas atividades aos braços fechados. Uma atividade relativamente baixa nos braços abertos é indicativo de ansiedade. Em contrapartida, roedores submetidos ao tratamento com ansiolíticos cruzam mais vezes pelos braços abertos e permanecem mais tempo nestes

braços quando comparados aos animais controles (Treit, 1985; Anseloni, 1995; Rodgers, 1997; Zangrossi Jr., 1997; Zangrossi Jr., 1997).

Procedimento Experimental

Nº 21º dia após o nascimento, cada filhote foi colocado na plataforma central do labirinto em cruz elevado, com o focinho direcionado para um dos braços fechados. Durante cinco minutos foi avaliado o número de entradas nos braços abertos e fechados, além do tempo de permanência nos respectivos braços.

4.2.2 - Nado Forçado

Método

Este modelo, idealizado por Porsolt et al., 1977a, se baseia no fato que, o roedor, ao ser colocado em uma cube de acrílico com água, apresenta um comportamento desesperado, caracterizado como desespero comportamental. Neste modelo, os roedores são forçados a nadar por cinco minutos em um ambiente sem saída. De princípio o animal apresenta comportamento de fuga e luta, nadando e buscando uma saída deste ambiente. Quando percebe que seu esforço está sendo em vão, o animal, então, apresenta um comportamento de conformismo, tentando se adaptar a esta nova situação aversiva. Neste momento, o animal apresenta uma postura típica de imobilidade, realizando movimentos mínimos necessários para não se afogar. Os usos de drogas que causam depressão, como a reserpina, aumentam o comportamento de conformismo, e, portanto, o tempo em que o animal apresenta-se imóvel no teste. Já as drogas que apresentam efeitos antidepressivos, exacerbam o comportamento de fuga e luta, e desta forma, diminuem o tempo em que o animal apresenta-se imóvel. Também foi constatado que o tempo de imobilização do animal durante o teste está diretamente relacionado com a eficácia clínica das drogas antidepressivas. Isto é, quanto menor o tempo de imobilidade apresentado pelo animal,

maior será a eficácia clínica da droga teste (Porsolt et al. 1977^a, 1977b, 1978; Buckett et al., 1982; Nishimura et al., 1988; Borsini & Meli, 1988).

Procedimento Experimental

Os filhotes foram submetidos a um pré-teste (para induzir a depressão), 24 horas antes da realização do teste final. No pré-teste cada animal foi acondicionado, durante 15 minutos, em uma cuba de acrílico transparente de 40 cm de altura por 18 cm de diâmetro, contendo 15 cm de água. No teste final, os animais eram novamente colocados em cubas, porém somente por 5 minutos. Durante estes 5 minutos foi avaliado o tempo em que o animal apresentou-se imóvel.

4.2.3 - Teste de Campo Aberto

No 22º dia de nascimento, os animais foram colocados em um campo aberto com área de (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e iluminado com luz vermelha. Este campo foi confeccionado com cartolina de cor vermelha clara, dividida em quatro quadrantes. Os animais foram primeiramente habituados durante 1 minuto ao campo aberto e posteriormente submetidos ao teste. O observador em um ambiente calmo colocava os animais nesse campo e registrava o número de travessias de um quadrado para o outro durante 3 minutos. Durante o período de observação também foi verificado e anotado o comportamento de *rearing* (comportamento no qual o animal fica com as patas dianteiras elevadas, em uma atitude exploratória) e o comportamento *grooming* (comportamento de autolimpeza) (Jorgensen et al., 1994).

4.3 - Dissecção da área cerebral

Os animais foram decapitados com uma guilhotina, os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo.

Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicada e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do corpo estriado. O corpo estriado (caudado, putamen e núcleo acumbens) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex (Zilles & Wree, 1985).

Terminada a dissecação, o corpo estriado foi colocado em papel alumínio devidamente identificado, pesado e conservado a -70°C para uso posterior. Quando necessária a estocagem por um certo período de tempo (no máximo 6 meses a -70°C) os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (Burke & Greenbaun, 1987; Fielder et al., 1978).

4.3.1 - Determinação da densidade dos receptores muscarínicos

A densidade dos receptores muscarínicos foi determinada através de ensaios de *binding* executados em homogenatos cerebrais. Para a determinação dos receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$)-símile foi utilizado o ligante não específico [^3H]-N-metilescopolamina ([^3H]-NMS, 85 Ci/mmol – New England), de acordo com o método previamente descrito (Dombrowski et al., 1983).

Método

O antagonista muscarínico marcado, [^3H]-NMS, liga-se a sítios específicos dentre os quatro primeiros segmentos transmembrana dos receptores muscarínicos que existem nos tecidos homogeneizados. Desse modo, o ligante tritiado marca os receptores presentes no tecido estudado (Wheatley et al., 1988).

A atropina é outro antagonista clássico utilizado nos *brancos* dos experimentos para determinar a radioatividade de *background* ou ligações não-específicas. A atropina acrescentada em concentração muito maior do que a [³H]-NMS, interage, seletivamente, com os mesmos sítios de ligação do receptor, deslocando e deixando livre toda a droga marcada, que é logo depois filtrada. A radioatividade contida no filtro é, então, determinada por cintilação líquida.

Procedimento Experimental

Terminada a dessecação do estriado em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10% em tampão fosfato de sódio, 150mM, pH 7,4.

Rapidamente, os homogenatos contendo 50 - 100µg de proteína foram incubados em tampão fosfato de sódio contendo entre 0,1282 a 6,41 nM de [³H]-NMS, na presença ou na ausência de sulfato de atropina 12,5µM em um volume final de 0,2mL.

Após incubação a 37°C por 30 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os filtros foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9% gelada, secos a 60°C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidros (*vials*) com 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com uma eficiência de 61%. A ligação específica foi calculada como a ligação total menos a ligação não-específica feita na presença de atropina 12,5µM os resultados foram expressos como fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry et al., 1951 utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Soluções Reagentes

Solução estoque de [³H]-N-metil-escopolamina ([³H]-NMS)

Cloridrato de [³H]-NMS (85 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA), dissolvido em tampão fosfato de sódio 150mM, pH 7,4 para obter uma concentração de 23,52 nM.

Solução estoque de atropina

Sulfato de atropina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em água bidestilada, para obter uma concentração de 0,5 mM.

Tampão fosfato de sódio

NaH₂PO₄ (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) foi dissolvido em água bidestilada, para obter uma solução 150mM e o pH ajustado para 7,4 com solução de HCl 1N (Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

Coquetel de Cintilação

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

4.4- Determinação da densidade dos receptores dopaminérgicos

A determinação dos receptores dopaminérgicos foi feita através de ensaios de binding executados em homogenatos cerebrais, variando os seguintes parâmetros:

Receptores D₁-símile

Foi utilizado o ligante específico [³H]-SCH 23390 (87,0 Ci/mmol – New England Nuclear, USA), de acordo com o método previamente descrito (Meltzer et al., 1989)

Receptores D₂-símile

Foi utilizado o ligante não-específico [³H]-espiroperidol (114,0Ci/mmol – New England Nuclear, USA), segundo uma adaptação do método previamente descrito por Kessler et al., 1991 e Meltzer et al., 1989.

Método

O [³H]-SCH 23390 é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D₁-símile. O ligante [³H]-espiroperidol é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D₂-símile, possuindo também afinidade pelos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ (Kessler et al., 1991; Terai et al., 1989). Para bloquear os receptores serotoninérgicos foi utilizado um antagonista específico, a mianserina.

A dopamina, um agonista dopaminérgico, foi adicionada, na forma não marcada, nos brancos dos ensaios para receptor D₁ para determinar a radioatividade de background ou ligações não-específicas, em uma concentração elevada para interagir com os mesmos sítios de ligação do receptor, impedindo assim, a ligação do [³H]-SCH 23390, que fica livre. O mesmo foi feito com relação ao receptor D₂, mas neste caso foi utilizado o **butaclamol**, um antagonista de receptores dopaminérgicos, também com o intuito de determinar as ligações não-específicas. Esses ligantes livres são retirados do filtro através de lavagens sucessivas, e a radioatividade é, então, contada por cintilação líquida.

Procedimento Experimental

Logo após a dissecação do estriado em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10% em tampão tris-HCl 50mM, pH 7,4.

Os homogenatos contendo 50-100µg de proteína foram incubados em tampão tris-HCl modificado (50MM, pH 7,4). No caso dos receptores D₁-símile o tampão

continha 0,135 a 10,8 nM de [³H]- SCH 23390 para experimentos de saturação. No caso de receptores D₂-símile o tampão continha 10 μM de mianserina (incubada por 30 minutos à temperatura ambiente) para bloquear os receptores serotoninérgicos e 0,0952 a 7,616 nM de [³H]- espiroperidol para experimentos de saturação. Em ambos os ensaios, os respectivos ligantes eram incubados na presença e na ausência de dopamina 100 μM (durante 10 minutos), no caso de receptores D₁, ou **butaclamol** 10 μM, no caso de receptores D₂ sendo o volume final do ensaio de 0,2mL.

Após incubação a 37° C durante 60 minutos, a reação foi terminada por filtração à vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os discos de papel de filtro foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9% gelada, secos a 60° C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) contendo 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com a eficiência de 61%. O binding específico foi calculado como binding total menos binding não-específico feito na presença de dopamina 100 μM ou **butaclamol** μM, respectivamente para os receptores D₁ e D₂ e os resultados foram expressos como fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry *et al*, 1951 utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Soluções Reagentes

[³H]- espiroperidol (114 Ci/mmol, Amersham Life Science, USA)

μL de [³H]- espiroperidol foram diluídos em tampão tris-HCl, pH 7,4 de forma a obter uma concentração final de 13,5 nM.

[³H]- SCH 23390 (87 Ci/mmol, Amersham Life Science)

5μL de [³H]- SCH 23390 foram diluídos em tampão tris-HCl, pH 7,4 de forma a obter uma concentração final de 13,5 nM.

Tampão tris-HCl

g de tris-HCl (trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para pH 7,4.

Tris HCl modificado

NaCl 120 mM; KCl 1 mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 1mM, NaEDTA 1 mM e ascorbato sódico 1 mM foram dissolvidos em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Mianserina

Comprimidos de mianserina (Tolvon 30 mg, Organon, Sp, Brasil) foram macerados e diluídos em tampão tris-HCl obtendo-se uma concentração final de 10 µM.

Dopamina (cloridrato de dopamina)

10 mg de dopamina (Sigma) foram diluídas em 2 mL de tampão tris-HCl não modificado tendo uma concentração final de 5mg/mL. A esta solução foi acrescentado ácido ascórbico 0,1 %.

Butaclamol (Cloridrato de butaclamol (+)-)

Butaclamol (RBI, MA, USA) foi dissolvido em ácido ascórbico 0,1 % de forma a se obter uma concentração final de 10 µM.

Coquetel de cintilação

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

- Dosagem de proteína

Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25° C utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito, que utiliza duas reações de formação de cor para analisar a concentração proteica fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa do ensaio. Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteau que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração foi medida em 750 nm, através de espectrofotômetro Beckman DU 640B (Lowry *et al.*, 1951).

Soluções Reagentes

Reagente A: Na_2CO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2 % em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N;

Reagente B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5 % em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1 %;

Regente C: Solução de cobre alcalino (24 mL do reagente A com 1 mL do reagente B, misturados no momento de usar);

Reagente de Folin – Ciocalteau – Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil), 1;1 em água bidestilada;

Solução de albumina sérica bovina (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 mg/mL em água bidestilada.

4.5 – Análise Estatística

A análise estatística utilizada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnnett* para comparações múltiplas e *t student* para comparações não paramétricas.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame na diminuição de receptores D1 do hipocampo analisado conforme técnica de *Binding*.

Este experimento foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos e mostra que após a administração do etanol em ratas no período pré-gestacional e gestacional foi analisado o impacto deste consumo de álcool nos filhotes destas ratas, que foram sacrificados e tiveram suas áreas cerebrais dissecadas e extraído o hipocampo para ser analisado, onde após estudo observamos que no grupo controle foi mensurado 326,4..... e no grupo 4 g/Kg 226,7.....conforme mostra a **Figura 3**, houve uma redução significativa da ordem de 30,5 % no número de receptores dopaminérgicos D1, analisado por técnica de binding, observada na dose de 4 g/Kg, administrada por via oral. * $p < 0,05$ comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

Binding D1- Hipocampo

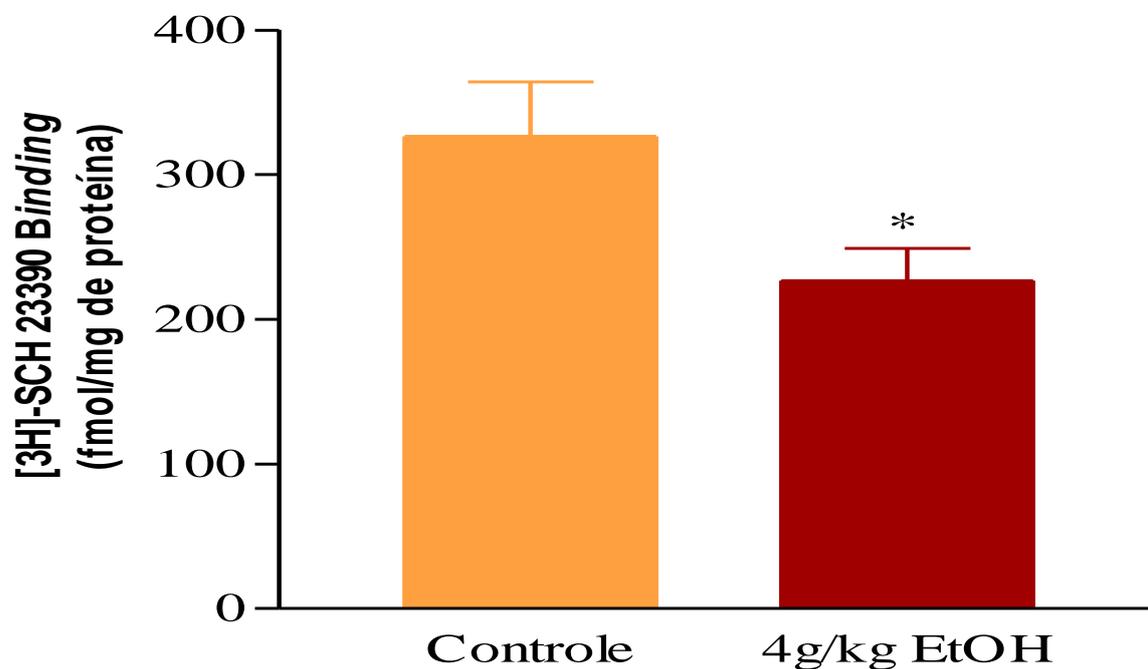


Figura 3 - Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame na diminuição de receptores D1 do hipocampo analisado conforme técnica de *Binding*, detalhada em materiais e métodos. Redução significativa de 30,5 % foi observada na dose de 4 g/Kg, via oral. * $p < 0,05$ comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

5.2 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame na diminuição de receptores D1 do núcleo da base analisado conforme técnica de *Binding*.

Este experimento foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos e mostra que após a administração do etanol em ratas no período pré-gestacional e gestacional foi analisado o impacto deste consumo de álcool nos filhotes destas ratas, que foram sacrificados e tiveram suas áreas cerebrais dissecadas e extraído o núcleo da base para ser analisado, onde após estudo observamos que no grupo controle foi mensurado 446,8 e no grupo 4 g/Kg 213,7, conforme mostra a **Figura 4**, houve uma redução significativa da ordem de 52,2 % no número de receptores dopaminérgicos D1, analisado por técnica de binding, observada na dose de 4 g/Kg, administrada por via oral. * $p < 0,05$ comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

Binding D1-Núcleo da Base

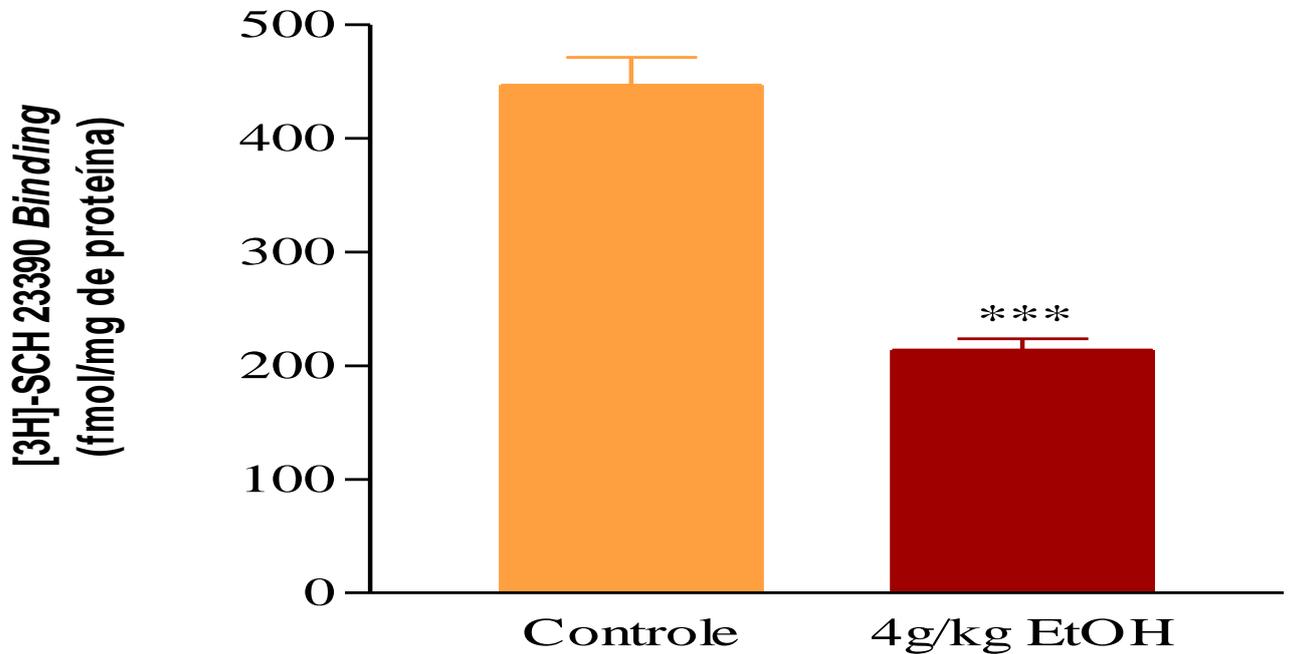


Figura 4 - Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame na diminuição de receptores D1 do núcleo da base analisado conforme técnica de *Binding*, detalhada em materiais e métodos. Redução significativa de 52,2 % foi observada na dose de 4 g/Kg, via oral.

* $p < 0,05$ comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

5.3 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame na diminuição de receptores D2 do hipocampo analisado conforme técnica de *Binding*.

Este experimento foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos e mostra que após a administração do etanol em ratas no período pré-gestacional e gestacional foi analisado o impacto deste consumo de álcool nos filhotes destas ratas, que foram sacrificados e tiveram suas áreas cerebrais dissecadas e extraído o hipocampo para ser analisado, onde após estudo observamos que no grupo controle foi mensurado 164,9e no grupo 4 g/Kg 124,0, conforme mostra a **Figura 5**, houve uma redução significativa da ordem de 24,8 % no número de receptores dopaminérgicos D2, analisado por técnica de *binding*, observada na dose de 4 g/Kg, administrada por via oral. * $p < 0,05$ comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

Binding D2 - Hipocampo

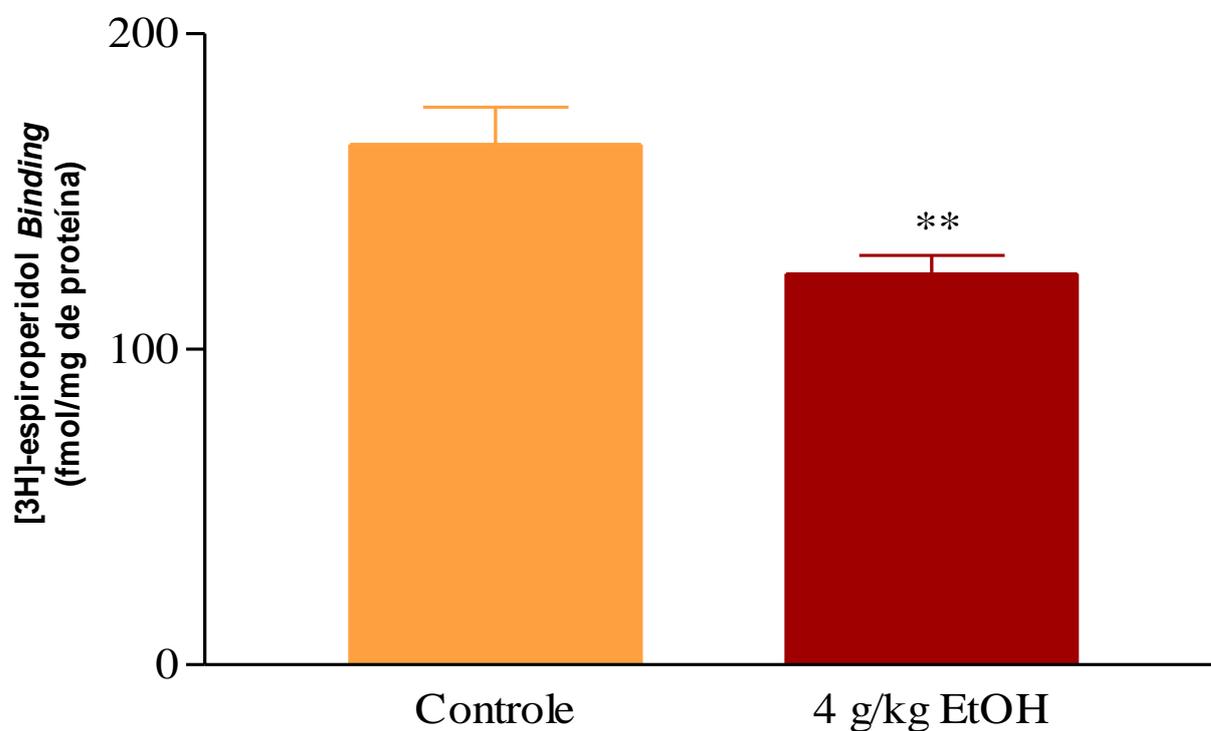


Figura 5 - Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame na diminuição de receptores D₂ do hipocampo analisado conforme técnica de *Binding*, detalhada em materiais e métodos. Redução significativa de 24,8 % foi observada na dose de 4 g/Kg, via oral. * $p < 0,05$ comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

5.4 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame na diminuição de receptores D2 do núcleo da base analisado conforme técnica de *Binding*.

Este experimento foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos e mostra que após a administração do etanol em ratas no período pré-gestacional e gestacional foi analisado o impacto deste consumo de álcool nos filhotes destas ratas, que foram sacrificados e tiveram suas áreas cerebrais dissecadas e extraído o núcleo da base para ser analisado, onde após estudo observamos que, conforme mostra a **Figura 6**, houve uma redução significativa da ordem de 25,11 % no número de receptores dopaminérgicos D2, analisado por técnica de *binding*, observada na dose de 4 g/Kg, administrada por via oral. * $p < 0,05$ comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

Binding D2-Núcleo da Base

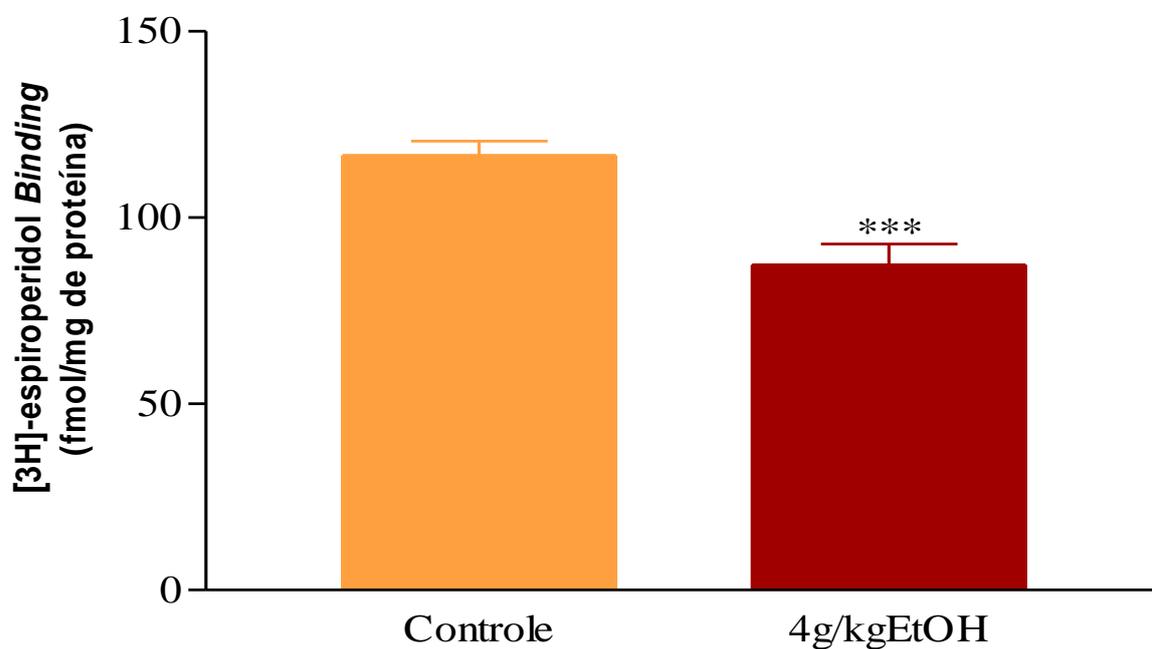


Figura 6 - Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame na diminuição de receptores D₂ do núcleo da base analisado conforme técnica de *Binding*, detalhada em materiais e métodos. Redução significativa de 25,11 % foi observada na dose de 4 g/Kg, via oral. *p<0,05 comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

5.5 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame no aumento dos receptores M1 e M2 do hipocampo analisado conforme técnica de *Binding*.

Este experimento foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos e mostra que após a administração do etanol em ratas no período pré-gestacional e gestacional foi analisado o impacto deste consumo de álcool nos filhotes destas ratas, que foram sacrificados e tiveram suas áreas cerebrais dissecadas e extraído o hipocampo para ser analisado, onde após estudo observamos que, conforme mostra a **Figura 7**, houve um aumento significativo da ordem de 39,97% no número de receptores muscarínicos M1 e M2, analisado por técnica de *binding*, observada na dose de 4 g/Kg, administrada por via oral. * $p < 0,05$ comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

Binding M1 + M2 - Hipocampo

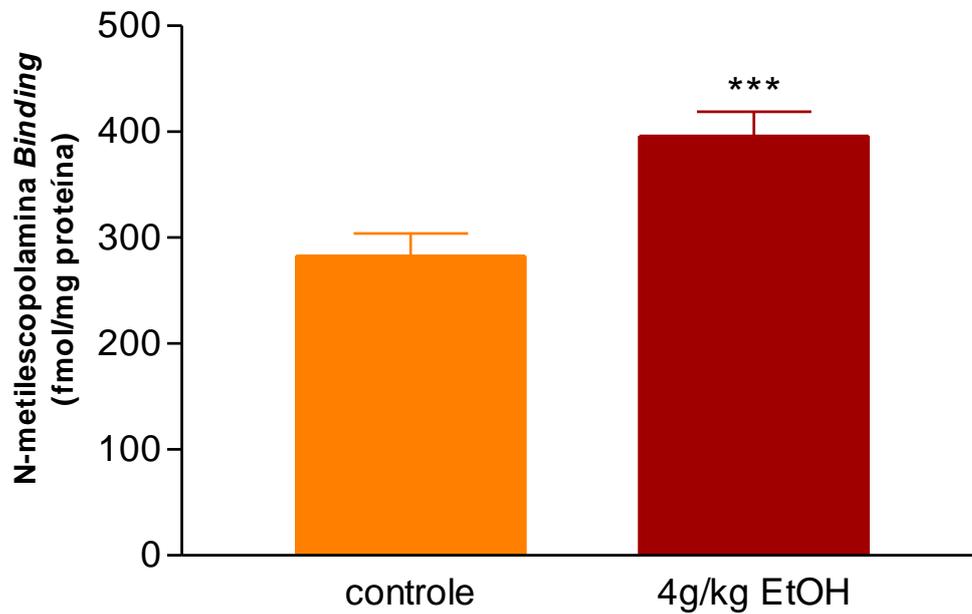


Figura 7 - Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame no aumento de receptores M₁ + M₂ do hipocampo analisado conforme técnica de *Binding*, detalhada em materiais e métodos. Redução significativa de 39,97 % foi observada na dose de 4 g/Kg, via oral. *p<0,05 comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

5.6 Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame no aumento dos receptores M1 e M2 do núcleo da base analisado conforme técnica de *Binding*.

Este experimento foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos e mostra que após a administração do etanol em ratas no período pré-gestacional e gestacional foi analisado o impacto deste consumo de álcool nos filhotes destas ratas, que foram sacrificados e tiveram suas áreas cerebrais dissecadas e extraído o núcleo da base para ser analisado, onde após estudo observamos que, conforme mostra a **Figura 7**, houve um aumento significativo da ordem de 42,25% no número de receptores muscarínicos M1 e M2, analisado por técnica de *binding*, observada na dose de 4 g/Kg, administrada por via oral. * $p < 0,05$ comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

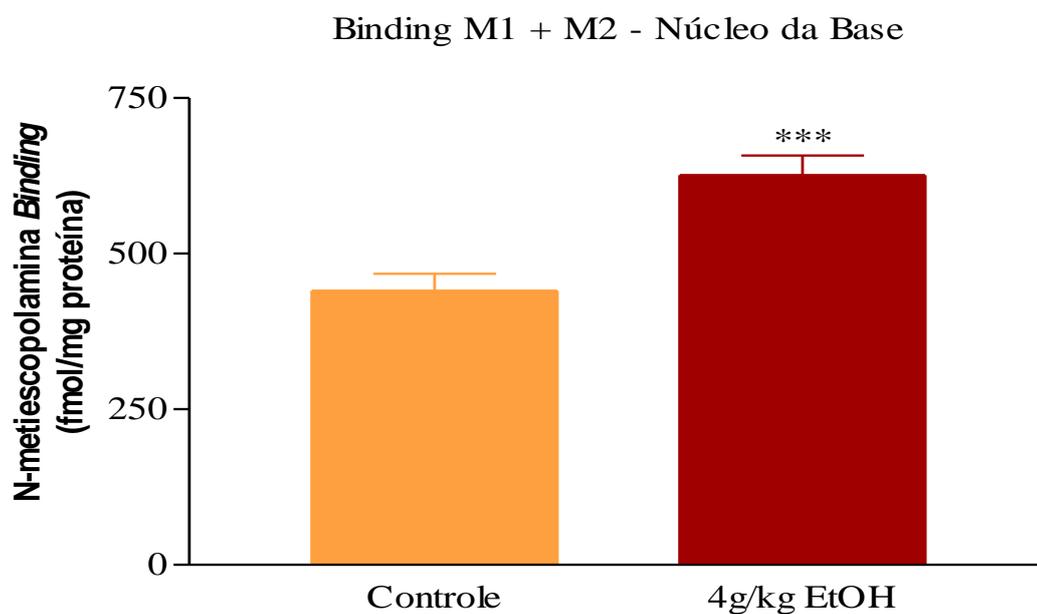


Figura 8 - Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame no aumento de receptores M₁ + M₂ do núcleo da base analisado conforme técnica de *Binding*, detalhada em materiais e métodos. Redução significante de 42,25 % foi observada na dose de 4 g/Kg, via oral. *p<0,05 comparado ao controle (*t student* como teste *post hoc*).

5.7 Efeito do etanol do teste do labirinto em cruz elevado em filhotes de ratas de 21 dias

Teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*)

Na **Tabela 1** mostra os resultados do teste de labirinto em cruz elevado onde o etanol nas doses de 0,5 e 4 g/Kg, v.o., causa alterações significativas nos parâmetros observados. A dose de 0,5 e 4 g/Kg, v.o., causaram um aumento significativo no Número de Entradas nos Braços Abertos (NEBA) (**Figura 9**) e no Tempo de Permanência nos Braços Abertos (TPBA) (**Figura 10**) O Número de Entradas nos Braços Fechados (NEBF) Tempo de Permanência nos Braços Fechado (TPBF) também foi alterados nestas doses com redução. O diazepam, utilizado como controle positivo, alterou significativamente todos os parâmetros analisados, aumentando o número e o tempo de permanência nos braços abertos e diminuindo o número e o tempo de permanência nos braços fechados.

Tabela 1. Efeito do etanol no teste do labirinto em cruz elevado em filhotes de rato de 21 dias.

Grupo	NEBA	TPBA(s)	NEBF	TPBF(s)
Controle	2,15 ± 0,29 (13)	35,50 ± 5,31 (14)	4,71 ± 0,43 (14)	249,70 ± 6,48 (14)
DZP 2.	5,37 ± 0,73 (08)*	224,9 ± 27,79 (08)*	2,12 ± 0,22 (08)*	91,00 ± 14,83 (08)**
EtOH 0,5	4,50 ± 0,59 (14)*	75,43 ± 5,52 (07)*	3,42 ± 0,20 (07)**	175,70 ± 8,62 (07)**
EtOH 4	5,61 ± 0,59 (13)*	169,9 ± 21,13 (12)*	2,91 ± 0,22 (12)**	153,90 ± 16,82 (12)**

Valores representam a média ± SEM do número de animais, em parênteses. Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. DZP 2 = Diazepam 2 mg/Kg, v.o. utilizado como padrão. NEBA = número de entradas braços abertos; TPBA = tempo permanência nos braços abertos; NEBF = número de entradas nos braços fechados e TPBF = tempo permanência nos braços fechados. Os tempos foram medidos em segundos (s). *p < 0,05 e **p < 0,01 quando comparado com o controle (ANOVA e Dunnett como teste *post hoc*).

Labirinto

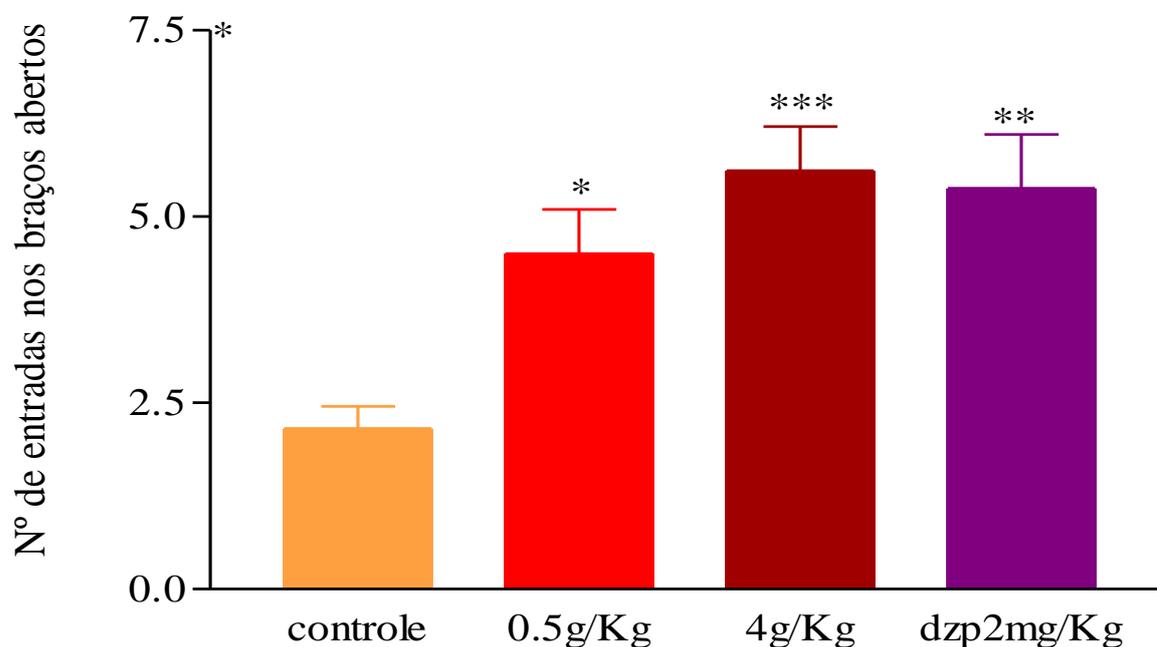


Figura 9 - Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame no teste do labirinto. Neste gráfico observa-se que o parâmetro avaliado NEBA (Número de Entradas nos Braços Abertos) sofre interferência após administração do etanol nas doses de 0,5 e 4 g/Kg, via oral. Diazepam 2 mg/Kg, i.p., como controle positivo. * $p < 0,05$ (ANOVA e Dunnet como *post hoc*).

Labirinto

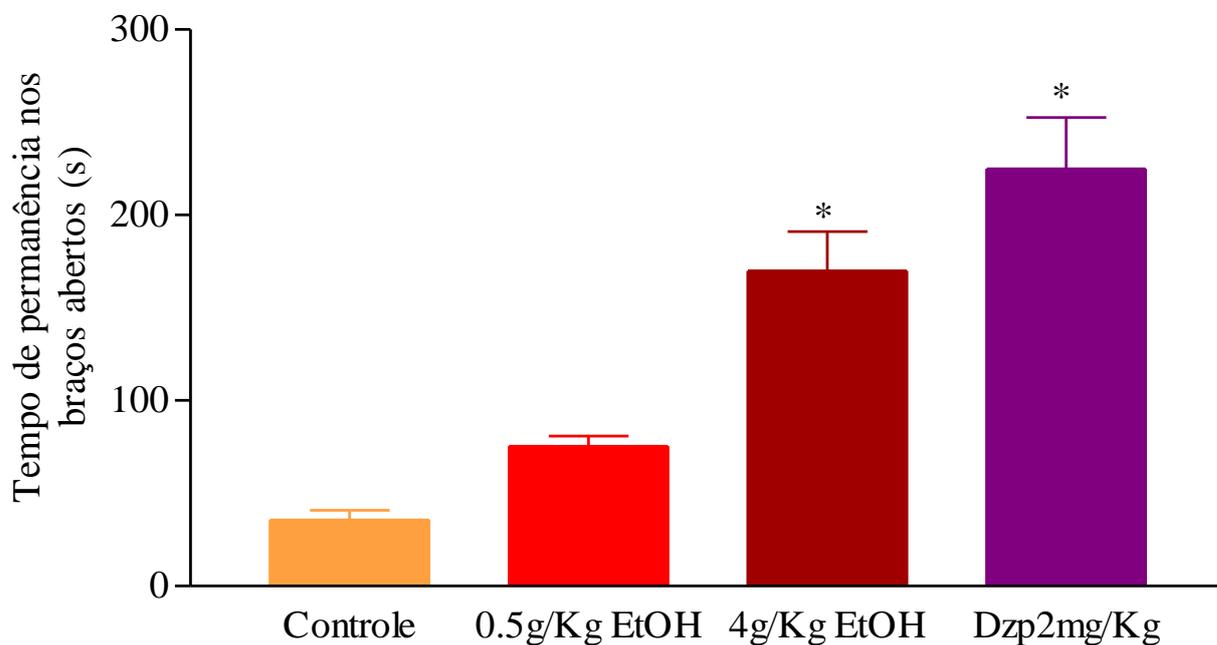


Figura 10 - Efeito do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame no teste do labirinto. Neste gráfico observa-se que o parâmetro avaliado TPBA (Tempo de Permanência nos Braços Abertos) sofre interferência após administração do etanol nas doses de 0,5 e 4 g/Kg, via oral. Diazepam 2 mg/Kg, i.p., como controle positivo. * $p < 0,05$ (ANOVA e Dunnet como *post hoc*).

5.8 Efeito da exposição de etanol em filhotes de ratas que foram submetidas a ingestão diária durante o período pré e gestacional no teste do Campo Aberto.

Teste do campo aberto na arena para camundongos – avaliação da atividade exploratória.

A avaliação dos efeitos comportamentais provocados pelo álcool foram revelados pela avaliação da atividade exploratória dos camundongos, seguindo procedimento descrito em Matérias e Métodos. Os animais, separados e identificados por seus respectivos grupos foram analisados com relação aos seguintes comportamentos: Número de cruzamentos, *Grooming* e *Rearing*.

Os resultados da **Tabela 2** mostraram que ocorreu uma diminuição do tipo dose-dependente no Número de Cruzamentos para os grupos 0,5 e 4 g/Kg, v.o., respectivamente. Dados da Tabela 2 foram utilizados para elaboração da **Figura 12**.

Também o *grooming* foi diminuído significativamente (**Figura 11**) para as doses supracitadas quando comparadas ao controle. Quanto ao *rearing* houve inibições (**Figura 13**) para as mesmas doses citadas anteriormente.

Tabela 2. Efeito da exposição de etanol em filhotes de ratas que foram submetidas a ingestão diária durante o período pré e gestacional no teste do Campo Aberto.

Grupo	N° de cruzamentos	N° <i>Grooming</i>	N° <i>Rearing</i>
Controle, v.o.	47,9 ± 1,59 (15)	2,3 ± 0,24 (18)	16,36 ± 0,86 (14)
EtOH 0,5g/kg, v.o.	34,0 ± 4,23 (10)*	2,3 ± 0,32 (13)	8,36 ± 0,99 (11)*
EtOH 4g/kg, v.o.	32,4 ± 3,07 (10)*	1,4 ± 0,17 (17)*	8,92 ± 1,22 (13)*

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Valores são a média ± EPM do número de animais especificado em parêntese. ANOVA e Dunnet como teste *post hoc*.

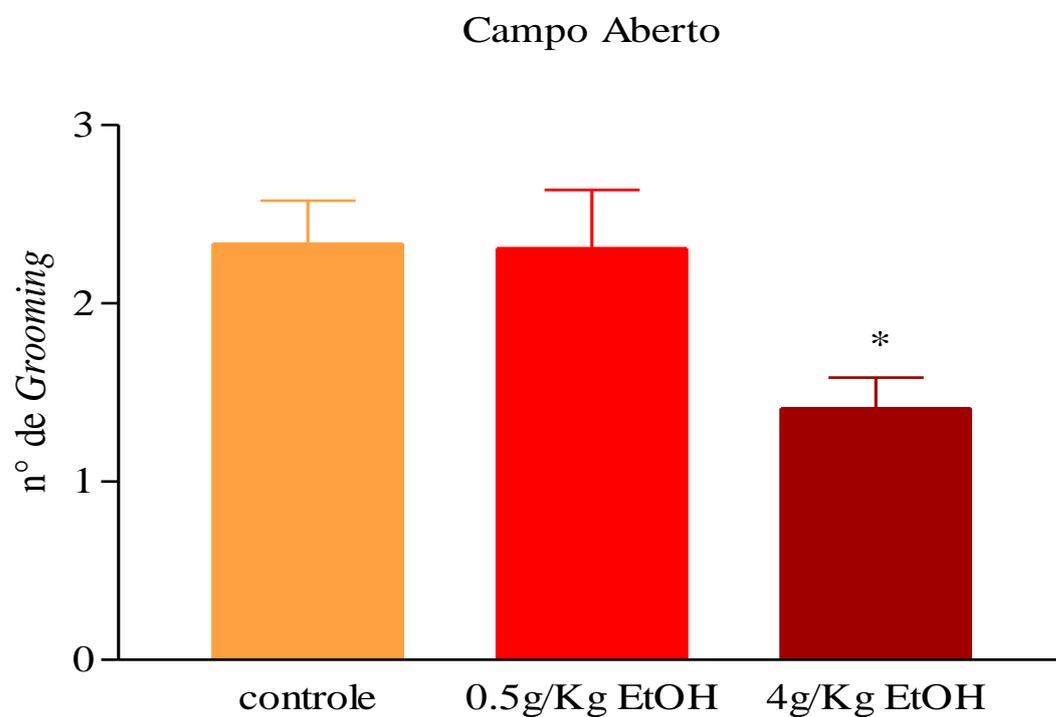


Figura 11 – Efeitos comportamentais em nível de SNC do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame. Neste parâmetro avaliado, o número de grooming, sofre redução significativa após a administração de etanol 4g/kg, v.o. * $p < 0,05$ (ANOVA e Dunnet como teste *post hoc*).

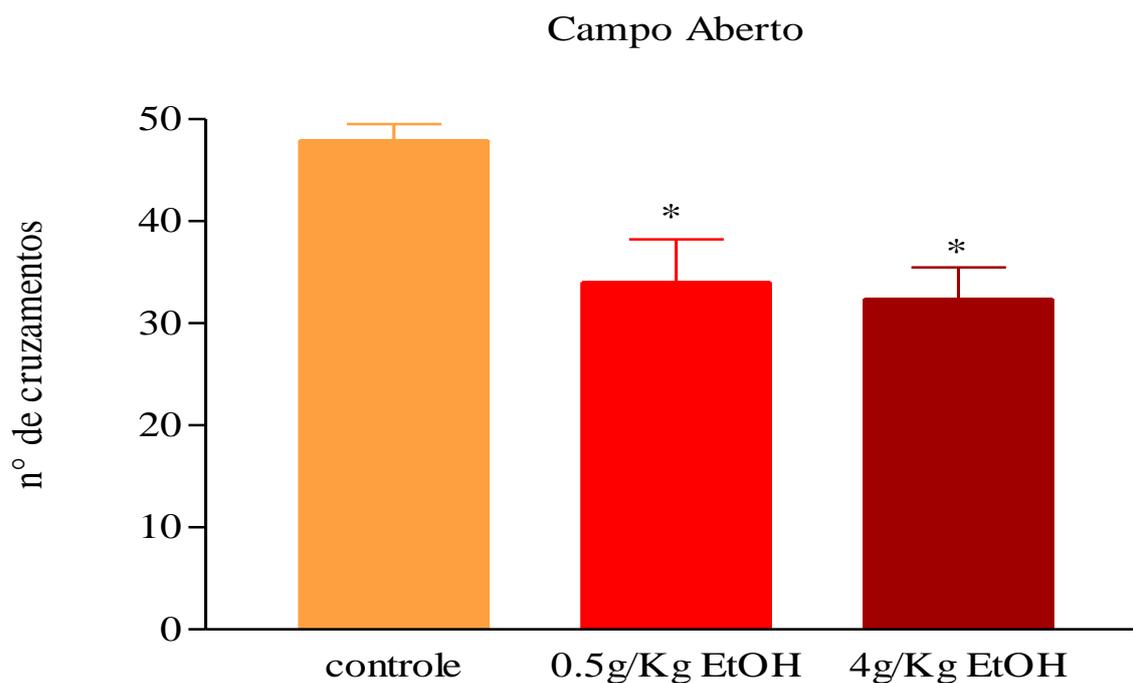


Figura 12 – Efeitos comportamentais em nível de SNC do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame. Neste parâmetro avaliado, o número de cruzamentos, sofre redução significativa após a administração de etanol 0,5 e 4g/kg, v.o. * $p < 0,05$ (ANOVA e Dunnet como teste *post hoc*).

Campo Aberto

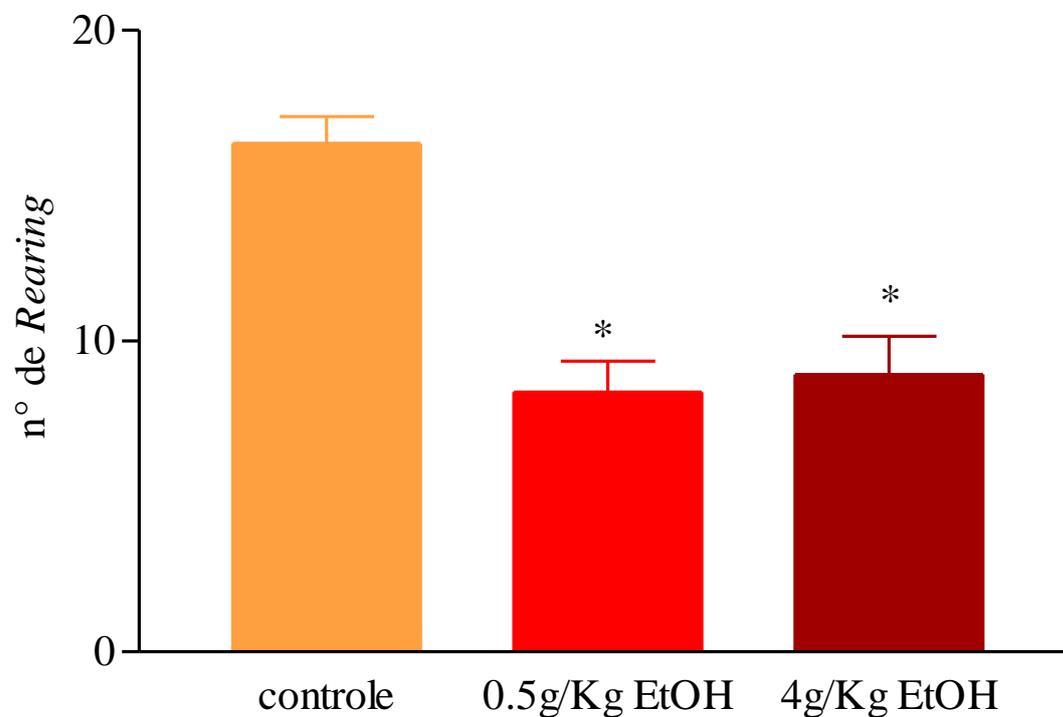


Figura 13 – Efeitos comportamentais em nível de SNC do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame. Neste parâmetro avaliado, o número de rearing, sofre redução significativa após a administração de etanol 0,5 e 4g/kg, v.o. * $p < 0,05$ (ANOVA e Dunnet como teste *post hoc*).

5.9 Efeitos do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional e gestacional até o desmame sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.

Este teste utilizado para avaliar os efeitos antidepressivos de drogas é muito utilizado experimentalmente e foi executado conforme está descrito em Materiais e Métodos. Foi observado aumento significativo no tempo de imobilidade dos grupos tratados com etanol 0,5 e 4g/kg, v.o., respectivamente (**Figura 14**). A Imipramina 30 mg/Kg foi utilizado como controle positivo. * $p < 0,05$ (ANOVA e Dunnet como teste *post hoc*).

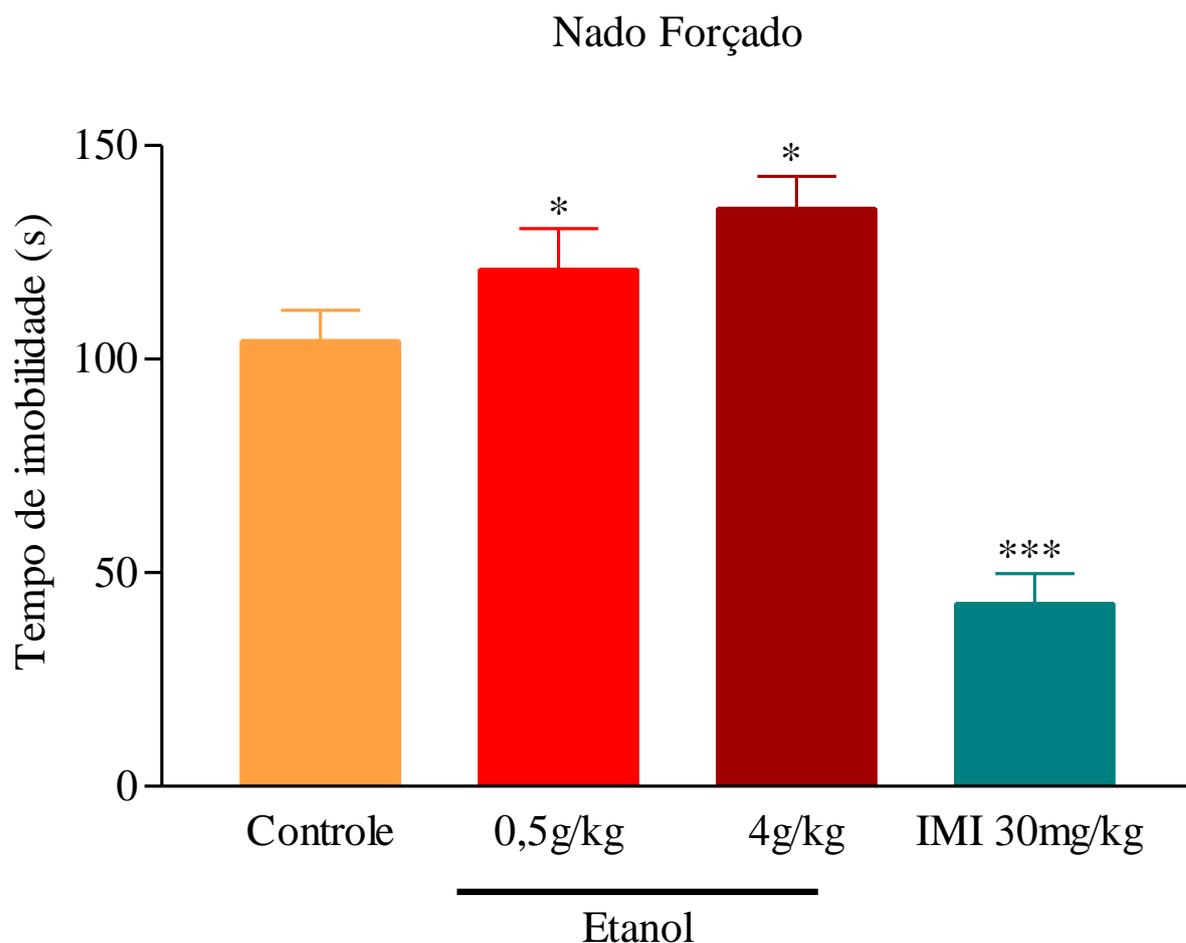


Figura 14 – Efeitos do etanol sobre os filhotes de ratas administrado no período pré-gestacional, gestacional até o desmame sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Observou-se aumento significativo no tempo de imobilidade dos grupos tratados com etanol 0,5 e 4g/kg, v.o. IMI = Imipramina 30 mg/Kg como controle positivo. * $p < 0,05$ (ANOVA e Dunnet como teste *post hoc*).

DISCUSSÃO

Os efeitos característicos resultantes da exposição pré-natal ao etanol em humanos, bem como em roedores, são prejuízos cognitivos e de funções comportamentais, resultante de danos ao SNC. O consumo em quantidades significativas de etanol durante a gravidez é responsável pela síndrome Álcool Fetal (FAS), que é caracterizada por baixo peso ao nascimento, microcefalia, anormalidades faciais, retardo mental, defeitos no coração e outras anormalidades. Disfunções no SNC são as mais severas e permanentes conseqüências da ingestão materna de álcool. O neocórtex, hipocampo e cerebelo são especialmente suscetíveis ao álcool e foi associado com déficits comportamentais. Crianças nascidas de mães que utilizaram o álcool durante a gestação freqüentemente apresentaram a Síndrome Álcool Fetal (SAF), cujos principais sintomas são disfunções no Sistema nervoso Central (SNC), como retardo mental, microcefalia e microencefalia, mal formações no cérebro, e ainda deficiências no crescimento e características faciais particulares (Streissguth et al., 1980).

Os efeitos da SAF no SNC podem surgir em longo prazo e persiste até a idade adulta. Um importante efeito que surgiu a partir de estudos animais para entender as características e mecanismos do desenvolvimento da neurotoxicidade do álcool, é que o período que o cérebro sofreu a exposição ao álcool durante seu desenvolvimento, é de extrema importância para os tipos de efeitos teratogênicos que irão se manifestar. Quando o etanol é administrado durante o maior pico de crescimento do cérebro (no terceiro trimestre de gravidez em humanos e nas primeiras duas semanas em ratos), o efeito mais comumente observado é a microencefalia. Microencefalia é também visto em 80% de crianças com FAZ e caracteriza-se por ser irreversível em animais e humanos. O pico de crescimento do cérebro é caracterizado pela proliferação e maturação de células gliais e pela maturação dos neurônios e sinaptogênese (Samson, 1986; Balduini and Costa, 1989; Spohr et al., 1993).

Pesquisas em humanos e animais fornecem evidências que o SNC é vulnerável aos efeitos deletérios do etanol durante o desenvolvimento, e uma particularidade deste efeito é a perda neuronal. Um grande número de estudos que exploram as seqüelas

neurológicas resultante do uso abusivo do álcool durante a gravidez tem seu foco na suscetibilidade neuronal. Perdas seletivas de certos neurônios, p.ex.: células hipocâmpais, piramidais ou cerebelares de Purkinje e células de grânulos, foram descobertas. A administração de etanol em ratos recém-nascidos de 7 dias, ficou demonstrado que causa severa morte apoptótica neuronal nas regiões do hipocampo e córtex cerebral. Estudos *in vitro* indicam que o etanol pode causar morte celular apoptótica neuronal diretamente em qualquer tipo de neurônio, ou indiretamente, por inibição de ações protetoras de fatores tróficos como o glutamato e *insulin-like-growth factor 1* ou a acetilcolina. Um relatório recente indica que a área CA1 do hipocampo é altamente suscetível a exposição pré-natal ao etanol (Ikonomidou et al., 2000; Miller, 1995; Maier et al., 1997; Oberdoerster and Rabin, 1999; Bhave and Hoffman, 1997; Cui et al., 1997; Castoldi et al., 1998).

Em nosso trabalho, mostramos que filhotes expostos no período pré-natal a baixas e altas doses de etanol apresentam um aumento significativo no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, no teste de labirinto em cruz elevado. Nossos resultados são indicativos de um efeito ansiolítico do etanol. Sabe-se largamente, que em roedores, o etanol em doses moderadas causa típica incoordenação motora, hiperatividade e hipotermia, agindo como uma droga ansiolítica. Cada uma dessas respostas pode ser analisada por testes específicos. O nível de ansiedade é medido, no teste de labirinto em cruz elevado, que mede o número e o tempo que o animal entrou e permaneceu nos braços abertos, comparado com os braços fechados, assim o teste é projetado para detectar o efeito ansiolítico.

Há evidências indicando o papel do óxido-nítrico (NO) no efeito ansiolítico induzido pelo etanol, como medido pelo teste de labirinto em cruz elevado. Estes resultados mostraram que uma inibição nos caminhos de formação de NO aumentam a eficácia do etanol produzir efeito ansiolítico em ratos, ao passo que a estimulação destes caminhos diminui a eficácia do etanol produzir efeito ansiolítico. Os autores postulam que o aumento NO-dependente na atividade da guanilato-ciclase e níveis de GMPc oponha-se ao efeito ansiolítico produzido pela administração aguda de etanol.

Além do mais, nós mostramos que os filhotes de ratos apresentaram diminuições significativas não somente no número de cruzamentos, mas também na ocorrência de *rearing* e *grooming*, como determinado pelo teste de campo aberto. Substâncias como o álcool, classificadas como depressoras do SNC, são causas esperadas da diminuição da atividade locomotora espontânea. A dopamina exerce um papel de grande importância no comportamento de pessoas que consumiram etanol.

Nossos resultados também demonstraram que a exposição ao etanol em filhotes na fase intra-uterina causaram um aumento significativo em seu tempo de imobilidade, indicando um efeito depressivo, determinado pelo teste de nado forçado. É largamente aceito que antidepressivos exerçam seus efeitos em sistemas neurotransmissores de monoaminas, como a noradrenalina, dopamina e serotonina. O sistema serotoninérgico é também importante na farmacologia do álcool, provavelmente por modular a liberação de dopamina. Além do mais, a neurotransmissão serotoninérgica foi relatada como importante no papel da ansiedade, e as ações celulares de vários neurotransmissores tal como serotonina, noradrenalina, dopamina e acetilcolina, no cérebro, sejam mediados pela ativação da adenilato ciclase. Isto causa a formação intracelular do segundo mensageiro AMPc, e subsequentemente leve a ativação de proteína quinase A dependente de AMPc.

Ratos forçados a ingerir álcool antes e após a gestação deram a luz filhotes com baixos níveis de 5-HT, reduzido número de receptores 5-HT1 e uma baixa densidade de neurônios serotoninérgicos. Exposições constantes de etanol por injeção intraperitoneal em altas doses durante a fase de formação do tecido nervoso e cérebro dos camundongos é conhecido por produzir vários déficits de crescimento intra-uterino, teratogênese de órgãos importantes e anormalidades importantes no desenvolvimento do cérebro, as quais estão associadas com a morte fetal. Recentemente, um déficit no desenvolvimento, foi produzido em camundongos, que tiveram livre acesso de álcool a 25%, iniciado antes da fase de neurilação e continuou durante toda a gestação. Esta exposição gestacional é comparável a exposição em humanos durante os primeiros dois trimestres, fase de desenvolvimento do cérebro. Em camundongos que foram expostos ao álcool, durante a fase de formação do cérebro, foram descritos aumento de

perfuração do tubo neural, redução de neurogênese, microencefalia, entre outras anomalias. Evidências convergem que neurônios sintetizadores de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) pode ser particularmente vulnerável a ação do etanol. Disgênese do sistema de 5-HT pela a exposição ao álcool durante as fases iniciais do desenvolvimento do cérebro, pode ser um processo crucial que leva a um amplo efeito cascata para o surgimento de anormalidades em outros sistemas do cérebro. Em cérebros de mamíferos, a 5-HT pelo menos dois grandes papéis: Agir como neurotransmissor para uma rápida comunicação entre neurônios e é um efetor para sinalização neuronal na diferenciação e maturação do desenvolvimento do cérebro. (Goodlett et al, 2005.)

Os resultados deste trabalho mostraram que durante a exposição pré-natal ao etanol 4g/kg, diminui significativamente receptores dopaminérgicos D₁ bem como os receptores D₂, aumentando receptores muscarínicos colinérgicos em hipocampo e no corpo estriado de ratos. Disfunção dopaminérgica pode ser um mecanismo que contribua para as anormalidades nas desordens neurodesenvolvimentais relacionada ao álcool. Randall e Hannigan, 1999, mostraram que exposições pré-natais ao álcool reduzem o número funcional de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ em cérebro de roedores. Exposição materna ao álcool produz de 20-24% de diminuição de sítios ligantes (binding) D₁ no corpo estriado, no 19º e 37º dia de vida dos filhotes, respectivamente. E mais de 40% de diminuição nos sítios de ligação (*Binding*) D₁ no córtex central de ratos no 19º dia de vida. A exposição ao etanol na fase uterina dos ratos foi também evidenciado uma diminuição nos sítios de ligação (*Binding*) D₂ no corpo estriado verificado no 30ª, 56ª e 63ª dias de vida dos animais.

Estudos bioquímicos e comportamentais anteriores mostraram que a exposição ao etanol no útero produza em longo prazo efeitos no desenvolvimento das características eletrofisiológicas e farmacológicas de sistemas cerebrais dopaminérgicos. Estes resultados sugerem que a exposição ao etanol no útero possa produzir uma diminuição no número e função de receptores dopaminérgicos distinguindo dos autoreceptores D₂ somatodendriticos impulso regulado.

Nossos resultados concordam com outros (35) mostrando que a exposição pré-natal diária de 3g/kg de etanol causam uma diminuição no número de sítios ligantes dopaminérgicos D₂ dentro do estriado dorsal e ventral, mas nenhuma alteração foi detectada após exposição a altas doses de etanol (5g/kg). Recentes estudos indicam que a exposição pré-natal ao etanol pode predominantemente produzir diminuição na reatividade dos receptores dopaminérgicos D₂, mas não no subtipo D₁.

Outros trabalhos (06) relatam que a exposição pré-natal ao etanol não altera a concentração e produção de dopamina e produz um leve aumento nos receptores de ligação D₁, efeito este não observado no receptor D₂, em camundongos. Além disso, nós também recentemente demonstramos (40) que o etanol sendo administrado por uma semana em ratos produz decréscimos nas densidades dos receptores D₁ e D₂ e não há mudanças nas constantes de dissociação. O etanol é uma substância estimulante e como tal manifesta seus efeitos através da ativação das vias dopaminérgicas na região mesolímbica do cérebro. Níveis de dopamina e de número de receptores D₂ reduzidos foi demonstrado em cérebros de animais que utilizaram etanol, em modelos genéticos de alcoolismo (32). Além disso, agonistas dopaminérgicos restringem o consumo de álcool, enquanto que os antagonistas apresentam efeito oposto.

Efeitos em outros sistemas de receptores foram também observados após o consumo de álcool. Trabalhos preliminares (41) demonstraram um aumento nos *binding* muscarínicos, enquanto que outros autores (20) descobriram uma diminuição da afinidade dos receptores muscarínicos, no hipocampo de filhotes de ratas expostas no período pré-natal ao etanol. Contudo, Black et. al., 1995 (05), testando a hipótese que a exposição pré-natal ao etanol altera receptores muscarínicos do hipocampo, mostrou uma significativa diminuição no número de receptores muscarínicos no hipocampo de rato, levando a uma longa e duradoura alteração nos receptores colinérgicos muscarínicos. Alterações no sistema colinérgico, em fetos de ratos expostos ao álcool podem ajudar a entender alguns dos déficits cognitivos observados após a exposição pré-natal ao álcool (31).

Várias pesquisas (18,33 e 39) mostraram que a exposição no período fetal ao etanol está associada ao desenvolvimento de efeitos deletérios no cérebro do feto.

Uma interação do etanol com células gliais, particularmente astrócitos têm sido indicado por contribuir para o desenvolvimento da neurotoxicidade do álcool. Em crianças com FAS, duas áreas originariamente formada por células gliais, o corpo caloso e a comisura anterior, foram relatados casos de hipoplasia (). A descoberta que a microencefalia esta fortemente associada com a exposição do cérebro ao etanol, no período de maior crescimento e maturação das células nervosas, que é um período caracterizado pela rápida proliferação e maturação de células gliais, também sugere um efeito potencial do etanol na proliferação, crescimento e maturação da glia. Outros estudos têm investigado os efeitos do etanol nos astrócitos ou outras linhagens de células gliais em cultura. Em adição aos vários efeitos nas proteínas do citoesqueleto e outras enzimas, o etanol exerce um profundo efeito inibitório na proliferação de células gliais. Em particular, proliferação induzida por IGF-1 e agonistas colinérgicos muscarínicos é inibida por etanol. Recentes trabalhos (09 e19) demonstram que, em baixas concentrações, o etanol inibe a proliferação de células astrogliais *in vitro*, particularmente quando estimulado pela acetilcolina (Riley, et al 1995; Guerri et al , 2001).

Na década passada, foi proposta a hipótese de que ativação dos caminhos de sinapsis de transdução pelo neurotransmissor acetilcolina pode representar um relevante alvo para o desenvolvimento da neurotoxicidade do etanol, hoje já existe claras evidências que a acetilcolina pode influenciar vários aspectos no desenvolvimento do cérebro. De particular interesse é que, níveis de acetilcolina são particularmente alto no cérebro de ratos recém-nascidos, e que o sistema de muscarínico transdução de sinais ativado por receptor (principalmente fosfolipase C e D) estão grandemente acentuados nos cérebros de neonatos comparados com adultos, apesar da baixa densidade de receptores. Estudos preliminares, tanto *in vivo* como *in vitro*, estabeleceram que o etanol pode inibir o metabolismo de fosfolipídios induzido por receptor muscarínicos e que o efeito foi mais pronunciado no cérebro de ratos neonatos. Também foi descoberto que existe uma forte correlação entre a habilidade do etanol em causar microencefalia e a de inibir o metabolismo fosfolipídico induzido por receptor muscarínico. Na fase de maior crescimento do cérebro, caracterizado pela

proliferação das células astrogliais, o período mais sensível ao etanol em induzir microencefalia, e é uma fase do desenvolvimento do cérebro que as respostas dos sinais de transdução estimulados por receptores muscarínicos estão enormemente aumentados, desta forma foi sugerida a hipótese que a acetilcolina pode agir na mitogênese das células astrogliais, e que este efeito pode ser inibido pelo etanol. Esses dados sugerem que o caminho de sinais de transdução intracelulares ativados por receptores muscarínicos pode representar um relevante alvo para o desenvolvimento da neurotoxicidade do etanol em humanos (Lauder e Schambra, 1999).

Além disso, os déficits cognitivos associados com FAS, em vários estudos animais e clínicos indicam que a exposição ao álcool pode também ter prejuízos no comportamento social (27). Um trabalho recente (25), mostrou que volumes de CA1 e CA3, número e densidade de células piramidais foram reduzidos em 4 a 9 dias após o nascimento (equivalente ao terceiro trimestre humano), no hipocampo de filhotes de ratos expostos ao álcool no período embrionário. O conseqüente dano ao hipocampo pode contribuir para déficits comportamentais relacionados à memória e aprendizado, notadamente após a exposição pré-natal ao etanol em roedores e em humanos (4). Há evidências mostrando que muitos dos efeitos do etanol no aprendizado e memória estão ligados a alterações da atividade celular no hipocampo e estruturas relacionadas (42).

Nós mostramos que filhotes expostos no período pré-natal ao etanol apresentaram alterações comportamentais como também neuroquímicas as quais foram adquiridas durante o desenvolvimento pré-natal. O perfil predominante dos efeitos em nível de sistema nervoso central são concernentes a drogas com efeitos depressores centrais semelhantes ao benzodiazepínicos, com ações sedativas e também ansiolíticas. Assim, um impressionante aumento no tempo de imobilidade, no teste de nado forçado, também revelaram o conhecido comportamento de desespero, característico da depressão. Este efeito pode ser uma conseqüência da suspensão da exposição ao álcool. Foi demonstrado que (22), a administração aguda de etanol em camundongos (2,0 ou 2,5g/kg) exibe um efeito antidepressor, e o consumo prolongado produz

tolerância para este efeito e a suspensão da exposição ao etanol (semelhante as nossas condições experimentais) provoca depressão.

Com relação às alterações neuroquímicas, nós também mostramos que o etanol causam efeitos opostos nos receptores dopaminérgicos e muscarínicos, diminuindo receptores D1 e D2, enquanto aumentam receptores muscarínicos. Os efeitos no sistema ajudam a explicar algumas das alterações comportamentais como as observadas no *rearing* e *grooming*. Por outro lado, o aumento significativo nos receptores muscarínicos pode indicar um distúrbio no equilíbrio que existe normalmente entre o sistema muscarínico e o sistema dopaminérgico central.

Nossos resultados podem ter implicações importantes para a compreensão das respostas comportamentais e neuroquímicas que ocorrem em animais expostos ao etanol.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Neste trabalho onde foi estudado os aspectos comportamentais como também as alterações neuroquímicas, onde nos propomos a avaliar o efeito da administração de etanol em ratas nos filhotes, em duas doses (0,5 e 4 g/Kg, via oral), antes da gestação e durante a gravidez, podemos tirar as seguintes conclusões:

- 1) Os resultados indicam, no teste do *plus maze*, de forma significativa e dose-dependente um aumento no número de entradas nos braços abertos e no tempo de permanência nos braços abertos, nos filhotes das ratas expostas ao etanol, em relação ao grupo controle, indicando efeito ansiolítico.
- 2) No teste do Campo Aberto, os filhotes apresentaram diminuição da atividade locomotora com diminuição da exploração do ambiente e diminuição também do *grooming* e *rearing*, demonstrando um efeito sedativo.
- 3) Os filhotes também apresentaram de forma dose-dependente aumento no tempo de imobilidade, no teste do nado forçado, caracterizando um comportamento depressivo.
- 4) Diminuição no hipocampo e corpo estriado dos receptores dopaminérgicos e aumento significativo nos receptores muscarínicos também nas duas regiões do cérebro dos filhotes de ratas expostas ao etanol.
- 5) Em resumo, concluímos que a exposição do útero gravídico ao etanol, produz efeitos fetais, como alterações nos Sistema Dopaminérgico e Colinérgico Cerebral que vão implicar em alterações comportamentais importantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

AGARWAL, D.; GOEDDE, H.W. Pharmacogenetics of alcohol metabolism and alcoholism. **Pharmacogenetics**, v. 2, p. 48-62, 1992.

AHERN, K.B.; LUSTIG, H.S.; GREENBERG, D.A. Enhancement of NMDA toxicity and calcium responses by chronic exposure of cultured cortical neurons to ethanol. **Neurosci.**, v. 165, p. 211-214, 1994.

ALMEIDA FILHO, N. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity – methodological features and prevalence estimates. **The British Journal of Psychiatry**, v. 171, p. 524-529, 1997.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Fetal alcohol syndrome and alcohol-related neurodevelopmental disorders. **Pediatrics**, v. 106(2), p. 358-361, 2000.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. **American Psychiatric Association**, Washington D. C., Fourth Edition, 1994.

ANTON, R.F.; BECKER, H.C. Pharmacotherapy and pathophysiology of alcohol withdrawal. In: Kranzler, H.R. (ed.). *The Pharmacology of Alcohol Abuse*. **Springer**, New York, p. 315-367, 1995.

ANTON, R.F.; KRANZLER, H.R.; MCEVOY, J.D. A double-blind comparison of abecarnil and diazepam in the treatment of uncomplicated alcohol withdrawal. **Psychopharmacol.**, v. 131, p. 123-129, 1997.

BABOR, T.F.; HOFMANN, M.; DEL BOCA, F.; HESSEL-BROCK, V.;
DOLINNSKY, Z.; ROUNSAVILLE, B. Types of alcoholics, 1. Evidence for an
empirically derived typology based on indicators of vulnerability and severity.
Archives of General Psychiatry, v. 49, p. 599-608, 1992.

BARR, C.L. ET AL. Further evidence from haplotype analysis for linkage of the
dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. **American
Journal of Medical Genetics** (Neuropsychiatric Genetics), v. 96, p. 262-267, 2000.

BAU, C.H.D.; SALZANO, F.M. Alcoholism in Brazil: the role of personality and
susceptibility to stress. **Addiction**, v. 90, p.693-698, 1995.

BAU, C.H.R.; ALMEIDA, S.; COSTA, F.T.; GARCIAS, C.E.D.; ELIAS, E.D.;
PONSO, A.C.; SPODE, A.; HUTZ, M. H. DRD4 and DAT1 as modifying genes in
alcoholism: interaction with novelty seeking on level of alcohol consumption.
Molecular Psychiatry., v. 6, p. 7-9, 2001a.

BAU, C. H. D.; SPODE, A.; PONSO, A. C.; ELIAS, E. P.; GARCIA, C. E. D.;
COSTA, F. T.; HUTZ, M. H. Heterogeneity in early onset alcoholism suggests a third
group of alcoholics. **Alcohol.**, 23:9-13. 2001b.

BAU, C.H.D.; ALMEIDA, S.; HUTZ, M.H. The Taq I A1 allele of the dopamine D2
receptor gene and alcoholism in Brazil: Association and interaction with stress and
harm avoidance on severity prediction. **American Journal or Medical Genetics**
(Neuropsychiatric Genetics), v. 96, p. 302-306, 2000.

BAU, C.H.D.; ROMAN, T.; ALMEIDA, S.; HUTZ, M.H. Dopamine D4 receptor gene
and personality dimensions in Brazilian male alcoholics. **Psychiatric Genetics**, v. 9,
p.139-143, 1999.

BEGLEITER, H.; PORJESZ, B.; BIHARI, B.; KISSIN, B. Event-related brain potentials in boys at risk for alcoholism. **Science**, v. 225, p.493-495, 1984.

BELLIVIER, F.; SZOKE, A.; HENRY, C.; LACOSTE, J.; BOTTOS, C.; NOSTEN-BERTRAND, M. Possible association between serotonin transporter gene polymorphism and violent suicidal behavior in mood disorders. **Biological Psychiatry**, v.15, p. 319-322, 2000.

BERRIDGE, V. Dependence: historical concepts and constructs. **The nature of drug dependence**, In G. Edwards & M. Lader (orgs.), Oxford University Press, Nova York, p. 1-18, 1990.

BESSION, J. Les nouveaux médicaments dans le traitement de l'alcoolisme. **Unité d'abus de substances du Département universitaire de psychiatrie adulte de Lausanne**, 1997.

BHAVE, S.V.; SNELL, L.D.; TABAKOFF, B.; GOFFMAN, P.I. Mechanism of ethanol inhibition of NMDA receptor function in primary cultures of cerebral cortical cell. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 20, p. 934-941, 1996.

BLEVINS, T.; MIRSHAHI, T.; WOODWARD, J.J. Increased agonist and antagonist sensitivity of N-methyl-D-aspartate stimulated calcium flux in cultured neurons following chronic ethanol exposure. **Neurosci Lett.**, v. 200, p. 214-518, 1995.

BLUM, K.; NOBLE, E. P.; SHERIDAN, P. J.; MONTGOMERY A.; RITCHIE, T.; JAGADEESWARAN, P.; NOGAMI, H.; BRIGGS, A. H.; COHN, J. B. Allelic association on human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. **Journal of the American Medical Association**, v. 263, p. 2055-2061, 1990.

BLUME, T.W.; GREEN, S.; JOANNING, H.; QUINN, W.S. Social role negotiation skills for substance-abusing adolescents: a group model. **J Subst Abuse Treat**, v. 11, p. 197-204, 1994.

BOHMAN, M. Some genetic aspects of alcoholism and criminality. **Archives of General Psychiatry**, v. 35:269-276. 1978.

BOLOS, A.M.; DEAN, M.; LUCAS-DERSE, S.; RAMSBURG, M.; BROWN, G.L.; GOLDMAN, D. Population and pedigree studies reveal a lack of association between the dopamine D2 receptor gene and alcoholism. **Journal of the American Medical Association**, v. 264, p.156-160, 1990.

BONGERS, I.M.; VAN OERS, H.A.; VAN DE GOOR, I.A.; GARRETSEN, H.F. Alcohol use and problem drinking: prevalences in the general Rotterdam population, **Subst Use Misuse**, v. 32, p.1491-512, 1997.

BROADBENT, J.; GRAHAME, N.J.; CUNNINGHAM, C.L. Haloperidol prevents ethanol-stimulated locomotor activity but fails to block sensitization. **Psychopharmacol**, v.120, p. 475-482, 1995.

CADORET, R.; GATH, A. Inheritance of alcoholism in adoptees. **The British Journal of Psychiatry**, v. 132, p. 252-258, 1978.

CARRARA, O.; OGER-JEANNIN, V.; DESECHALLIERS, J.P. Disorders of the hypothalamo-hypophyseal-ovarian axis in chronic alcoholic women. **Rev Med Interne**, v. 14, p. 9-13, 1993.

CHANG, G.; BEHR, H.; GOETZ, M.A. ET AL. Women and alcohol abuse in primary care. Identification and intervention. **Am J Addict**, v. 6, p. 183-192, 1997.

CLARK, K.; SOWERS, M.R. Alcohol dependence, smoking status, reproductive characteristics, and bone mineral density in premenopausal women. **Res Nurs Health**, v. 19, p. 399-408, 1996.

CLONINGER, C.R. Neurogenetic adaptative mechanisms in alcoholism. **Science**, v. 236, p. 410-416, 1987.

COHEN, C.; PERRAULT, G.H. & SANGER, D.J. _ Evidence for the involvement of dopamine receptors in ethanol-induced hyperactivity in mice _ **Neuropharmacol** 36: 1099-1108, 1997.

COMINGS, D.E. Why different rules are required for polygenic inheritance: Lessons from studies of the DRD2 gene. **Alcohol**, v. 16, p. 61-70, 1998.

COOK, C.C.H.; GURLING, H.M.D. Genetic factors in alcoholism. **The molecular pathology of alcoholism**. pp. 182-210. In TN Palmer (org.). Oxford University Press, Nova York. 1991.

Cook JD. Biochemical markers of alcohol use in pregnant woman. *Clin*

CRABBE, J.C. Antagonism of ethanol withdrawal convulsions in withdrawal seizure prone mice by diazepam and abecarnil. **Eur J Pharmacol** , v. 221, p. 85-90, 1992.

DALY, G.; HAWI, Z.; FITZGERALD, M.; GILL, M. Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. **Molecular Psychiatry**, v. 4, p.192-196, 1999.

DEVAUD, L.L.; FRITSCHY, J.M.; SIEGHART, W.; MORROW, A.L. Bidirectional alterations of GABA-A receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal . **J Neurochem**, v. 69, p. 126-129, 1997.

DEVAUD, L.L.; PURDY, R.H.; FINN, D.A.; MORROW, A.L. Sensitization of g-aminobutyric acidA receptors to neuroactive steroids in rats during ethanol withdrawal. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 278, p. 510-517, 1996.

DEVAUD, L.L.; SMITH, F.D.; GRAYSON, D.R.; MORROW, A.L. Chronic ethanol consumption differentially alters the expression of g-aminobutyric acidA receptor subunit mRNAs in rat cerebral cortex: competitive, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. **Mol Pharmacol** , v.48, p. 861-868, 1995b.

DU, L.; FALUDI, G.; PALKOVITS, M.; DEMETER, E.; BAKISH, D.; LAPIERRE, Y. D.; SÓTONYI, P.; HRDINA, P. D.M. Frequency of long allele in serotonin transporter gene is increased in depressed suicide victims. **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 196-201, 1999.

EDENBERG, H.J.; FOROUD, T.; KOLLER, D.L.; GOATE, A.; RICE, J.; VAN EERDEWEGH, P.; REICH, T.; CLONINGER, C.R.; NURNBERGER, J.I.; KOWALCZUK, M.; WU, B.; LI, T.K; CONNEALLY, P. M.; TISCHFIELD, J.A.; WU, W.; SHEARS, S.; CROUE, R.; HESSELBROCK, V.; SCHUCKIT, M.; PORJESZ, B.; BEGLEITER, H. A family-based analysis of the association of the dopamine D2 receptor (DRD2) with alcoholism. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, p. 505-512, 1998.

EDWARDS, G.; GROSS, M.M. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1.058-1.061, 1976.

EDWARDS, G.; GROSS, M.M.; KELLER, M.; MOSER, J. Alcohol-related problems in the disability perspective. **Journal of Studies on Alcohol**, v. 37, p.1.360-1.382, 1976.

EHLERS, C.L.; SCHUCKIT, M.A. Evaluation of EEG alpha activity in sons of alcoholics. **Neuropsychopharmacology**, v. 4, p. 199-206, 1991.

ERIKSSON, C.J.; FUKUNAGA, T.; SARKOLA, T.; LINDHOLM, H.; AHOLA, L. Estrogen-related acetaldehyde elevation in women during alcohol intoxication . **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20 (7), p. 1192-1195, 1996.

FELSON, D.T.; ZHANG, Y.; HANNAN, M.T.; KANNEL, W.B.; KIEL, D.P. Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. The Framingham Study. **Am J Epidemiol**, v. 142 (5), p. 485-492, 1995.

FRANKE, P.; NOTHEN, M.M.; WANG, T.; KNAPP, M.; LICHTERMANN, D.; NEIDT, H.; SANDER, T.; PROPPING, P.;MAIER, W. DRD4 exon III VNTR polymorphism-susceptibility factor for heroin dependence? Results of a case-control and a family-based association approach. **Molecular Psychiatry**, v. 5, p. 101-104, 2000.

FREUND, G.; ANDERSON, K.J. Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20, p. 1165-1172, 1996.

FRIEDMAN, L.M.; KECK JR., P.E.; BIANCA, R. ET AL. A prospective, double-blind, randomized, cross-over, outpatient study to evaluate and compare the subjective effects of placebo, abecarnil, and diazepam in volunteer adults with a history of recreational sedative drug use. NCDEU Meeting, Marco Island, Fla, 1993.

GADE, R.; MUHLEMAN, D.; BLAKE, H.; MACMURRAY, J.; JOHNSON, P.; VERDE, R.; SAUCIER, G.; COMINGS, D.E. Correlation of length of VNTR alleles

at the X-linked MAOA gene and phenotypic effect in Tourette Syndrome and drug abuse. **Molecular Psychiatry**, v. 3, p. 50-60, 1998.

GAVALER, J.S. Alcohol effects on hormone levels in normal postmenopausal women and in postmenopausal women with alcohol-induced cirrhosis. **Recent Dev Alcohol**, v. 12, p. 199-208, 1995.

GELERNTER, J.; KRANZLER, H.; COCCARO, E.; SIEVER, L.; NEW, A.; MULGREW, C.L. D4 Dopamine-Receptor (DRD4) alleles and Novelty Seeking in substance-dependent, personality-disorder, and control subjects. **American Journal of Human Genetics**, v. 61, p. 1.144-1.152, 1997.

GINSBURG, E.S.; MELLO, N.K.; MENDELSON, J.H. ET AL. Effects of alcohol ingestion on estrogens in postmenopausal women . **JAMA**, v. 276 (21), p. 1747-51, 1996.

GOLDMAN, D.; BERGEN A. General and specific inheritance of substance abuse and alcoholism. **Archives of General Psychiatry**, v. 55, p. 964-965, 1998.

GOLDMAN, D.; URBANEK, R.; GUENTHER, D.; ROBIN, R.; LONG, J.C. Linkage and association of a functional DRD2 variant [Ser311Cys] and DRD2 markers to alcoholism, substance abuse and schizophrenia in southwestern American Indians. **American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)**, v. 74, p. 386-394, 1997.

GONZALES, R.A.; HOFFMAN, P.L. Receptor-gated ion channels may be selective CNS targets for ethanol. **Trends Pharmacol Sci**, v. 12, p. 1-3, 1991.

GOODWIN, D.W.; SCHULSINGER, F.; HERMANSEN, L.; GUZE, S.B.; WINOKUR, G. Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. **Archives of General Psychiatry**, v. 28, p. 238-243, 1973.

GRANT, K.A.; HOFFMAN, P.L.; TABAKOFF, B. Neurobiologic and behavioral approaches to tolerance and dependence, pp. 135-139. In G Edwards & M Lader (orgs.). *The nature of drug dependence*. Oxford University, Nova York, 1990.

GRANT, B.F. Prevalence and correlates of alcohol use and DSM-IV alcohol dependence in the United States: results of the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey . **J Stud Alcohol**, v. 58 (5), p. 464-73, 1997.

GRANT, E.R.; BACSKAI, B.J.; PLEASURE, D.E., PRITCHETT, D.B.; GALLAGHER, M.J.; KENDRICK, S.J.; KRICKA, L.J.; LYNCH, D.R. N-methyl-D-aspartate receptors expressed in a nonneuronal cell line mediate subunit-specific increases in free intracellular calcium . **J Biol Chem**, v. 272, p. 647-656, 1997.

GRANT, K.A. Emerging neurochemical concepts in the actions of ethanol at ligand-gated ion channels. **Behav Pharmacol**, v. 5, p. 383-404, 1994.

GRIFFIN, M.L.; MENDELSON, J.H.; MELLO, N.K.; LEX, B.W. Marijuana use across the menstrual cycle. **Drug Alcohol Depend**, v. 18, p. 213-224, 1986.

GROOTE-VELDMAN, R.; MEINDERS, A.E. On the mechanism of alcohol-induced pseudo-Cushing's syndrome. **Endocr Rev**, v. 17 (3), p. 262-8, 1996.

GRUOL, D.L.; PARSONS, J.G.; NETZEBAND, J.G. Calcium signals pathways linked to glutamate receptor activation in the somatic and dendritic regions of cultured cerebellar Purkinje neurons . **J Neurophysiol**, v. 76, p. 3325-3340, 1996.

H.; KAAS-CLAESSON, N.; GLUUDM, C. Menstrual disturbances and fertility in chronic alcoholic women. **Drug Alcohol Depend**, v. 24 (1), p. 75-82, 1989.

HALBREICH, U.; PALTER, S. Accelerated osteoporosis in psychiatric patients: possible pathophysiological processes. **Schizophr Bull**, v. 22 (3), p. 447-54, 1996.

HARADA, S.; OKUBO, T.; TSUTSUMI, M.; TAKASE, S.; MURAMATSU, T. A new genetic variant in the Sp1 binding Cis-element of Cholecystokinin gene promoter region and relationship to alcoholism. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, p. 93S-96S, 1998.

HARTLEY, D.M.; KURTH, M.C.; BJERKNES, L.; WEISS, J.H.; CHOI, D.W. Glutamate receptor-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. **J Neurosci**, v. 13, p. 1993-2000, 1993.

HAUSER, J.; RYBAKOWSKI, J. Three clusters of male alcoholics. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 48, p. 243-250, 1997.

HEMMINGSSON, T.; LUNDBERG, I.; ROMELSJÖ, A.; ALFREDSSON, L. Alcoholism in social classes and occupations in Sweden. **International Journal of Epidemiology**, v. 26, p. 584-591, 1997.

HESSELBROCK, M.N.; MEYER, R.E.; KEENER, J.J. Psychopathology in hospitalized alcoholics. **Arch Gen Psychiatry**, v. 42, p. 1050-55, 1985.

HILL, S.Y.; ZEZZA, N.; WIPPRECHT, G.; XU, J.; NEISWANER, K. Linkage studies of D2 and D4 receptor genes and alcoholism. **American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)**, v. 88, p.676-685, 1999.

HOCHGRAF, P.B.; ZILBERMAN, M.L.; ANDRADE, A.G. Women alcoholics - social, demographic and clinical characteristics in a Brazilian sample. **Alcohol and Alcoholism**, v. 30 (4), p.427-432, 1995.

HOEHE, M.R.; KOPKE, K.; WENDEL, B.; ROHDE, K.; FLACHMEIER, C.; KIDD, K.K; BERRETTINI, W.H.; CHURCH, G.M. Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of μ opioid receptor gene variation with substance dependence. **Human Molecular Genetics**, v. 9, p. 2.895-2.908, 2000.

HOFFMAN, P.L.; IORIO, K.R.; SNELL, L.D.; TABAKOFF, B. Attenuation of glutamate-induced neurotoxicity in chronically ethanol-exposed cerebellar granule cells by NMDA receptor antagonists and ganglioside GM1. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 19, p. 721-726, 1995.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu Ver Neurosci**, v. 17, p. 31-108, 1994.

HWU, H.G.; CHEN, C.H. Association of 5HT2A receptor gene polymorphism and alcohol abuse with behavior problems. **American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)**, v. 96, p. 797-800, 2000.

JAFFE, J.H.; CIRAULO, D.A.; NIES, A.; DIXON, R.B.; MONROE, L.L. Abuse potential of halazepam and of diazepam in patients recently treated for acute alcohol withdrawal. **Clin Pharmacol Ther**, v. 34, p. 623-630, 1983.

JELLINEK, E.M. Alcoholism, a genus and some of its species. **Canadian Medical Association Journal**, v. 83, p. 1.341-1.345, 1960.

JOFFE, A.H. Alcohol and social complexity in ancient Western Asia. **Current Anthropology**, v. 39, p. 297-322, 1998

KANDEL, D.; CHEN, K.; WARNER, L.A. ET AL. Prevalence and demographic correlates of symptoms of last year dependence on alcohol, nicotine, marijuana and cocaine in the U.S. population. **Drug Alcohol Depend**, v. 44 (1), p. 11-29, 1997.

KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J.; GREBB, J.A.A. 1994. *Synopsis of psychiatry* (7^a ed.). Williams & Wilkins, Baltimore, 1257pp.

KENDLER, K.S.; HEATH, A.C.; NEALE, M.C.; KESSLER, R.C.; EAVES, L.J. A population-based twin study of alcoholism in women. **Journal of the American Medical Association**, v. 268, p. 1.877-1.882, 1992.

KENDLER, K.S.; NEALE, M.C.; HEATH, A.C.; KESSLER, R.C.; EAVES, L.J. A twin-family study of alcoholism in women. **American Journal of Psychiatry**, v. 151, p.707-715,1994.

KOLTCHINE, V.V.; ANANTHARAM, V.; BAYLEY, H.; TREISTMAN, S.N. Alternative splicing of the NMDAR1 subunit affects modulation by calcium. **Mol. Brain Re.**, v. 39, p. 99-108, 1996.

KOOB, G.F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 13, p. 177-184, 1992a.

KOTLER M ET AL. Excess dopamine D4 receptor (D4DR) exon III seven repeat allele in opioid-dependent subjects. **Molecular Psychiatry**, v. 2, p.251-254, 1997.

KUBICKA, L.; CSEMY, L.; KOZENY, J.; NESPOR, K. The substance specificity of psychosocial correlates of alcohol, tobacco, coffee and drug use by Czech women. **Addiction**, v. 88 (6), p. 813-20, 1993.

KUNER, T.; SCHOEPFER, R. Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg²⁺ block in NMDA receptor channels. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 3549-3558, 1996.

LAITINEN, K.; KARKKAINEN, M.; LALLA, M.; LAMBERG-ALLARDT, C.; TUNNINEM, R.; TAHTELA, R.; VALIMAKI, M. Is alcohol an osteoporosis-inducing agent for young and middle-aged women? **Metabolism**, v. 42, (7), p. 875-881, 1993.

LAITINEN, K.; LAMBERG-ALLARDT, C.; TUNNINEN, R.; ET AL. Transient hypoparathyroidism during acute alcohol intoxication. **N. Engl. J. Med.**, v. 324 (11), p. 721-727, 1991.

LARSSON, B.; SVÄRDSUDD, K.; WELLIN, L.; ET AL. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow-up of participants in the study of men born in 1913. **Br. M. J.**, v. 288, p. 1401-1404, 1984.

LAWFORD, B.R.; YOUNG, R.M.; ROWELL, J.A.; QUALICHEFSKI, J.; FLETCHER, B.H.; SYNDULKO, K.; RITCHIE, T.; NOBLE, E. P. Bromocriptine in the treatment of alcoholics with the D2 dopamine receptor A1 allele. **Nature Medicine**, v. 1, p. 337-341, 1995.

LESLIE, S.W.; BROWN, L.M.; DILDY, M.J.E.; SIMS, J.S. Ethanol and neuronal calcium channels. **Alcohol**, v. 7, p. 233-236, 1990.

LEX, B.W.; GRIFFIN, M.L.; MELLO, N.K.; MENDELSON, J.H. Alcohol, marijuana, and mood states in young women. **Int. J. Addict**, v. 24 (5), p. 405-24, 1989.

LIU, W.; GU, N.; FENG, G.; LI, S.; BAI, S.; ZHANG, J.; SHEN, T.; XUE, H.; BREEN, G. Tentative association of the serotonin transporter with schizophrenia and unipolar depression but not with bipolar disorder in Han Chinese. **Pharmacogenetics**, v. 9, p. 491-495, 1999.

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

LÜDDENS, H.; SEEBURG, P.H.; KORPI, E.R. Impact of b and g variants on ligand-binding properties of g-aminobutyric acid type A receptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 45, p. 810-814, 1994.

MARTIN, G.L.; BRIERA, F.A.; CALVO, P. Effects of chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal on [3H]SCH23390 binding to rat striatal membranes. **Neuropharmacol.**, v. 36, p. 101-106, 1997.

MAYER, M.; WESTBROOK, G. Permeation and block of NMDA receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. **J. Physiol. (Lond)**, v. 394, p. 501-527, 1987.

MCGUE, M.; PICKENS, R.W.; SVIKIS, D.S. Sex and age effects on the inheritance of alcohol problems: a twin study. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 101, p. 3-17, 1992.

MCKINNEY, E.F.; ET AL. Association between polymorphisms in dopamine metabolic enzymes and tobacco consumption in smokers. **Pharmacogenetics**, v. 10, p. 483-491, 2000.

MCLEOD, D.R.; FOSTER, G.V.; HOEHN-SARIC, R.; SVIKIS, D.S.; HIPSLEY, P.A.; Family history of alcoholism in women with generalized anxiety disorder who

have premenstrual syndrome: patient reports of premenstrual alcohol consumption and symptoms of anxiety. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 18 (3), p. 664-670, 1994.

MELLO, N.K.; MENDELSON, J.H.; TEOH, S.K. Neuroendocrine consequences of alcohol abuse in women. **Ann NY Acad Sci**, v. 562, p. 211-40, 1989.

MELLO, N.K.; MENDELSON, J.H.; DRIEZE, J.; KELLY, M. Effects of alcohol on E2 beta-stimulated luteinizing hormone in ovariectomized rhesus monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v. 7 (4), p. 305-16, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 1987. **Programa nacional de controle dos problemas relacionados com o consumo do álcool. PRONAL**. Ministério da Saúde, Brasília.

MOHLER, H.; FRITSCHY, J.M.; BENKE, D. ET AL. GABAA receptor subtypes: pharmacological significance and mutation analyses in vivo. In: Tanaka, C. & Bowery, N.G. (eds.) _ GABA: Receptors, Transporters and Metabolis. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 151-171, 1996.

MOREAU, R.L.M. Fármacos e drogas que causam dependência. In: Oga, S. (ed.). Fundamentos de Toxicologia . **Atheneu Editora**, São Paulo, pp. 230-240, 1996.

MOREY, L.C.; SKINNER, H.A.; BLASHFIELD, R.K. A typology of alcohol abusers: Correlates and implications. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 93, p. 408-417, 1984.

MORROW, A.L. Regulation of GABAA receptor function and gene expression in the central nervous system. In: Bradley, R.J. & Harris, R.A. (eds.). **International Review of Neurobiology**, v. 38, p. 1-41, 1995.

MUMFORD, G.K.; RUSH, C.R.; GRIFFITHS, R.R. Abecarnil and alprazolam in humans: behavioral, subjective and reinforcing effects. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 272, p. 570-580, 1995.

NEVE, R.J.; DROP, M.J.; LEMMENS, P.H.; SWINKELS, H. Gender differences in drinking behaviour in the Netherlands: convergence or stability? *Addiction*, v. 91 (3), p. 357-73, 1996.

NIELSEN DA ET AL.. A tryptophan hydroxylase gene marker for suicidality and alcoholism. *Archives of General Psychiatry*, v. 55, p. 593-602, 1998.

NOBLE, E.P. The D2 dopamine Receptor gene: a review of association studies in alcoholism and phenotypes. *Alcohol*, v. 16, p. 33-45, 1998.

NOBLE, E.P.; BLUM, K.; RITCHIE, T.; MONTGOMERY, A.; SHERIDAN, P.J. Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with receptor-binding characteristics in alcoholism. *Archives of General Psychiatry*, v. 48, p. 648-654, 1991.

NOBLE, E.P.; ZHANG, X.; RITCHIE, T.L.; SPARKES, R.S. Haplotypes at the DRD2 locus and severe alcoholism. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*, v. 96, p. 622-631, 2000.

OHLSSON, L.O.; LARSSON, B.; SVÄRDSUDD, K. ET AL. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 year follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*, v. 34, p. 1055-1058, 1985.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10. *Artes Médicas*, Porto Alegre, 351pp, 1993.

OZAWA, M.; NAKADA, Y.; SUGIMACHI, K. ET AL. Pharmacological characterization of the novel anxiolytic beta-carboline abecarnil in rodents and primates. *J Pharmacol*, v. 64, p. 179-187, 1994a.

PESSOTTI, I. Deficiência mental: da superstição à ciência. TA Queiroz, São Paulo. 206 pp, 1984.

PETTERSSON, P.; ELLSINGER, B.M.; SJOBERG, C.; BJORNTORP, P. Fat distribution and steroid hormones in women with alcohol abuse. *J Intern Med*, v. 228 (4), p. 311-316, 1990.

PICKENS RW ET AL. Heterogeneity in the inheritance of alcoholism. A study of male and female twins. *Archives of General Psychiatry*, v. 48, p.19-28, 1991.

POHJALAINEN T ET AL. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Molecular Psychiatry*, v. 3,p.256-260,1998.

PRESCOTT, C.A.; KENDLER, K.S. Genetic and environmental contributions to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of male twins. *American Journal of Psychiatry*, v. 156, p. 34-40, 1999.

PRESCOTT, C.A.; AGGEN, S.H.; KENDLER, K.S. Sex differences in the sources of genetic liability to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of U.S. twins. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 23, p. 1.136-1.144, 1999.

PROJECT MATCH RESEARCH GROUP. Matching alcoholism treatments to client heterogeneity: Project MATCH posttreatment drinking outcomes. **Journal of Studies on Alcohol**, v. 58, p. 7-29, 1997.

REBUFFÉ-SCRIVE, M.; LUNDHOLM, K.; BJÖRNTORP, P. Glucocorticoid hormone binding to human adipose tissue. **Eur J Clin Invest**, v. 15, p. 267-271, 1985.

ROBINSON, A.; LINDEN, M.G. Clinical Genetics Handbook. Blackwell, Boston, 614pp, 1993.

ROMAN, T.; BAU, C.H.D.; ALMEIDA, S.; HUTZ, M.H. Lack of association of the Dopamine D4 receptor gene with alcoholism in a Brazilian population. **Addiction Biology**, v. 4, p. 203-208, 1999.

ROMAN, P.M. Biological features of women's alcohol use: a review. **Public Health Rep**, v. 103 (6), p. 628-37, 1988.

ROSS, H.E.; GLASER, F.B.; STIASNY, S. Sex differences in the prevalence of psychiatric disorders in patients with alcohol and drug problems. **Brit J Addiction**, v. 83, p. 1179-92, 1988.

ROSS, R.K.; BERNSTEIN, L.; TRENT, L. ET AL. A prospective study of risk factors for traumatic deaths in a retirement community. **Prev Med**, v. 19 (3), p. 323-334, 1990.

SAMPSON, P.D. Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. **Teratology**, v. 56, p. 317-326, 1997.

SAMSON, H.H.; HARRIS, R.A. Neurobiology of alcohol abuse. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, p. 206-211, 1992.

SANDER, T ET AL. Association analysis of a regulatory variation of the Serotonin transporter gene with severe alcohol dependence. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 21, p. 1.356-1.359, 1997.

SANNA, E.; SERRA, M.; COSSU, A. ET AL. Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABAA and NMDA receptorfunction in the rat brain. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 17, p. 115-123, 1993.

SANTOS, B.R. ET AL. Alcohol flushing, patch test, and ADH and ALDH genotypes in Brazilian ethnic groups. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 513-518, 1995.

SCHAEFER, G.B.; BODENSTEINER, J.B. Evaluation of the child with idiopathic mental retardation. **Ped Clin North Am**, v. 39(4), p. 929-43, 1992.

SCHUCKIT, M.A. Reactions to alcohol in sons of alcoholics and controls. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 12, p. 465-470, 1988.

SCHUCKIT, M.A. Abuso de álcool e drogas. **Artes Médicas**, Porto Alegre, p. 356, 1991.

SCHUCKIT, M.A ET AL. Selective genotyping for the role of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, and GABA_A receptors and serotonin transporter in the level of response to alcohol: a pilot study. **Biological Psychiatry**, v. 45, p. 647-651, 1999.

SCHUCKIT, M.A.; GOLD, E.; RISCH, C. Serum prolactin levels in sons of alcoholics and control subjects. *American Journal of Psychiatry*, v. 144, p. 854-859, 1987a.

SCHUCKIT, M.A.; GOLD, E.; RISCH, C. Plasma cortisol levels following ethanol in sons of alcoholics and controls. **Archives of General Psychiatry**, v. 44, p. 942-945, 1987b.

SCHUCKIT, M.A.; GOLD, E.O.; CROOT, K.; FINN, P.; POLICH, J. P 300 latency after ethanol ingestion in sons of alcoholics and controls. *Biological Psychiatry* , v. 24, p. 310-315, 1988a.

SCHUCKIT, M.A.; RISCH, C.; GOLD, E. Alcohol consumption, ACTH level, and family history of alcoholism. **American Journal of Psychiatry**, v. 145, p. 1.391-1.395, 1988b.

SHIELDS PG ET AL. Dopamine D4 receptors and the risk of cigarette smoking in African-Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiology and Biomarkers*, v. 7, p. 453-458, 1998.

SIEGHART, W. Structure and pharmacology of g-aminobutyric acidA receptor subtypes. **Pharmacol Rev**, v. 47, p. 182-234, 1995.

SMALS, A.G.; KLOPPENBORG, P.W.; NJO, K.T. Alcohol induced Cushingoid syndrome. **Br Med J**, v. 2, p. 1928, 1976.

SMERALDI, E. ET AL. Polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine. **Molecular Psychiatry**, v. 3, p. 508-511, 1998.

SMITH, G.B.; OLSEN, R.W. Functional domains of GABAA receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v. 16, p. 162-168, 1995.

SMITH-WARNER, S.A.; SPIEGELMAN, D.; YAUN, S.S. ET AL. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. **JAMA**, v. 279 (7), p. 535-40, 1998.

SMOTHERS, T.C.; MROTEK, J.J.; LOVINGER, D.M. Chronic ethanol exposure leads to a selective enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor function in cultured hippocampal neurons. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 283, p. 1214-1222, 1997.

STEELE, R.G.; FOREHAND, R.; ARMISTEAD, L.; BRODY, G. Predicting alcohol and drug use in early adulthood: the role of internalizing and externalizing behavior problems in early adolescence. **Am J Orthopsychiatry**, v. 65 (3), p. 380-8, 1995.

STEPHENS, D.N.; SCHNEIDER, H.H.; KEHR, W. ET AL. Abecarnil, a metabolically stable, anxiolytic beta-carboline acting at benzodiazepine receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 253, p. 334-343, 1990.

STROBEL, A.; WEHR, A.; MICHEL, A.; BROCKE, B. Association between the dopamine D4 receptor (DRD4) exon III polymorphism and measures of novelty seeking in a German population. **Molecular Psychiatry**, v. 4, p. 378-384, 1999.

SUZUKI, K.; UCHIDA, A.; MIZOI, Y.; FUKUNAGA, T. A study on ADH2 and ALDH2 genotyping by PCR-RFLP and SSCP analyses with description of allele and genotype frequencies in Japanese, Finn, and Lapp populations. **Alcohol and Alcoholism**, v. 29, p. 21-27, 1994.

TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. Biochemical pharmacology of ethanol. In: Meltzer, H.Y. (ed.) Psychopharmacology. The Third Generation of Progress. Raven Press, New York, pp. 1521-1526, 1987.

TATE, D.L.; CHARETTE, L. Personality, alcohol consumption, and menstrual distress in young women. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 15 (4), p. 647-52, 1991.

TEOH, S.K.; LEX, B.W.; MENDELSON, J.H. ET AL. Hyperprolactinemia and macrocytosis in women with alcohol and polysubstance dependence. **J Stud Alcohol**, v. 53 (2), p. 176-82, 1992.

THACKRA, Y. H.; TIFFT, C. Fetal alcohol syndrome. **Pediatr Rev**, v. 22, p. 47-55, 2001.

THACKRAY, H.M.; TIFFT, C. Fetal alcohol syndrome. **Ped Rev**, v. 22(2), p. 47-54, 2001.

TRUE WR ET AL. Common genetic vulnerability for nicotine and alcohol dependence in men. **Archives of General Psychiatry**, v. 56, p. 655-661, 1999.

TURKER, T. ET AL. High ethanol tolerance in young adults is associated with the low-activity variant of the promoter of the human serotonin transporter gene. **Neuroscience Letters**, v. 248, p. 147-150, 1998.

TYMIANSKI, M.; CHARLTON, M.P.; CARLEN, P.L.; TATOR, C.H. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. **J Neurosci**, v. 13, p. 2085-2104, 1993.

um signals elicited by glutamate receptor agonists and K⁺ depolarization in cultured cerebellar purkinje neurons **Brain Res 773**: 82-89, 1997.

VALIMAKI, M.; PELKONEN, R.; HARKONEN, M. ET AL. Pituitary-gonadal hormones and adrenal androgens in non-cirrhotic female alcoholics after cessation of alcohol intake. **Eur J Clin Invest**, v. 20 (2), p. 177-81, 1990.

VALIMAKI, M.J.; LAITINEN, K.; TIITINEN, A. ET AL. Gonadal function and morphology in non-cirrhotic female alcoholics: a controlled study with hormone measurements and ultrasonography. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 74 (6), p. 462-6, 1995.

VALLE, B.L. Alcohol in the western world. **Scientific American**, v. 278, p. 62-67, 1998.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. *Human genetics, problems and approaches* (3^a ed.). Springer-Verlag, Heidelberg, 684 pp, 1997.

WALDMAN, I.D. ET AL. Association and linkage of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity. **American Journal of Human Genetics**, v. 63, p. 1.767-1.776, 1998.

WILCOX, L.A.; YATES, W.R. Gender and psychiatric comorbidity in substance-abusing individuals. **Am J Addictions**, v. 2 (3), p. 202-6, 1993.

WOJNAR, M.; WASILEWSKI, D.; MATSUMOTO, H.; CEDRO, A. Differences in the course of alcohol withdrawal in women and men: a Polish sample. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 21 (8), p. 1351-5, 1997.

YARNOLD, B.M. Use in 1992 of amphetamines among Miami's public school students. **Psychol Rep**, v. 81(2), p. 411-7, 1997.

ZUCKER, R.A.; ELLIS, D.A.; BINGHAM, C.R.; FITZGERALD, H.E. The development of alcoholic subtypes. Risk variation among alcoholic families during the early childhood years. **Alcohol Health and Research World**, v. 20, p. 46-54, 1996.

CHEN, W. J.; MAIER, S. E.; PARNELL, S. E.; WEST, J. R. Alcohol and the developing brain: neuroanatomical studies. **Alcohol Res. Health**, v. 27, p. 174-180, 2003.

RILEY, E. P.; MCGEE, C. L.; SOWELL, E. R. Teratogenic effects of alcohol: a decade of brain imaging. **Am. J. Med. Genet**, v. 127C, p. 35-41, 2004.

HAMILTON, D. A.; KODITUWAKKU, P.; SUTHERLAND, R. J.; SAVAGE, D. D.; Children with Fetal Alcohol Syndrome are impaired at place learning but not cued-navigation in a virtual Morris water task. **Behav. Brain Res.**, v. 143, p. 85 – 94, 2003.

MASTERS, S. B. The alcohols, in: B.G. Katzung (Ed.), Basic and Clinical Pharmacology, 8th edition, Lange Medical Books, New york, USA, 2001, pp. 382 – 392.

GUERRI, C. Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. **Neurotox. Res.**, v. 4, p. 327 – 335, 2002.

TRAN, T. D.; KELLY, S. J. Critical periods for ethanol-induced cell loss in the hippocampal formation. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 25, p. 519 – 528, 2003.

FERREIRA, V. M.; VALENZUELA, C. F.; MORATO, G. S. Role of nitric oxide-dependent pathways in ethanol-induced anxiolytic effects in rats. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 23, p. 1898 – 1904, 1999.

GILMAN, A. G. Transmembrane signaling, G proteins, and adenylyl cyclase. **Harvey Lect.**, v. 85, p. 153 – 172, 1989.

EISON, A. S.; EISON, M. S. Serotonergic mechanisms in anxiety. **Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatric**, v. 18, p. 47 – 62, 1994.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; ANDRADE, T. G.; DEAKIN J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 54, p. 129 – 141, 1996.

SHEN, R. Y.; CHIODO, L. A. The effects of in utero ethanol administration on the electrophysiological activity of rat nigostriatal dopaminergic neurons. **Brain Res.**, v. 624, p. 216 – 222, 1993.

R. Y. Shen, J. H. Hannigan, G. Kapatos, Prenatal alcohol reduces the activity of adult mid brain dopamine neurons, **Alcohol Clin. Exp. Res.** 23 (1999) 1801 – 1807.