



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

ANA LUIZA DE AGUIAR ROCHA MARTIN

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS INDUZIDOS PELO
ETANOL EM CAMUNDONGOS E SUAS RELAÇÕES COM O SISTEMA
COLINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO**

**FORTALEZA-CE
2011**

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

-
- M334e Martin, Ana Luiza de Aguiar Rocha.
Efeitos comportamentais e neuroquímicos induzidos pelo etanol em camundongos e suas relações com o sistema colinérgico e dopaminérgico. / Ana Luiza de Aguiar Rocha Martin. – 2011.
76 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Centro, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2011.
Área de Concentração: Neurofarmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos.
1. Haloperidol. 2. Atropina. 3. Dopamina. 4. Acetilcolina. 5. Corpo Estriado. I. Título.

CDD 615.1

ANA LUIZA DE AGUIAR ROCHA MARTIN

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS INDUZIDOS PELO
ETANOL EM CAMUNDONGOS E SUAS RELAÇÕES COM O SISTEMA
COLINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a):

Prof^ª. Dra. Silvânia Maria Mendes
Vasconcelos

**FORTALEZA – CE
2011**

ANA LUIZA DE AGUIAR ROCHA MARTIIN

Dissertação de Mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 29 de novembro de 2011.

Profa. Dra. Silvania Maria Mendes Vasconcelos Patrocínio
Universidade Federal do Ceará – UFC
(Orientadora)

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Paula Matias Soares
Universidade Estadual do Ceará – UECE

*Aos meus pais, Mário Martin (in memoriam) e Ana Helena
Martin por serem meu exemplo de vida e família, força e
superação, pelo amor e carinho que sempre me foram dedicados
e pelo inesgotável apoio em meus projetos profissionais e intelectuais
Às minhas irmãs, pela constante torcida e
momentos de alegria proporcionados;
Ao amor da minha vida Pablo pelo amor, companheirismo constante,
dedicação intensa e incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional .*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir a minha evolução, sempre me concedendo força para superar os momentos difíceis e por me guiar como sua misericórdia em busca de me tornar sempre um ser humano melhor.

À Profa. Dra. **Silvânia Maria Mendes Vasconcelos** pelos ensinamentos concedidos neste período, por sua amizade, paciência e compreensão no momento mais difícil e delicado da minha vida e inclusive por suas repreensões sempre necessárias não me deixando desistir e contribuindo para o meu aprimoramento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. **Lissiana Aguiar**, pela colaboração neste trabalho e pela co-orientação.

À Profa. Dra. **Glauce Socorro de Barros Viana**, exemplo de pesquisadora a quem dispensei uma enorme admiração e agradeço por ter intermediado o intercâmbio com o Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina durante um mês onde tive a oportunidade de aprender novas ferramentas de pesquisa.

À Profa. Dra. **Teresa Lima por e os seus alunos Marcelo, Alexandre e Ana Paula e Gilliard**, por terem me recebido com muito carinho em seu Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina e por ter proporcionado o aumento do meu leque de possibilidades no aprendizado de neurofarmacologia, deixando o laboratório à disposição para posteriores parcerias.

À Profa. Dra. **Danielle Silveira Macedo**, pesquisadora do Laboratório de Neurofarmacologia, por ser sempre tão agradável e disposta a ensinar e contribuir para o aprimoramento dos nossos trabalhos.

À Profa. Dra. **Nylane Maria Nunes de Alencar**, por ter gentilmente aceito o convite para participar da Banca Examinadora desta dissertação e contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

À Profa. Dra. **Paula Matias Soares**, pela ajuda sempre concedida nos momentos em que precisei e por contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

Ao meu pai **Mário**, que infelizmente não está presente fisicamente neste momento, por desde pequena me incentivar a leitura e aguçar minha curiosidade, que segundo ele era a chave para o conhecimento e pelo orgulho sentido quando eu passei na seleção do mestrado.

Ao meu marido **Pablo Farias**, por estar constantemente ao meu lado, inclusive nas inúmeras madrugadas que passamos acordados na confecção desta dissertação, por me ajudar e incentivar com seu grande potencial intelectual e por dispensar carinho e dedicação ao nosso grande amor.

À amiga e colega de laboratório **Elaine Lucetti**, pela intensa amizade e companheirismo me dedicados quando ocorria algum momento de dúvida e certamente contribuir positivamente para este trabalho.

Aos amigos do laboratório de neurofarmacologia, **Eduardo, Sarah, Edna, Clayton, Márcia, Eliane, Taciana e a todos os alunos de iniciação científica**, pela amizade e cooperação na realização dos experimentos que seria impossível serem realizados sem esse apoio.

Aos técnicos do Laboratório de Neurofarmacologia, **Vilani Rodrigues Bastos**, pela ajuda oferecida quanto ao trato dos animais e **Arnaldo Bastos Viana** pela realização das análises neuroquímicas.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial à **Aura Rhanes, Márcia, Alana e Ana Paula** que nos recebem diariamente e tiram nossas dúvidas quando necessário.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

O etanol tem influência sobre diversos sistemas de neurotransmissores. Vários estudos têm relatado a interação entre a via dopaminérgica e colinérgica e a interação delas isoladamente com os efeitos do etanol. O bloqueador colinérgico atropina, que é um alcalóide muito utilizado no caso de intoxicações colinérgica e comprometimento cardíaco e o haloperidol, é neuroléptico, antagonista das vias dopaminérgicas, principalmente pelo bloqueio do receptor D2, utilizado no tratamento da esquizofrenia, tanto na fase aguda como crônica, psicoses e episódios maníacos psicóticos são fármacos utilizados para o estudo desses sistemas. Este trabalho objetivou estudar os efeitos comportamentais e neuroquímicas produzidos em corpo estriado induzidos pelo tratamento subcrônico com etanol na presença e ausência de atropina ou haloperidol. Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, com peso variando entre 25 – 30g. Os animais foram tratados com água destilada (controle), etanol (1 ou 3g/kg, v.o) ou pré tratados com haloperidol (0,5mg/kg, i.p) ou atropina (0,5mg/kg, i.p), essa aplicação foi feita trinta minutos antes da administração do etanol ou água destilada diariamente durante sete dias. Trinta minutos após a última administração das drogas por via intraperitoneal ou sessenta minutos após a última administração por via oral, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto e *rota rod* (atividade locomotora), placa perfurada e plus maze (atividade de ansiedade) e, posteriormente, sacrificados com dissecação do corpo estriado para determinação dos níveis de monoaminas (norepinefrina, dopamina e seu metabólico ácido 3, 4-dihidroxifenilacético) e a atividade da acetilcolinesterase. O etanol apresentou efeito estimulante na menor dose e depressor na maior dose, principalmente nos testes de atividade locomotora. Quando associado à maior dose, o haloperidol apresentou, na maioria das vezes o efeito potencializador do etanol, já a atropina apenas em alguns testes mostrou uma tendência de reversão desse efeito apenas associado ao etanol na menor dose, embora não observado em todos os parâmetros avaliados. Além disso, o efeito produziu um discreto aumento nos níveis de dopamina no corpo estriado, porém quando associado aos bloqueadores, houve redução desses níveis, sendo mais acentuada quando essa associação foi feita com o etanol na maior dose. Na avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase, todas as substâncias utilizadas associadas ou não, provocaram a redução de mais de 60% na atividade desta enzima, sendo mais evidente na administração isolada de atropina, ou seja, as administrações que apresentaram redução significativa da concentração de DA, apresentaram também a atividade da AchE reduzida, evidenciando a interação desses dois sistemas, sugerindo-os como possíveis alvos de ação no desenvolvimento de medicamento que coadjuvem no tratamento do alcoolismo.

Palavras-chave: Etanol, Haloperidol, Atropina, Dopamina, Acetilcolina, Corpo estriado.

ABSTRACT

Ethanol is an agent with nonspecific action, which may interfere in various neurotransmitter systems. Atropine is an alkaloid with blocking action of the cholinergic system, used in cholinergic intoxication and other with cardiac involvement. The neuroleptic, haloperidol, is an antagonist of dopaminergic pathways, mainly by blocking the D2 receptor, used in the treatment of schizophrenia in both acute and chronic psychoses and maniac psychotic episodes. Several studies have reported the interaction between the dopaminergic and cholinergic pathway and their interaction separately with the ethanol. This study investigated the behavioral and neurochemical effects produced in the striatum induced by subchronic treatment with ethanol in presence and absence of atropine or haloperidol. Swiss mice were used, females, weighing between 25 - 30g. The animals were treated with distilled water (control), ethanol (1 or 3g/kg, po) or pre-treated with haloperidol (0.5 mg / kg, ip) or atropine (0.5 mg / kg, ip), this application was thirty minutes before administration of ethanol or distilled water daily for seven days. Thirty minutes after the last drug administration intraperitoneally or sixty minutes after the last oral administration, the animals were subjected to behavioral tests of open field and track rod (locomotors activity), hole board and plus maze (anxiety activity) and then sacrificed with dissection of the striatum for determination of monoamines (norepinephrine, dopamine and its metabolic acid 3, 4-dihydroxyphenylacetic) or the concentration of acetylcholinesterase. Ethanol showed a stimulating effect in depressing the lower dose and higher dose, especially in tests of locomotors activity. When associated with a higher dose, haloperidol showed, in most cases the potentiating effect of ethanol, since atropine in some tests only showed a tendency to reverse this effect only associated with ethanol at the lowest dose, although not observed in all parameters of evaluated. However, the effect produced a modest increase in the concentrations of dopamine in the striatum, but when associated with blockers, a reduction of these levels was more pronounced when the association was made with ethanol at the highest dose. In the evaluation of the enzyme acetylcholinesterase, all substances used, combined or not, reduced more than 60% levels this enzyme, being more evident in the administration of atropine alone, or the authorities which showed a significant reduction in the concentration of AD, also showed reduced AChE, showing the interaction of these two systems, suggesting them as possible targets of action of drug development which contribute to the treatment of alcoholism.

Keyword: ethanol, haloperidol, atropine, dopamine, acetylcholine, striatum

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Consumo de bebidas alcoólicas por adultos (> 15 anos) por ano	14
Figura 2 - Via hepática de metabolização	18
Figura 3: Vias do sistema dopaminérgico no Sistema Nervoso Central	27
Figura 4: Degradação da acetilcolina pela acetilcolinesterase	31
Figura 5: Vias do sistema colinérgico no Sistema Nervoso Central	33
Figura 6: Equipamento para teste do camp aberto	40
Figura 7: Equipamentos para o teste de <i>Rota rod</i>	41
Figura 8: Placa perfurada	41
Figura 9: Labirinto em cruz elevada.....	42
Figura 11: Aparelho de HPLC.....	43
Figura 12: Ilustração da reação de identificação da acetilcolinesterase	44
Figura 13 - Efeito do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina atividade locomotora de camundongos	48
Figura 14 - Efeito do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina atividade locomotora (<i>rearing</i>) de camundongos.....	49
Figura 15 - Efeito do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina atividade locomotora (<i>rearing</i>) de camundongos.....	50
Figura 16 - Efeito do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina na atividade locomotora através teste do <i>rota rod</i> de camundongos.....	52
Figura 17 - Avaliação da atividade ansiolítica do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina no teste da placa perfurada.....	54
Figura 18 - Avaliação da atividade ansiolítica do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina no teste de <i>plus maze</i>	56
Figura 19 - Avaliação da atividade ansiolítica do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina no teste de <i>plus maze</i>	57
Figura 20: Efeitos do etanol sozinho ou associado com atropina ou haloperidol nos níveis de acetilcolinesterase no corpo estriado de camundongos	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dose-efeito do consumo de álcool	17
Tabela 2: Localização e principais ações dos receptores dopaminérgicos	29
Tabela 3: Localização e principais ações dos receptores colinérgicos	34
Tabela 4: Efeitos do etanol sozinho ou associado com haloperidol ou atropina nos níveis de monoaminas no corpo estriado de camundongos	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterase
ADH	Álcool desidrogenase
ALE	Atividade locomotora espontânea
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATC	Acetiltiocolina
ATP	Adenosina trifosfato
ATROP	Atropina
CAT	Colina acetil transferase
COMT	Catecol-orto-metil-transferase
COX	Cicloxigenase
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
EPM	Erro padrão da média
ET	Etanol
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HALO	Haloperidol
HPG	Hipotálamo hipofisário gonadal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HVA	Ácido homovanílico
i.p.	Intraperitoneal
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
IP3	Trifosfato de inositol
MAO	Monoamino oxidase
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NE	Norepinefrina
NMDA	n-metil-d-aspartato
SNC	Sistema nervoso central
sPLA2	Fosfolipase A2 secretada
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
USA	Estados Unidos da América (em inglês)
v.o.	Via oral
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Etanol	16
1.1.1 Ações do etanol	19
Sistema Cardiovascular	19
Sistema hematopoiético	20
Sistema hepático	21
Sistema endócrino	21
Sistema gastrintestinal	21
Sistema Nervoso Central	22
1.1.2 Efeitos do etanol sobre sistemas de neurotransmissores	23
1.1.2.1 Sistema dopaminérgico	25
Síntese, liberação e metabolização da DA no SNC	25
Vias dopaminérgicas	26
Receptores	27
Principais substâncias que afetam o sistema dopaminérgico	29
Relação entre Etanol e Sistema Dopaminérgico	29
1.1.2.2 Sistema Colinérgico	30
Síntese, liberação e metabolização da Ach no SNC	30
Vias colinérgicas	32
Receptores	33
Principais substâncias que afetam o sistema colinérgico	34
Relação entre Etanol e Sistema Colinérgico	35
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	37
Gerais	37
Específicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Animais	38
4.2 Preparo das substâncias	38
4.3 Tratamento dos grupos experimentais	38
4.4 Estudo Comportamental	40
4.4.1 Teste do campo aberto	40
4.4.2 Teste do <i>Rota Rod</i>	40
4.4.2 Teste do <i>Rota Rod</i>	41
4.4.4 Teste do Labirinto em cruz elevado (<i>Plus maze</i>)	42
4.5 Estudos Neuroquímicos	42

4.5.1 Determinação de monoaminas	42
Determinação da Enzima Acetilcolinesterase	43
ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
RESULTADOS	46
ESTUDO COMPORTAMENTAL	46
Teste do campo aberto	46
Teste do <i>Rota Rod</i>	51
Teste da Placa Perfurada (<i>Hole Board</i>)	53
Labirinto em Cruz Elevado (<i>Plus Maze</i>)	55
ESTUDO NEUROQUÍMICO	58
Concentrações de monoaminas em corpo estriado de camundongos tratados com etanol sozinho ou associado com bloqueadores colinérgico e dopaminérgico através de HPLC	58
Concentração da enzima acetilcolinesterase em corpo estriado de camundongos tratados com etanol sozinho ou associado com bloqueadores colinérgico e dopaminérgico através de espectrofotômetro	60
DISCUSSÃO	62
Efeitos na atividade locomotora e coordenação motora	62
Efeitos na atividade de ansiedade	63
Efeitos sobre as monoaminas e acetilcolinesterase	65
CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O consumo de substâncias psicoativas é bastante frequente em nossa sociedade, variando desde o uso ocasional até a dependência (Carlini, Galduróz *et al.*, 2002). Dentre as drogas mais consumidas no Brasil o álcool aparece com expressiva prevalência, seu uso crônico pode resultar em problemas de saúde como cirrose, transtornos gastrintestinais e hemodinâmicos dentre outros, além das implicações sociais como a desestruturação familiar e incapacitação para o trabalho. Somado a isso, configuram também problemas econômicos e de saúde pública em todo mundo. O álcool, dentre as substâncias psicoativas é o que tem recebido grande atenção, uma vez que seu consumo é lícito e corresponde a substância de abuso mais utilizada. Estudos mostram que o consumo de álcool em países em desenvolvimento, como o Brasil, vem aumentando com o passar dos anos e é mais frequente entre os jovens (Oms, 2004). Em 2005, aproximadamente 40% das mortes em acidentes de trânsito nos Estados Unidos estavam relacionadas ao uso de álcool (Nhtsa, 2005). O consumo de álcool mata 320 mil jovens e adolescentes por ano, sendo responsável por 10% das mortes de pessoas entre 15 e 29 anos no mundo (Oms, 2011).

O relatório global sobre álcool e saúde produzido pela Organização Mundial de Saúde (Oms, 2011) apresenta uma perspectiva abrangente sobre o consumo global, regional e nacional de álcool, os padrões de consumo, consequências para a saúde e as respostas políticas dos Estados-Membros para solucionar problemas com o uso desta substância. Dentre os dados apresentados o consumo de álcool por adultos maiores de 15 anos pode ser observado na Figura 1.

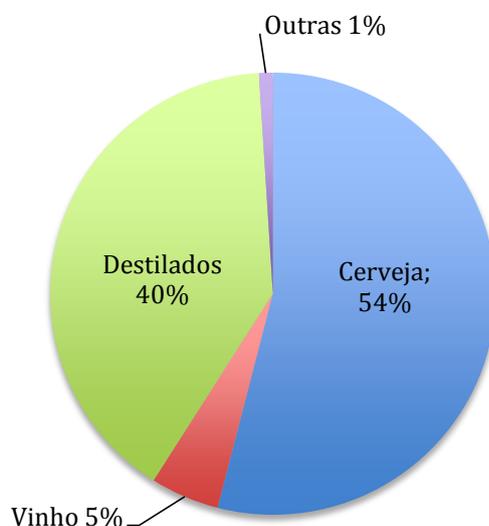


Figura 1 – Consumo de bebidas alcoólicas por adultos (> 15 anos) por ano.

Cervejas de malte. Vinho feito de uvas. “Espíritos” incluem todas as bebidas destiladas. Outros incluem uma ou várias outras bebidas alcoólicas, tais como bebidas fermentadas feitas de milho, sorgo, arroz ou sidra, vinho de frutas, vinho generoso, etc.

Fonte: OMS.

O álcool é uma das substâncias de abuso mais consumidas no mundo, embora tenha fácil aquisição, valores sócio-culturais também desempenham papel fundamental na grande aceitação de seu consumo (Edwards, Marshall *et al.*, 2005).

A ingestão de álcool, mesmo em pequenas quantidades, diminui a coordenação motora e os reflexos, comprometendo a capacidade de dirigir veículos, ou operar outras máquinas. Numerosos acidentes são provocados por motoristas que haviam bebido antes de dirigir. Um levantamento recente realizado pelo Ministério da Saúde mostra que o Brasil registrou no ano passado 40.610 vítimas fatais no trânsito, um aumento de quase 25% em relação ao registrado nove anos antes, em 2002, quando 32.753 morreram e 40% dos acidentes registrados no país foram relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas (Brasil, 2011). Neste sentido, segundo a legislação brasileira (Código Nacional de Trânsito, que passou a vigorar em Janeiro de 1998) deverá ser penalizada todo o motorista que apresentar mais de 0,6 gramas de álcool por litro de sangue. A quantidade de álcool necessária para atingir essa concentração no sangue é equivalente a beber cerca de 600 mL de cerveja (duas latas de cerveja ou três copos de chope), 200 mL de vinho (duas taças) ou 80 mL de destilados (duas doses). Porém, a lei nº 11.705 - de 19 de junho de 2008, denominada de “lei seca” começou a vigorar e o limite estabelecido foi reduzido para o correspondente a 0,1 grama de álcool por litro de ar expirado e para atingir esta concentração, basta uma taça de vinho ou uma tulipa de chope. Em novembro deste ano, foi aprovado um projeto de lei que prevê o limite zero de álcool para todos os motoristas. Todas as políticas vão ao encontro da redução no número de acidentes e vítimas causadas pelo consumo excessivo de álcool.

Além dos inúmeros acidentes de trânsito e outras violências associadas à ingestão de bebidas alcoólicas, o consumo de álcool por longo período de tempo pode provocar quadro de dependência conhecida como alcoolismo, o que acarreta altos custos para a sociedade envolvendo questões médicas, psicológicas, profissionais e familiares (Garriott, 1996).

1.1 Etanol

O ser humano há milhares de anos esteve em contato com o álcool. Em um primeiro momento ele foi usado em rituais, religiosos ou não. A partir da Revolução Industrial, registrou-se um grande aumento na oferta deste tipo de bebida, contribuindo para um maior consumo e, conseqüentemente, gerando um grande aumento no número de pessoas que passaram a apresentar algum tipo de problema devido ao uso excessivo do álcool (Seibel e Toscano, 2001).

O etanol (**Figura 2**) é um composto químico que pertence ao grupo dos alcoóis. Pelo fato de seu consumo ser bastante generalizado, essa droga tornou-se a mais conhecida deste grupo, adquirindo vulgarmente a sua denominação genérica, ou seja, etanol e álcool são considerados, popularmente, sinônimos (Gutiérrez e Cano, 1978).

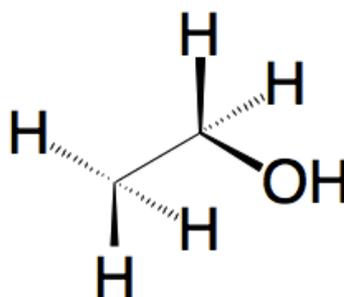


Figura 2: Estrutura química do etanol

Estudos comprovam que a variação do efeito do etanol é dose dependente (Oga, Basile *et al.*, 2008), como ilustrado na Tabela 1. Em doses baixas a moderadas, o álcool produz um efeito estimulante resultante do comprometimento dos mecanismos inibitórios que ocorrem no sistema nervoso central (SNC). Essa fase corresponde aos primeiros momentos após a ingestão, podendo desencadear efeitos como euforia, desinibição e loquacidade. Quando ingerido em concentrações elevadas, o álcool demonstra uma ação depressiva mais evidente, com a presença de sintomas como falta de coordenação motora, descontrole e sono, com progressiva redução dos reflexos e, finalmente, um estado de anestesia. Quando o consumo é exagerado, o efeito depressor fica exacerbado, podendo provocar estado de coma (UNIFESP, 2007).

Tabela 1: Relação dose-efeito do consumo de álcool

DOSE (g/l)	EQUIVALENTE	EFEITOS
0,2 a 0,3	1 copo cerveja ou 1 cálice pequeno de vinho ou 1 dose uísque ou de outra bebida destilada	As funções mentais começam a ficar comprometidas. A percepção da distância e da velocidade fica prejudicada.
0,31 a 0,5	2 copos cerveja ou 1 cálice grande de vinho ou 2 doses de bebida destilada	O grau de vigilância diminui, assim como o campo visual. O controle cerebral relaxa, dando a sensação de calma e satisfação.
0,51 a 0,8	3 ou 4 copos de cerveja ou 3 copos de vinho ou 3 doses de uísque	Reflexos retardados, dificuldades de adaptação da visão a diferenças de luminosidade; superestimação das possibilidades e minimização de riscos; e tendência à agressividade.
0,81 a 1,5	Grandes quantidades de bebida alcoólica	Dificuldades de controlar automóveis; incapacidade de concentração e falhas de coordenação neuromuscular.
1,51 a 2	Grandes quantidades de bebida alcoólica	Embriaguez, torpor alcoólico, dupla visão
2,1 a 5	Grandes quantidades de bebida alcoólica	Embriaguez profunda.
> 5	Grandes quantidades de bebida alcoólica	Coma alcoólico.

Fonte: <http://www.ufrj.br/institutos/it/de/acidentes/etanol2.htm>

O etanol é ingerido por via oral e absorvido de forma rápida. Cerca de 20% são absorvidos no estômago e 80% no intestino delgado, principalmente no duodeno. A absorção ocorre através de difusão simples, sendo maior no início e diminuindo, posteriormente, devido ao gradiente de concentração que vai se estabelecendo: 90% ocorrem na primeira hora e o restante nas 6 horas seguintes. O etanol distribui-se praticamente por todos os líquidos corpóreos, intra e extracelulares, de acordo com o conteúdo hídrico dos tecidos: no sangue, cérebro, rins, pulmões, coração, músculo estriado e fígado em ordem decrescente, respectivamente (Fortes e Cardoso, 1991). Em condições normais, cerca de metade da dose ingerida é absorvida dentro dos primeiros 15 minutos e, após uma hora, a droga já atinge 95% do total de sua absorção, ou seja, a concentração sérica máxima é atingida geralmente entre 30 a 90 minutos após ingestão oral (Moura, 2001). A ingestão de álcool com o estômago vazio aumenta sua absorção e logo o etanol passa para corrente sanguínea, no entanto, quando essa absorção é diminuída pela presença

de alimento no estômago, uma maior quantidade de etanol será inativada pelo metabolismo de primeira passagem (Rang, Dale *et al.*, 2007)

Por apresentar caráter polar e facilmente formar pontes de hidrogênio, o etanol se distribui amplamente por toda a água corpórea, difundindo-se rapidamente por todas as membranas biológicas, incluindo a barreira hematoencefálica e a placentária. Sua redistribuição depende principalmente do fluxo sanguíneo para os tecidos individuais (Figueira, 2002; Rang, Dale *et al.*, 2007).

O etanol é metabolizado quase que em sua totalidade, apenas 5-10% são eliminados inalterados de forma inalterada pelo suor, urina, pulmões e saliva. Esta metabolização se dá principalmente pela via hepática (figura 2) e ocorrem em duas fases, sendo a primeira mais significativa:

- 1ª Fase: caracterizada por sucessivas oxidações promovidas principalmente pela enzima álcool desidrogenase (ADH), na qual converte o etanol em acetaldeído e promove a redução da adenina dinucleotídeo (NAD) a NADH^+ . A disponibilidade do NAD limita a taxa de oxidação do etanol;
- 2ª Fase: caracterizada pela conversão do acetaldeído em ácido acético, que posteriormente é convertido em acetil-coenzima A com gasto de ATP. O acetil-CoA entra no ciclo de Krebs, transformando-se em CO_2 e H_2O .

Quando há uma produção excessiva deste metabólito intermediário tóxico e, portanto, uma elevação da sua concentração na corrente sanguínea, efeitos como vasodilatação com rubor facial, taquicardia, hipotensão, hiperventilação, grau considerável de pânico e angústia, como também hepatotoxicidade podem ocorrer (Lieber, 1995; Goodman e Gilman, 2006). Estudos *in vitro* mostram também a capacidade do etanol e do acetaldeído de provocarem alterações cromossômicas e serem potencialmente genotóxicos (Kayani e Parry, 2010).

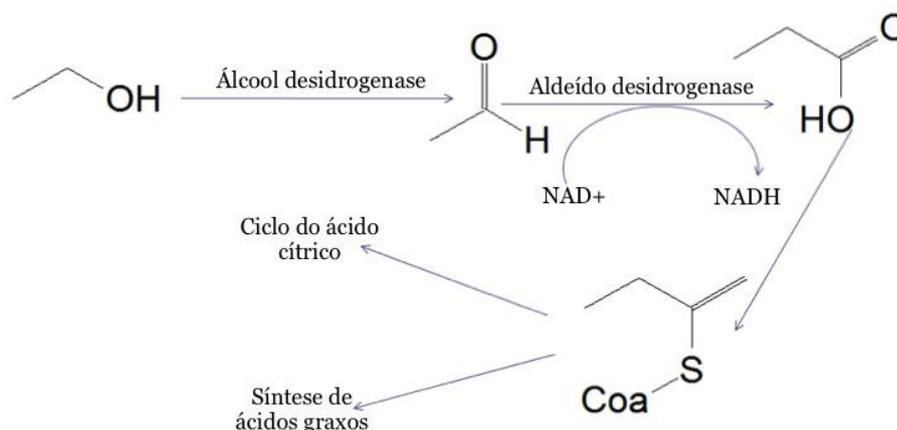


Figura 2 - Via hepática de metabolização

Outras formas, menos expressivas, de biotransformação do etanol são o sistema de oxidação microssomal do etanol e o sistema de catalase binária. Eles são capazes de metabolizar, no máximo, 10% do etanol (Oga, Basile *et al.*, 2008). Esse sistema é necessário quando a concentração de etanol aumenta, especialmente em indivíduos que consomem álcool regularmente (Lieber, 2004; Rang, Dale *et al.*, 2007).

O etanol pode afetar a biotransformação de outros fármacos metabolizados também pelo sistema de oxidases de função mista como fenobarbital, varfarina e esteróides, com efeito inicial inibitório da metabolização produzido por competição, seguido por aumento causado pela indução enzimática (Rang, Dale *et al.*, 2007).

O consumo de álcool por longos períodos causa hipertrofia do retículo endoplasmático liso do hepatócito, com aumento de 5-10 vezes no nível de sistema microssomal oxidante de etanol, contribuindo para a tolerância metabólica observada em usuários de álcool. O etanol interfere com a gliconeogênese hepática, podendo causar hipoglicemia. Os alcoólatras desenvolvem tolerância ao etanol e a outros fármacos, fenômeno conhecido como tolerância cruzada. Essa tolerância é devida, em parte, a adaptação do sistema nervoso central e à indução enzimática. Assim, os alcoolistas, quando sóbrios, necessitam de doses maiores de fármacos que os abstêmios, para obtenção do mesmo efeito (Oga, Basile *et al.*, 2008).

1.1.1 Ações do etanol

Devido à capacidade de se solubilizar em água e atravessar todas as barreiras do nosso organismo, o etanol é uma substância capaz de influenciar vários sistemas no nosso organismo, tais como: sistema circulatório, sistema hematopoiético, sistema hepático, sistema endócrino, sistema gastrointestinal e sistema nervoso central.

Sistema Cardiovascular

O uso crônico do etanol pode causar miocardiopatia, distúrbios da condução e do ritmo cardíaco nos alcoólatras crônicos. Parece haver um efeito dose-dependente do etanol no músculo cardíaco que é independente de doença arterial coronariana, desnutrição ou deficiências vitamínicas (De Keulenaer e Brutsaert, 1999; Laonigro, Correale *et al.*, 2009). Segundo Urbano (Urbano-Marquez, Estruch *et al.*, 1989), o músculo cardíaco sofre danos celulares com o uso prolongado do etanol e esse efeito

parece ser a causa mais importante de miocardiopatia. Possíveis mecanismos subjacentes aos efeitos tóxicos do álcool sobre o miocárdio incluem: prejudicada função oxidativa mitocondrial, a síntese alteradas de proteínas miofilamentosas, alterações nos níveis de cálcio citosólico, estresse oxidativo e apoptose (Figueredo, Chang *et al.*, 1998; Piano, 2002; Figueredo, 2011)

Enquanto a ingestão de etanol em níveis elevados aumenta o risco de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, uma relação inversa (cardioproteção) se observa para o consumo regular de bebidas alcoólicas em quantidades moderadas. Segundo Huang (Huang, Tsai *et al.*, 2010), a ingestão de bebidas alcoólicas em níveis moderados parece aumentar a neovascularização e densidade de capilares em tecidos isquêmicos de ratos diabéticos pela maior mobilização de circulação de células progenitoras endoteliais para essas regiões.

Sistema hematopoiético

A ingestão de álcool afeta também o sistema sanguíneo. Segundo Rubin (Rubin, 1999), esta alteração é evidenciada principalmente pela diminuição do número e alteração da função das plaquetas, um achado bastante comum em casos de intoxicação alcoólica aguda, sendo reversível até duas semanas após a interrupção do consumo, com exceção no caso de doença hepática. Marumo (Marumo e Wakabayashi, 2009), em estudo realizado para determinar a quantidade mínima de etanol que inibe a agregação plaquetária induzida pela trombina, mostraram que o limiar de concentração inibitória dessa substância é de cerca de 0,125% (aproximadamente 21 mmol/l), que é facilmente atingível depois de ingerir etanol em doses baixas.

Outros parâmetros sanguíneos comumente alterados pelo consumo de álcool são volume corpuscular médio (VCM) aumentado e macrocitose. A anemia é frequentemente observada em pessoas que ingerem cronicamente álcool (Maruyama, Hirayama *et al.*, 2001). Estudos sugerem que o acetaldeído, o primeiro metabólito do etanol, pode desempenhar um papel em distúrbios hematológicos em células de sangue periférico e na medula óssea de pacientes etilistas por se ligar a proteínas e constituintes celulares formando aductos estáveis, que pode ser associado a consequências negativas em funções celulares (Niemela e Parkkila, 2004)

Sistema hepático

Oxidação do etanol através da via ADH produz acetaldeído, que é convertido em acetato, ambas as reações reduzem a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). A presença dessa molécula em excesso provoca uma série de distúrbios metabólicos (Lieber, 1992), incluindo a inibição do ciclo de Krebs e da oxidação de ácidos graxos. A inibição da oxidação de ácidos graxos favorece esteatose e hiperlipidemia. O acúmulo prolongado de gorduras e proteínas no fígado pode desencadear a cirrose característica observada em muitos alcoólatras (Lieber, 2000; 2001).

Sistema endócrino

O álcool pode provocar uma redução dos níveis de testosterona. A impotência e a perda da libido são frequentemente relatadas pelos etilistas (Oga, Basile *et al.*, 2008). O hipogonadismo secundário ao álcool provoca impotência, atrofia testicular e diminuição do crescimento dos pêlos. Observam-se também hiperestrogenismo, com ginecomastia e distribuição feminina do tecido adiposo no homem.

Um estudo feito com o objetivo de investigar o nível plasmático de testosterona, a função do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal (HPG) e o efeito do etanol sobre o estresse oxidativo sistêmico em homens etilistas crônicos mostrou que a testosterona plasmática encontrava-se significativamente baixa, com baixo hormônio luteinizante e hormônio folículo estimulante. Quando avaliado o estresse oxidativo, encontrou-se elevados níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), superóxido dismutase, glutatona S-transferase, catalase, glutatona redutase e glutatona peroxidase (Maneesh, Dutta *et al.*, 2006).

Sistema gastrintestinal

O etanol é comumente consumido por via oral, portanto entra em contato rapidamente com o esôfago, estômago e intestino. É considerado um agente irritante da mucosa gástrica e esofágica, provavelmente por aumentar a quantidade de ácido clorídrico secretada pelo estômago e quando consumido em grandes quantidades, pode provocar gastrite erosiva, lesões no esôfago e no duodeno, podendo ainda prejudicar a absorção de vitaminas e sais minerais (Oliveira e Pereira, 1994).

O risco de câncer de esôfago e estômago tem sido associado ao consumo de etanol. O acetaldeído, principal metabólito tóxico do etanol, associado a bebidas alcoólicas foi recentemente classificado como um cancerígeno do Grupo 1 para os seres humanos (Secretan, Straif *et al.*, 2009). Um estudo de revisão mostrou que a exposição ao acetaldeído aumenta significativamente o risco de câncer em consumidores de álcool. Evidências afirmam que o acetaldeído é uma substância cancerígena local, não só no esôfago, mas também no câncer gástrico, porém esse intoxicante pode ser também proveniente do tabaco e alguns alimentos que passam pelo processo de fermentação (Salaspuro, 2011).

Sistema Nervoso Central

Embora o álcool etílico seja uma droga milenar, de modo que trechos bíblicos já revelavam o uso desta substância naquela época, o mecanismo de ação exato pelo qual o álcool realiza seus efeitos não tem ainda sido bem elucidado. Entretanto, sabe-se que o álcool interfere diferentemente com processos de transmissão no SNC, afetando muitos (se não todos) dos sistemas neurotransmissores (Nevo e Hamon, 1995), o que contribui para seu efeito bifásico, inicialmente estimulador, porém, quando aumentada a dose, assume o papel de depressor do SNC.

Um efeito bastante observado após longos períodos de uso regular do etanol é a neuropatia periférica, um conjunto de sintomas que pode levar à incapacidade significativa desses usuários. Controvérsias a cerca da etiologia desta neuropatia se deu durante todos esses anos. Antes se atribuía esse efeito apenas aos efeitos tóxicos do etanol, porém, nos últimos anos observou-se que fatores como deficiências nutricionais poderiam, também, acarretar esse e outros tipos de problema como encefalopatia de Wernicke e beribéri (Shattuck, 1928; Paladin e Russo Perez, 1987).

Um estudo recente que mostrou resultados eletrofisiológicos e patológicos da ação do etanol no SNC. Esses efeitos apoiam-se na toxicidade do etanol, provavelmente afetando pequenas fibras amielínicas e mielínicas no início do curso, e progredindo para envolvimento clínico mais sintomáticos como no sistema sensorio-motor, no entanto, o tratamento com tiamina não foi bem sucedido para neuropatia causada pelo consumo crônico de etanol (Mellion, Gilchrist *et al.*, 2011). Há fortes evidências mostrando que o uso crônico excessivo de etanol pode aumentar o dano oxidativo aos neurônios resultando em morte celular. Embora ainda não bem compreendido, o etanol pode aumentar a

produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no cérebro como por exemplo no aumento da geração de radicais hidroxietila, indução da CYP2E1, alteração da citocina vias de sinalização para indução da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e fosfolipase A2 secretada (sPLA2), e produção de prostanóides através da via PLA2/COX (Sun e Sun, 2001). Estes mecanismos podem estar relacionados à doença de Alzheimer, Parkinson e outras também neurodegenerativas.

1.1.2 Efeitos do etanol sobre sistemas de neurotransmissores

Um sítio de ação do etanol bastante conhecido principalmente por ser o grande responsável pelo seu efeito depressor está presente nos receptores do sistema GABAérgico, o GABA_A. O efeito do etanol nesse sistema se assemelha com o produzido pelo benzodiazepínicos, medicamentos que modulam a ação do ácido gama-aminobutírico, o principal neurotransmissor inibitório do SNC, que ativa o canal de cloreto, aumentando a permeabilidade do mesmo para o meio intracelular e, conseqüentemente, causa uma hiperpolarização, que pode ser facilmente visualizada em características como letargia, diminuição da coordenação motora e alteração do humor bem evidenciada após o consumo de álcool (Rudolph, Crestani et al., 1999), podendo variar de acordo com a quantidade de etanol consumida.

Em contrapartida, o etanol também possui ação em sistemas de neurotransmissores excitatórios como o glutamato. Os receptores de glutamato são do tipo ionotrópico e metabotrópico. Os ionotrópicos são divididos em N-metil-D-aspartato (NMDA) e os não-NMDA, sendo estes últimos compostos pelos subtipos ácido caínico e AMPA (Weiner, Dunwiddie *et al.*, 1999). O etanol atua inibindo a função dos receptores do tipo NMDA e ácido caínico em doses que não conseguem inibir a função dos receptores do tipo AMPA (Charness, Simon *et al.*, 1989). Estudos mostram que o tratamento agudo do etanol pode aumentar a fosforilação e expressão de subunidades dos receptores de NMDA, possivelmente como uma via compensatória da inibição desses receptores provocados pelo etanol (Roh, Cui *et al.*, 2011). Um estudo dirigido por (Tokuda, Izumi *et al.*, 2011) realizado na escola de medicina da Universidade de Washington utilizou a administração de anticorpo contra neuroesteróides 5 α -reduzido. Os resultados deste estudo mostraram que a ativação do sistema glutamatérgico também pode modular o sistema gabaérgico, através dos receptores NMDA com o aumento da produção do neuroesteróide

allopregnanolona na região CA1 do hipocampo, uma das regiões importantes na formação da memória.

O efeito potencializador de um neurotransmissor inibitório (GABA) somado a inibição do efeito de um neurotransmissor excitatório (glutamato) são os grandes responsáveis pelo efeito depressor do etanol no SNC.

Outro neurotransmissor afetado pelo consumo de álcool é a serotonina (5-HT). Ela está presente no SNC e se relaciona com funções como aprendizado, memória, analgesia, ansiedade, estado motivacional e a resposta ao álcool e outras drogas de abuso (Stahl, 1998). O consumo de etanol interfere nesse sistema por potencializar a ação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ que em análises eletrofisiológicas da função deste neurotransmissor no hipocampo indica que os receptores que residem em neurônios inibitórios GABAérgicos no giro denteado pode estimular a atividade interneurônio. Isto leva a maior liberação do neurotransmissor inibitório GABA, e inibição de circuitos do hipocampo. Assim, o aumento da transmissão sináptica inibitória por 5-HT₃ pode contribuir para algumas das ações neurais inibitórias dos álcoois (Lovinger, 1999).

Experimentos em animais que avaliaram a influencia ambiental sob o vício e a recompensa mostram que a serotonina tem um papel importante em situações de “traumas”, como separação da mãe por um longo período. Foi verificado que as concentrações de 5-HT na região do núcleo *accumbens* e área tegumentar ventral estavam mais baixas nesses animais e que ao consumirem etanol espontaneamente esses níveis foram elevados, mostrando que a serotonina somada a fatores ambientais possuem um papel importante na vulnerabilidade ao consumo alcoólico (Oreland, Raudkivi *et al.*, 2011).

O etanol interfere com outros sistemas neuroquímicos, dentre eles sistema noradrenérgico de modo que a administração aguda de etanol produz um efeito bifásico na liberação de norepinefrina (NE): doses baixas de etanol levam a um aumento na liberação de NE, tendo uma resposta inversa é vista em doses maiores (Rossetti, Longu *et al.*, 1992). As propriedades sedativas-hipnóticas do etanol têm relação com a diminuição na liberação de NE cortical quando administrado etanol em altas doses, enquanto as propriedades excitatórias são decorrentes do aumento da liberação de NE quando administradas baixas doses de etanol.

A forma como o etanol desempenha este efeito dose dependente ainda não está consolidado, um estudo realizado por Underwood (2004) demonstrou que há uma redução

considerável da ligação com os receptores adrenérgicos do tipo alfa e do tipo beta por redução específica da afinidade, independente da concentração de etanol.

Dentre as evidências que apontam para uma correlação do etanol com o sistema noradrenérgico encontramos a ocorrência de vasodilatação periférica e tremores decorrentes do aumento da NE, muito comum em pacientes etilistas. Portanto, alguns agonistas desse sistema são utilizados nos sintomas da síndrome de abstinência.

No entanto alguns fatores permaneciam com lacunas de conhecimento, como por exemplo os efeitos hipnóticos e as alterações no sistema motor causadas pelo uso do etanol, no entanto estudos indicam que uma a interferência do etanol sobre o sistema adenosinérgico pode explicar, mesmo que em parte tais efeitos. Estas ações se relacionam com a área cerebral em que os receptores adenosínicos se encontram e variam desde efeitos motores até efeitos hipnóticos.

Em estudo para avaliar o papel do estriado na incoordenação motora induzida pelo etanol através dos receptores de adenosina A1 e A2, (Dar, 2001) ao injetar diretamente as drogas agonistas e antagonistas de receptores de adenosina através de uma bomba de infusão acoplada a uma cânula previamente instalada no cérebro no animal, mostrou que quando administrado um agonista não seletivo A1 e A2_A e um agonista seletivo de receptores A1, a incoordenação motora foi potencializada, porém quando administrado um antagonista seletivo A1, o efeito motor foi atenuado, mostrando que o sistema adenosinérgico no corpo estriado, uma área de controle motor, modula a ação do etanol, porém não é o único. O sistema gabaérgico, com o aumento do influxo de íons cloreto também é responsável por esta incoordenação motora induzida pelo etanol.

Dentre os vários neurotransmissores que possuem modulação pelo etanol, dois chamam a atenção e são objetos de estudo dessa dissertação: sistema dopaminérgico e sistema colinérgico.

1.1.2.1 Sistema dopaminérgico

Síntese, liberação e metabolização da dopamina no SNC

Em 1958, Arvid Carlsson identificou a dopamina como um neurotransmissor independente. Cinco anos depois, foi descoberto que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos era a base etiológica da doença de Parkinson e que este neurotransmissor estava envolvido no modo de ação das drogas antipsicóticas (Grace, 1993). A partir daí, o

sistema dopaminérgico se tornou alvo de estudo, no sentido de entender melhor este sistema neuroquímico que é responsável por desencadear várias ações no organismo.

A síntese da DA é dependente de um aminoácido proveniente da dieta, a tirosina. Esse aminoácido é convertido em L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa) catalisada pela enzima tirosina hidroxilase, que é inibida pelo produto final da via de biossíntese, a DA, constituindo o mecanismo de regulação contínua da velocidade de síntese (etapa limitante). Logo após essa primeira conversão, a L-dopa sofre ação rápida de outra enzima, a dopa descarboxilase, produzindo assim o neurotransmissor dopamina (Rang, Dale *et al.*, 2007).

Após ser sintetizada, a DA é estocada em neurônios dopaminérgicos dentro de grânulos secretórios, para ser posteriormente liberada do terminal nervoso, durante um potencial de ação, através de processo cálcio-dependente. Quando liberada na fenda sináptica, ela pode combinar-se com receptores pré-sinápticos e modular a sua própria liberação, através de um mecanismo de retroalimentação. Ainda na fenda sináptica, a DA pode sofrer um processo de recaptção, através de sua ligação com uma proteína acoplada à membrana pré-sináptica, ou pode ligar-se aos seus receptores pós-sinápticos (Conn, 1995).

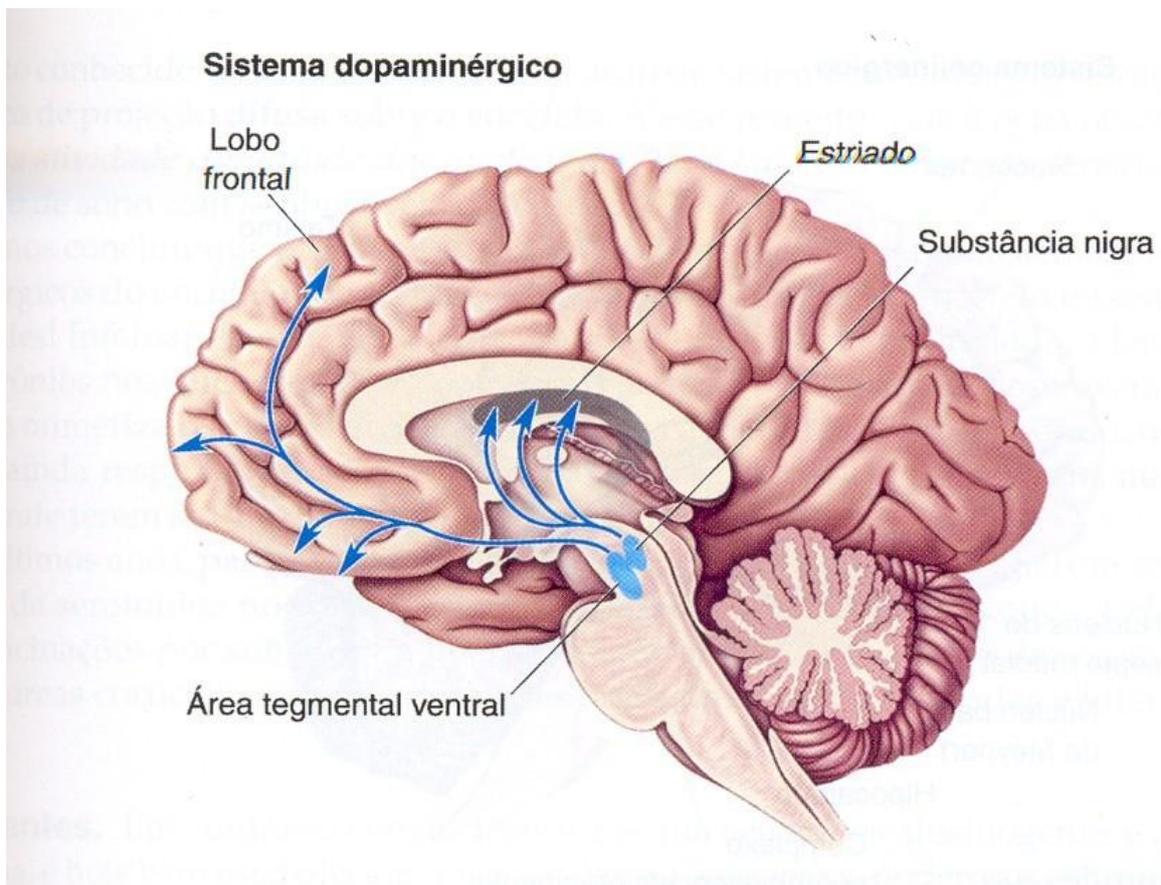
A degradação metabólica da DA é feita no SNC principalmente por duas enzimas: a monoamina oxidase (MAO) e a catecol-O-metil transferase (COMT). A MAO existe em duas formas moleculares semelhantes, codificadas por genes separados (MAO- tipo A e tipo B). A MAO-A possui preferência de substrato para a serotonina. A MAO-B possui preferência de substrato para a feniletilamina. Ambas as isoformas atuam sobre a dopamina. Assim, a degradação da dopamina é feita pela MAO que converte a DA em DOPAC (ácido 3,4 dihidroxifenilacético) no neurônio e pela COMT (catecol-O-metil transferase) que converte DA em HVA (ácido homovanílico) dentro do terminal sináptico (Rang, Dale *et al.*, 2007)

Vias dopaminérgicas

A dopamina representa mais da metade do conteúdo de catecolaminas no SNC. Isto contrasta com sua baixa ocorrência na periferia, presentes apenas no mesentério intestinal, onde parecem regular o tônus intestinal no período pós prandial (Graeff e Brandão, 1999).

O sistema dopaminérgico no SNC compreende três principais vias neuronais principais: nigroestriatal, mesocorticolímbica e tuberoinfundibular. A via nigroestriatal, responsável por 75% da dopamina cerebral é constituída por neurônios que se projetam da

substância negra para o corpo estriado. Esta via tem importante papel no controle da locomoção e também está relacionada aos sintomas da doença de Parkinson. A via dopaminérgica mesocorticolímbica é composta por neurônios da área tegmental ventral que se conectam com regiões do sistema límbico, principalmente com o *nucleus accumbens*, sendo assim envolve o controle da estabilidade emocional, muitas vezes evidenciado na esquizofrenia. A via tuberoifundibular se origina de neurônios que partem do hipotálamo para hipófise. A dopamina secretada por estes neurônios é transportada para a hipófise onde regula a secreção de prolactina. Esta via influencia a lactação e a fertilidade, muitas vezes também observada na galactorréia induzida por fármacos antipsicóticos (Civelli, Bunzow *et al.*, 1993)



Fonte: www.unisinos.br

Figura 3: Vias do sistema dopaminérgico no Sistema Nervoso Central

Receptores

A primeira evidência para a presença de um receptor de dopamina no cérebro veio de experimentos mostrando a estimulação da adenilato ciclase pela atividade da dopamina

(Kebabian, Petzold *et al.*, 1972). A classificação em receptores de dopamina em D1 e D2 com base em sua farmacologia e acoplamento para a adenilato ciclase só veio depois (Kebabian e Calne, 1979). Estes dois receptores também exercem seus efeitos através de ações biológicas diferentes, acoplando-se e ativando diferentes complexos de proteínas G. O receptor D1 interage com o complexo G estimulatória (Gs) para ativar a adenililciclase, aumentando a formação de AMPc, enquanto o receptor D2 interagia com a proteína G inibitória (Gi), inibindo a adenililciclase e, conseqüentemente inibindo a produção de AMPc (Rang, Dale *et al.*, 2007).

Durante 10 anos, esta classificação em dois subtipos de receptores explicava a maioria das atividades do sistema dopaminérgico. Posteriormente foram descobertos novos subtipos que por algum tempo ainda foram refutados pois pareciam representar estados de afinidade diferentes dos receptores D1 e D2 (Leff e Creese, 1985; Andersen, Gingrich *et al.*, 1990).

As atividades biológicas predominantes dos receptores D1 e D2 são a ativação e inibição da adenililciclase, respectivamente. Em células de camundongos transfectadas, foi demonstrado que os receptores D1 e D5 estão relacionados à ativação da adenililciclase, sugerindo vias de indução de segundos mensageiros similares para os receptores D1-símile. Por outro lado, para os receptores D3 e D4 não foi completamente definido se eles ativam sistemas de segundos mensageiros (Civelli, 1995). Contudo, esses receptores D3 e D4 são classificados como fazendo parte da família de D2-símile.

Um estudo de revisão evidencia o receptor D3 como sendo um futuro alvo no tratamento de drogas de abuso. Cada vez mais evidências decorrentes de ensaios pré-clínicos indicam que os antagonistas desses receptores podem realmente regular a motivação e o desejo para auto-administração de drogas, o que direciona esforços de pesquisa para o desenvolvimento de antagonistas seletivos dos receptores de DA do subtipo D3 (Heidbreder e Newman, 2010).

Tabela 2: Localização e principais ações dos receptores dopaminérgicos

Distribuição	Receptor					Papel funcional
	D1	D2	D3	D4	D5	
Córtex	+++	++	-	+	-	Alerta, humor
Sistema Límbico	+++	++	+	+	+	Emoção, comportamento estereotípico
Estriado	+++	++	+	+	+	Controle motor
Partes ventrais do hipotálamo e anterior da hipófise	-	++	+	-	-	Secreção de prolactina

Fonte: Adaptado de Rang, H. P. et al, 2007

Principais substâncias que afetam o sistema dopaminérgico

A cocaína é considerada uma das substâncias ilícitas mais importantes no que se diz respeito das consequências desastrosas do seu uso. Um dos alcalóides presentes em plantas do gênero *Erythroxylum*, a cocaína consiste em inibir a recaptação de catecolaminas, principalmente dopamina. Inicialmente, a cocaína aumenta a liberação e inibe a recaptação de dopamina provocando o estado de euforia, enquanto o uso regular desta substância provoca uma alteração da sensibilidade do receptor dopaminérgico pós-sinápticos, explicando as principais sensações da abstinência (Johanson e Shuster, 1995; Oga, Basile *et al.*, 2008).

O haloperidol é um neuroléptico do grupo das butirofenomas antagonista das vias dopaminérgicas, antagonismo este que se dá por bloqueio principalmente do receptor D2 (Baldessarini, 1995). Esse bloqueio ocorre junto aos gânglios da base e provoca o aparecimento dos efeitos extrapiramidais, podendo ocorrer também no trato tuberoinfundibular do hipotálamo, o que eleva os níveis de prolactina. Este fármaco pode ser utilizado no tratamento da esquizofrenia, tanto na fase aguda como crônica, psicoses e episódios maníacos psicóticos (Cordioli, 2000).

Relação entre Etanol e Sistema Dopaminérgico

A dopamina (DA) está intimamente ligada aos efeitos decorrentes da ação do etanol no SNC. Evidências sugerem um importante papel do sistema dopaminérgico cerebral na ação psicotrópica e propriedades de induzir abuso ou dependência ao etanol (Di Chiara e North, 1992; Koob, 1992; Macedo, Sousa *et al.*, 2001; Vasconcelos, 2001). Esta é a

hipótese dopaminérgica para o abuso de drogas, onde foi evidenciado que há alteração dos níveis de dopamina em regiões como o *nucleus accumbens*, área que está relacionada com a motivação (Kandel, Schwartz *et al.*, 1997) e corpo estriado, área que está relacionada a locomoção (Vasconcelos, 2001; Vasconcelos, Macedo *et al.*, 2003; Vasconcelos, Cavalcante *et al.*, 2004) após o uso de etanol.

A liberação de dopamina no *nucleus accumbens* pode ser o fator preponderante para o desenvolvimento da dependência do álcool. A dependência psicológica do álcool desenvolve-se porque o estímulo, relacionado ao álcool, adquire excessivas propriedades motivacionais, que induzem um intenso desejo para consumir bebidas contendo álcool (*craving*).

Diana (Diana, Rossetti *et al.*, 1993; Diana, Brodie *et al.*, 2003), sugere que o álcool age por ativar a liberação da dopamina neuronal e assim modular outros sistemas de comunicação cerebral, portanto, através da elucidação do mecanismo de ação do etanol no sistemas de neurotransmissão cerebral será possível desenvolver drogas eficazes para a dependência.

Outro caminho importante é o evidenciado por (Melis, Diana *et al.*, 2009) que em sua revisão enfatiza o papel do acetaldeído nos problemas causados pela ingestão do etanol e sugere que o estresse pode contribuir para a ativação de efeitos do etanol sobre os neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral (ATV), que pelo menos algumas ações do etanol sobre esses neurônios são mediadas pelo acetaldeído e que a interação entre estresse e álcool poderia desempenhar um papel na suscetibilidade ao alcoolismo, sendo a ligação entre as ações do etanol e seu principal metabólito nos mecanismos de recompensa do cérebro uma chave para o desenvolvimento de agentes para reduzir desejo sobre o álcool.

1.1.2.2 Sistema Colinérgico

Síntese, liberação e metabolização da Acetilcolina no SNC

A acetilcolina foi o primeiro neurotransmissor identificado e é responsável pela transferência de impulsos dos neurônios colinérgico para as células nervosas colinoceptivas

e para células de tecidos inervados (Tucek, 1993). O Sistema Colinérgico possui um papel importante nos processos de memória e aprendizado (Ohno, Yamamoto *et al.*, 1993).

A molécula de colina, precursora da Ach é transportada através de um transportador específico para dentro da terminação nervosa e através da enzima colina acetiltransferase (CAT) ocorre a síntese da acetilcolina, logo internalizada em vesículas através de um transportador de Ach. Quando a Ach é liberada na fenda sináptica, uma fração se liga aos receptores colinérgicos e outra fração se liga aos receptores pré-sinápticos e a fração restante torna-se alvo da enzima acetilcolinesterase (Figura 4), que catalisa a degradação em colina e acetato, que é necessário para que um novo ciclo se inicie (Parsons, Prior *et al.*, 1993).

Essa é a principal via de degradação da Ach e o seu antagonismo é alvo de moléculas utilizadas no tratamento de patologias que por algum motivo diminuem a Ach disponível para se ligar aos receptores.

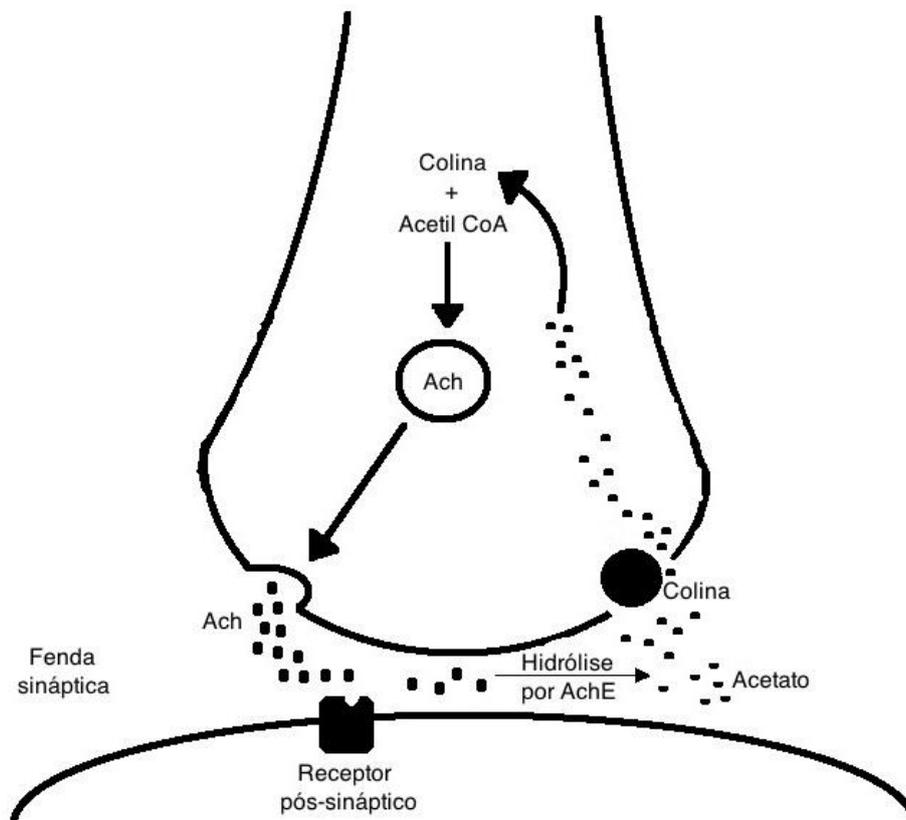


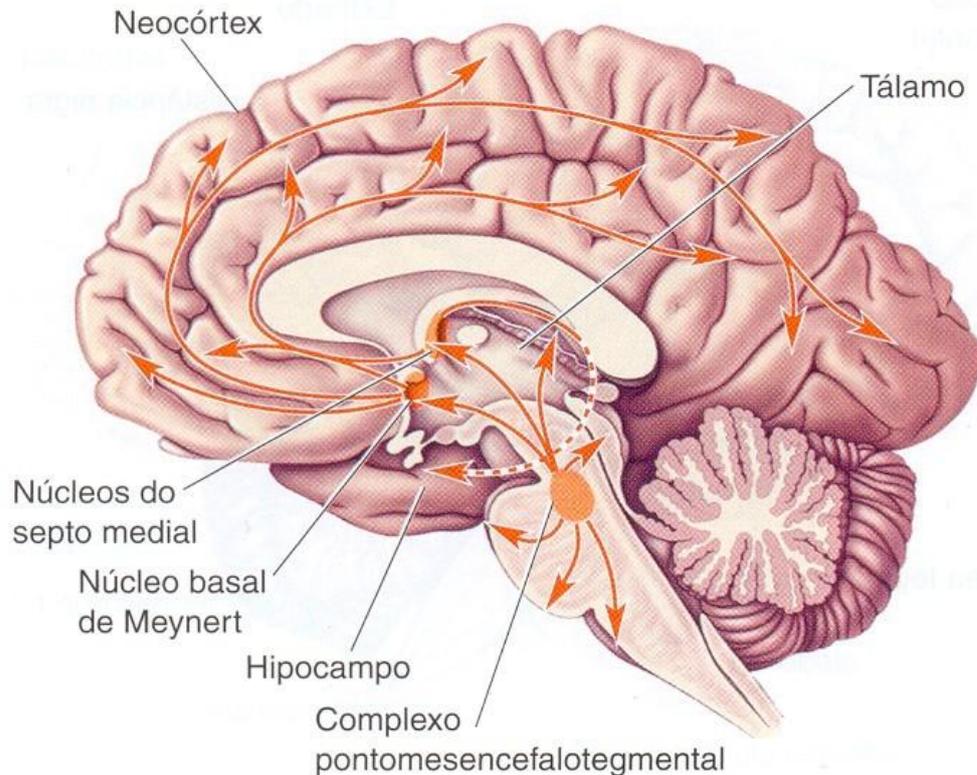
Figura 4: Degradação da acetilcolina pela acetilcolinesterase

Vias colinérgicas

No SNC, a acetilcolina está principalmente localizada na área tegmentar lateral do robencéfalo, incluindo os núcleos parabraquial e pedunculopontino, e a matéria cinzenta periaquedutal. Este complexo de neurônios colinérgicos dá origem a um sistema de fibras ascendentes que se projeta para o colículo superior, área pré-tectal anterior e tálamo. Outro contingente importante de neurônios colinérgicos é encontrado no prosencéfalo basal, consituído pela região septal, banda diagonal de Broca e núcleo basal de Meynert, imerso em uma região anterior ao interior do globo pálido, esta última região é bastante afetada na doença de Alzheimer. Dessa região saem fibras que se projetam para o hipocampo, hipotálamo lateral, complexo amigdalóide e córtex frontal. Esta via do prosencéfalo parece estar relacionada à acurácia visual, a via do hipocampo está relacionado com a memória e a via da amígdala relacionada com processos afetivos (Graeff e Brandão, 1999).

Estudos mostram a interação dos sistemas colinérgico e dopaminérgico. Sugerido por (Stancampiano, Carta *et al.*, 2004), o etanol pode modular a liberação de acetilcolina ou interagir com receptores colinérgicos. Assim, tem sido demonstrado que as alterações locomotoras, bem como reforço pelo consumo da droga, podem também estar relacionadas ao sistema colinérgico (Larsson e Engel, 2004). O sistema colinérgico também apresenta uma inervação importante no corpo estriado. Nessa região o sistema colinérgico faz uma modulação negativa com o sistema dopaminérgico o que é bem descrito com os pacientes que tem doença de Parkinson. Evidências neurofarmacológicas indicam uma interação entre a neurotransmissão dopaminérgica e colinérgica nos núcleos da base, especificamente no corpo estriado (Consolo, Ladinsky *et al.*, 1981; Bertorelli e Consolo, 1990; Sousa, 1997) sendo a acetilcolina controlada pela dopamina predominantemente através dos receptores D1, o que mostra que a transmissão dopaminérgica prejudicada afeta a liberação de acetilcolina já que a ativação de receptores D1 estimula a liberação de Ach e a ativação do D2 seria inibitório em relação à Ach (Bertorelli, Zambelli *et al.*, 1992). Sendo confirmado por Consolo (1992), onde ao administrar SHC23390, um agonista dopaminérgico, localmente no corpo estriado alterou a liberação de acetilcolina. A figura 5 ilustra as principais vias colinérgicas.

Sistema colinérgico



Fonte: www.unisinos.br

Figura 5: Vias do sistema colinérgico no Sistema Nervoso Central

Receptores

Os receptores de Ach podem atuar como canais iônicos e são classificados como nicotínicos ou podem ser acoplado à proteína G e recebem a classificação de muscarínicos. Os receptores nicotínicos estão presentes na junção neuromuscular esquelética, no sistema ganglionar simpático e parassimpático e presentes também no SNC, onde são amplamente distribuídos e agem de forma a aumentar a permeabilidade neuronal a cátions como Na^+ , K^+ e Ca^{++} . Os receptores muscarínicos são encontrados nos neurônios do SNC, no coração, músculo liso e gânglios. São divididos em cinco subtipos moleculares e são organizados de tal forma que os receptores ímpares (M1, M3 e M5) acoplam-se a proteína G_q , ativando a via do trifosfato de inositol, enquanto os receptores pares (M2 e M4) acoplam-se a proteína G_i , inibindo a adenilil ciclase e reduzindo o AMPc intracelular (Rang, Dale *et al.*, 2007)

Os receptores muscarínicos exercem funções vitais no cérebro e no sistema autônomo, sendo importante nos processos de memória e patofisiologia de doenças como a esquizofrenia e Alzheimer (Drachman e Leavitt, 1974; Karson, Garcia-Rill *et al.*, 1991)

Tabela 3: Localização e principais ações dos receptores colinérgicos

Receptor	Localização	Ação
MUSCARÍNICOS		
M1	Gânglios autônomas Glândulas: gástricas, salivares etc. Córtex cerebral	↑IP ₃ , DAG Despolarização Excitação (peps lento) ↓condutância ao K ⁺
M2	Coração: átrios SNC: amplamente distribuído	↓AMPC Inibição ↓condutância ao Ca ²⁺ ↑ condutância ao K ⁺
M3	Glândulas exócrinas: gástricas, salivares etc. Músculo liso: trato gastrintestinal, olho, vias aéreas, bexiga Vasos sanguíneos: endotélio SNC	↑IP ₃ Estimulação ↑[Ca ²⁺]
M4	SNC	↓AMPC Inibição
M5	SNC: substância negra Glândulas salivares Íris e músculo ciliar	↑IP ₃ Excitação
NICOTÍNICOS		
Musculares (α1) ₂ β1δε	Junção muscular esquelética: principalmente pós-sináptica	Excitatório ↑Permeabilidade de cátions (K ⁺ e Na ⁺)
Ganglionares (α3) ₂ (β4) ₃	Gânglios autônomos: principalmente pós-sinápticos	Excitatório ↑Permeabilidade de cátions (K ⁺ e Na ⁺)
SNC (α4) ₂ (β2) ₃	Muitas regiões do cérebro: pré e pós-sináptico	Excitatório ↑Permeabilidade de cátions (K ⁺ e Na ⁺)
SNC (α7) ₅	Muitas regiões do cérebro: pré e pós-sináptico	Excitatório ↑Permeabilidade de cátions (Ca ²⁺)

Fonte: Adaptado de Rang, et al, 2007.

Principais substâncias que afetam o sistema colinérgico

O carbacol ou carbamilcolina é uma droga agonista colinérgica direta que de modo semelhante à acetilcolina, age em receptores nicotínicos e muscarínicos do tipo M2-símile, mas não é facilmente hidrolisada. O betanecol é um híbrido do carbacol e metacolina que

apresenta seletividade muscarínica e é utilizado ocasionalmente na clínica no esvaziamento da bexiga e para aumentar a motilidade do trato gastrintestinal. A pilocarpina é o fármaco mais eficaz e mais utilizado na prática clínica, pois possui a capacidade de atravessar a membrana conjuntival e é muito utilizada no tratamento de glaucoma.(Rang, Dale *et al.*, 2007).

Outro fármaco bastante utilizado na prática clínica é um antagonista muscarínico e objeto de estudo nessa dissertação, a atropina. Esta substância é uma alcalóide extraído da planta *Atropa belladonna*. Sua ação se dá pelo mecanismo de competição do receptor, inibindo a ação da acetilcolina sobre o órgão efector por apresentarem uma configuração química semelhante. Esta competição ocorre apenas nos receptores muscarínicos e sua intensidade não é semelhante em todos os órgãos (Larini, 1997). Desta forma, a atropina reverte apenas sintomas muscarínicos muitas vezes observado em intoxicações por carbamatos e organofosforados ou intoxicações com comprometimento cardíaco.

Relação entre Etanol e Sistema Colinérgico

A acetilcolina (Ach), neurotransmissor relacionado principalmente com a memória e comportamento motor (no corpo estriado), também pode ser modulada pela ação do etanol. Evidências sugerem que efeitos neurofisiológicos, como por exemplo, o processo de aprendizagem e memória estão relacionado ao consumo de etanol. Estudos que avaliam funções cognitivas associam a ingestão crônica de etanol com a redução na concentração cerebral de acetilcolina, tanto em humanos quanto em ratos, causada por degeneração do tecido cerebral (Zaleski, Morato *et al.*, 2004).

Estudos de eletrofisiologia, farmacologia e neurofarmacologia sugerem que o etanol pode modular a liberação de acetilcolina (STANCAMPIANO *et al.*, 2004) ou interagir com receptores colinérgicos. Assim, tem sido demonstrado que as alterações locomotoras, bem como reforço pelo consumo da droga, podem também está relacionada ao sistema colinérgico (Larsson e Engel, 2004).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A interação do álcool com os sistemas dopaminérgico e colinérgico ainda não está totalmente esclarecida e um dos objetivos desse estudo foi verificar as alterações que o etanol pode induzir em regiões do sistema nervoso central, no sentido de indicar possíveis mecanismos pelo qual o etanol atua nesse sistema, principalmente na neurotransmissão dopaminérgica e colinérgica. A indicação desses mecanismos certamente ajudará na perspectiva terapêutica para a dependência do etanol (comportamento relacionado com o sistema dopaminérgico), bem como para a diminuição dos efeitos relacionados a aprendizado e memória (sistema colinérgico). O estudo do abuso de drogas, entre elas o etanol, é de extrema importância para a nossa sociedade, visto que estamos observando um aumento acentuado de dependentes em nosso meio, principalmente de crianças e adolescentes, o que acarreta um grande problema social.

Em função da alta frequência do uso do álcool e dos inúmeros riscos à saúde advindos deste consumo, uma compreensão da interação deste com neurotransmissores do sistema nervoso central se faz necessária.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais:

Estudar as alterações comportamentais e neuroquímicas produzidas em corpo estriado de camundongos jovens submetidos a tratamento subcrônico com etanol na presença e ausência de drogas bloqueadoras dopaminérgicas e colinérgicas.

3.2 Específicos:

- Avaliar o comportamento de animais submetidos a diferentes doses de etanol sozinho ou associado com antagonista dopaminérgico ou colinérgico em modelos de comportamento motor e ansiedade;
- Estudar as alterações neuroquímicas em corpo estriado de camundongos tratados subcrônicamente com etanol sozinho ou associado com antagonista dopaminérgico ou colinérgico, através de determinações dos níveis de monoaminas (Norepinefrina, Dopamina e ácido 3, 4-dihidroxifenilacético);
- Determinar a atividade Acetilcolinesterásica (AChE) em corpo estriado de camundongos jovens, após tratamento subcrônico com etanol sozinho ou associado com antagonista dopaminérgico ou colinérgico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 108 camundongos Swiss, adultos-jovens, 2 - 4 meses, fêmeas, com peso variando entre 25 - 30 g. Os animais foram provenientes do Biotério central da Universidade Federal do Ceará e do biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina desta mesma Universidade.

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 10 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão tipo purina e água *ad libitum*. A manipulação dos animais, antes, durante e depois dos experimentos, foi conduzida de acordo com as regras de manipulação de animais de laboratório, preconizadas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e foram seguidas as normas do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará.

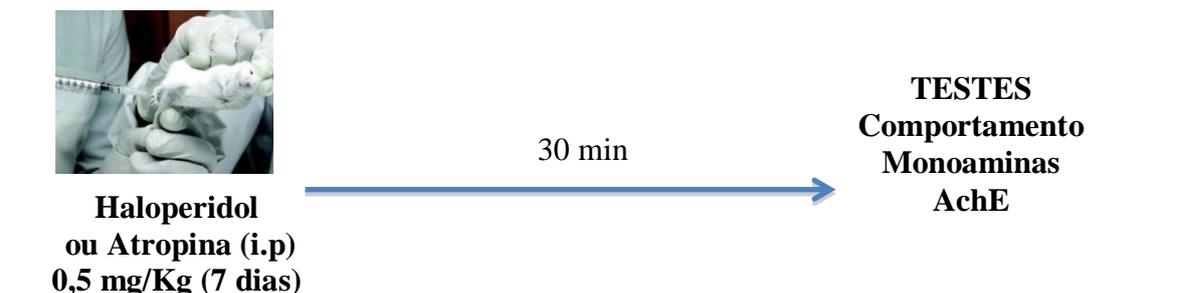
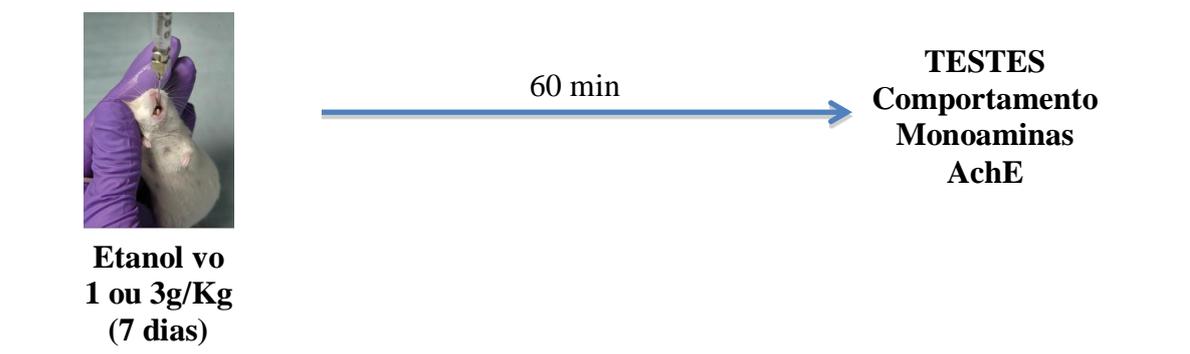
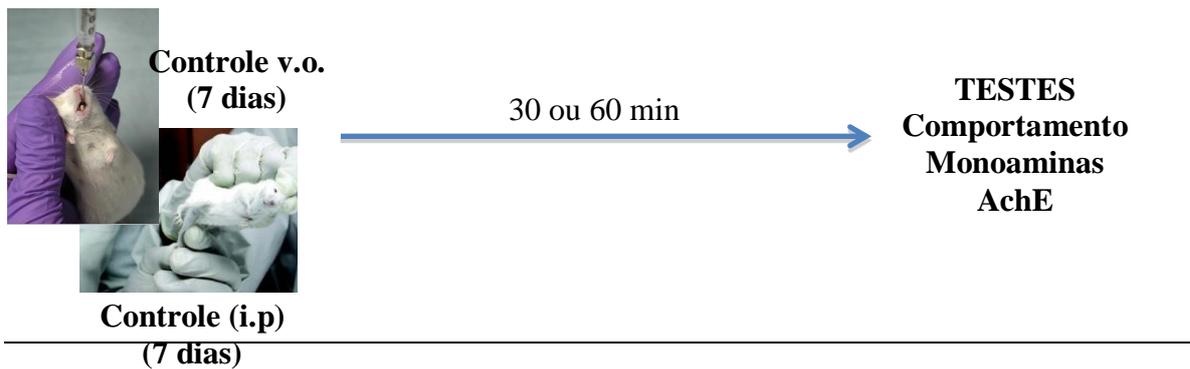
4.2 Preparo das substâncias

- Etanol: O álcool etílico a 95%, P.A. (Merck, Alemanha) foi utilizado para o preparo de solução a 20% em água bidestilada. O etanol foi administrado nos animais nas seguintes doses: 1 ou 3g/kg, via oral (gavagem).
- Atropina (Sigma): Foi administrada na dose de 0,5 mg/kg, via intraperitoneal).
- Haloperidol: (Haloperidol-ampola de 5 mg/mL- Lab. Cristália) foi administrado na dose de 0,5 mg/kg, via intraperitoneal.

4.3 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com água destilada (controle), etanol (via oral) ou pré tratados com haloperidol (bloqueador dopaminérgico) ou atropina (bloqueador colinérgico), essa aplicação foi feita trinta minutos antes da administração do etanol ou água destilada diariamente durante 7 dias. Para o tratamento por via oral foi utilizada uma cânula intragástrica de polietileno. Trinta minutos após a última administração das drogas por via intraperitoneal e sessenta minutos após a última administração por via oral, os

animais foram submetidos aos testes de comportamento e, posteriormente, sacrificados com dissecação do corpo estriado para os testes neuroquímicos.



4.4 Estudo Comportamental

4.4.1 Teste do campo aberto

O campo aberto (figura 6) para camundongos foi feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividido em nove quadrantes iguais. O campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (Archer, 1973). Os principais parâmetros observados foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*), número de levantamentos (*rearing*), registrados durante um tempo de 4 minutos, após 1 minuto de habituação. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente novo.



Figura 6: Equipamento para teste do campo aberto

4.4.2 Teste do *Rota Rod*

Para o teste do *rota rod*, os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm (Figura 7). Os animais selecionados receberam o tratamento e foram colocados no equipamento por 1 min. Foi registrado o número de quedas, com três reconduções, no máximo (Dunham e Miya, 1957). Este teste permite avaliar se os tratamentos promovem incoordenação motora nos animais por sedação e/ou relaxamento muscular.



Figura 7: Equipamentos para o teste de *Rota rod*

4.4.3 Teste da placa perfurada (*Hole-board*)

O *hole board* (figura 8) consiste numa caixa quadrada de acrílico preto (50 x 50 cm) 10 cm de altura, 16 orifícios de 2 cm de diâmetro, equidistantes uns dos outros e das bordas. Foi registrado durante 5 minutos o número de vezes que os animais espreitaram os orifícios, usando-se como condição mínima de espreitamento a colocação da cabeça nos orifícios até o nível das orelhas dos animais para avaliação de possível ação ansiolítica/ansio gênica do etanol. Um aumento no número e no tempo despendido espreitando os orifícios implica numa maior atividade exploratória ou uma ação ansiolítica, assim como uma redução neste parâmetro, quando comparados aos valores do grupo controle, é compatível com uma ação ansio gênica (File e Pellow, 1985).

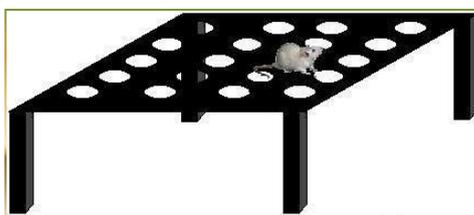


Figura 8: Placa perfurada

4.4.4 Teste do Labirinto em cruz elevado (*Plus maze*)

O labirinto em cruz elevado (LCE) é baseado no modelo proposto, em ratos, por Pellow (Pellow, Chopin *et al.*, 1985) e validado por Lister (Lister, 1987) para camundongos, e consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz grega. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma (figura 9), as paredes laterais dos braços fechados e o chão foram confeccionados em acrílico. O aparelho fica elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Uma hora (v.o.) ou meia hora (i.p.) após os tratamentos ou o veículo administrado, os camundongos foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 minutos.

As medidas comportamentais registradas no LCE foram: número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados. Neste modelo, os roedores evitam os braços abertos do labirinto, restringindo a maioria de suas atividades aos braços fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um efeito ansiolítico (Pellow, Chopin *et al.*, 1985; Pellow e File, 1986), e o inverso é verdade para compostos ansiogênicos. O número de entradas nos braços fechados avalia a atividade motora dos animais (Rodgers, Johnson *et al.*, 1996; Rodgers e Dalvi, 1997).



Figura 9: Labirinto em cruz elevada

4.5 Estudos Neuroquímicos

4.5.1 Determinação de monoaminas

Os animais foram decapitados após os testes comportamentais com uma guilhotina e, em seguida, o corpo estriado foi retirado e imediatamente sobre papel alumínio numa placa de *petri* com gelo. O corpo estriado foi isolado das estruturas e utilizado para preparar homogenatos a 10 %. O tecido cerebral foi sonificado em ácido perclórico (HClO₄) por 30 segundos e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada. Uma alíquota de 20 µl do sobrenadante foi injetada no equipamento de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Figura 11) com detecção eletroquímica, para a análise química. Para a análise das monoaminas foi utilizada uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 µm, da Shimadzu-Japão. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v. NE, DA e DOPAC foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl. Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng de NE, DA e DOPAC (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculadas no programa *Microsoft Excel* em um computador PC e os resultados expressos em ng/g de tecido.



Figura 11: Aparelho de HPLC

Determinação da atividade da Enzima Acetilcolinesterase

A atividade acetilcolinesterásica foi determinada segundo Ellman e colaboradores (Ellman, Courtney *et al.*, 1961), tendo como princípio à medida da velocidade de produção

de tiocolina à proporção que a acetiltiocolina (ATC) utilizada como substrato é hidrolisada. Isto é acompanhado pela reação contínua do grupo tiol com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitro-benzóico, cuja coloração é medida em 412nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permite leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade.

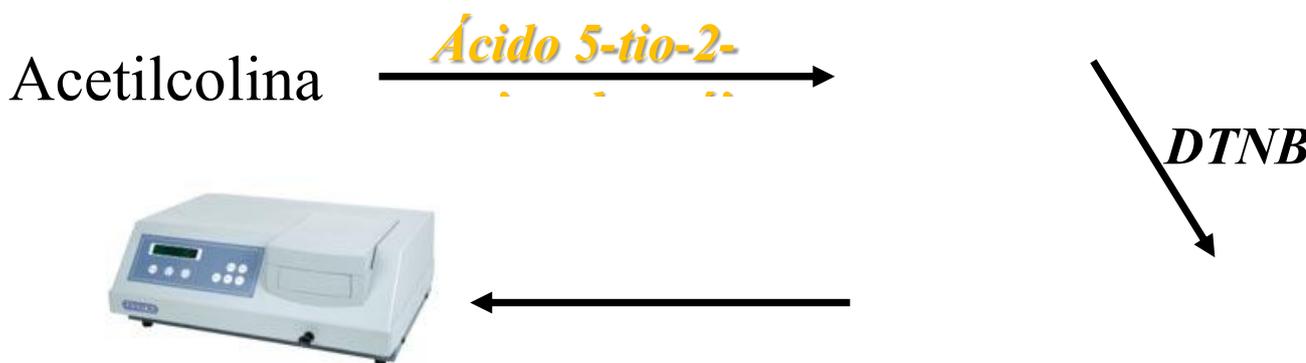


Figura 12: Ilustração da reação de identificação da acetilcolinesterase

O método de Bradford foi utilizado na determinação de proteínas totais, este método utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Ele é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595nm (Zaia, Zaia et al., 1998), os resultados foram observados no leitor de ELISA. A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 3 minutos. A atividade específica foi expressa em nanomoles de ATC hidrolisados por miligrama de proteína por minuto (nmoles/mg de proteína/min).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através do software *GraphPad Prism* versão 5.0 para *Windows*, *GraphPad Software*, San Diego California EUA. Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey (*post hoc*). Em todas as análises estatísticas, os valores foram representados pela Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) com o número de

animais entre parênteses e foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO COMPORTAMENTAL

5.1.1 Teste do campo aberto

A atividade locomotora espontânea (ALE), *rearing* (levantamento das patas dianteiras) e *grooming* (comportamento de autolimpeza) foram os parâmetros analisados e os resultados foram expressos como número de travessias, de *rearing* e *grooming*. Como demonstrado na figura 13, quando comparado ao controle [$32,08 \pm 0,83$ (13)], o etanol (ET) em doses baixas (1g/kg, vo) [$38,29 \pm 1,81$ (8)] apresentou um efeito estimulante sobre a atividade exploratória dos animais, uma vez que mostrou um aumento no número de cruzamentos no teste de campo aberto [$F(4,38)=121,5;p<0,05$]. Por outro lado, doses mais altas de etanol [3g/Kg, vo: $6,22 \pm 0,78$ (9)], mostrou efeito depressor visualizado pela acentuada redução no número de cruzamentos. Resultado semelhante foi observado pela administração de haloperidol (HALO 0,5mg/kg, ip) [$7,400 \pm 1,9$ (7)] na realização do mesmo teste [$F(4,38)=121,5;p<0,001$]. A associação de haloperidol 0,5mg/kg + etanol 1g/kg (HALO + ET1) diminui a ALE [$1,80 \pm 0,58$ (6)], revertendo assim o efeito do etanol (ET1) sozinho [$F(2,16)=187,5;p<0,001$]. Já na associação do haloperidol com o etanol na maior dose (ET3) [$0,40 \pm 0,24$ (6)] foi observado uma potencialização da ação de diminuir a ALE quando comparado com as drogas sozinhas [$F(2,18)=14,68;p<0,001$]. Embora a atropina sozinha [$33,80 \pm 2,458$ (6)] não tenha produzido nenhum efeito nesse parâmetro, quando comparado ao grupo controle [$32,08 \pm 0,83$ (13)], a associação de atropina com etanol [ATROP + ET1: $39,67 \pm 1,76$ (6)] mostrou que atropina não modificou o efeito estimulante do etanol na menor dose, já a associação na maior dose [ATROP + ET3: $3,600 \pm 0,8124$ (6)] diminuiu significativamente a ALE quando comparados à ATROP, ET1 ou ET3 [$F(2,14)=96,68;p<0,001$].

Considerando o comportamento de *rearing* (Figura 14) o etanol somente apresentou um efeito de diminuição do número de levantamentos [$0,0 \pm 0,0$ (9)] na maior dose (ET3), quando comparado ao grupo controle [$16 \pm 0,67$ (13)]. A administração de atropina [$11,6 \pm 0,93$ (6)] ou haloperidol [$0,0 \pm 0,0$ (6)] sozinhos também diminuíram o número de *rearing* quando comparado ao grupo controle [$F(4,36)=115,0;p<0,0001$]. Os grupos associados [HALO + ET1: $1 \pm 0,4472$ (6) ou ET3: $0,0 \pm 0,0$ (6); ATROP + ET1: $2,8 \pm 0,8$ (6) ou ET:

0,0 ± 0,0 (6)] apresentaram uma importante diminuição no número de rearing [F(2,16)=63,94;p<0,0001]. Esse efeito foi maior nas associações com Etanol 3mg/kg (HALO+ET3 ou ATROP +ET3), sugerindo assim um efeito potencializador do etanol na dose na maior dose.

Na avaliação da ocorrência de comportamento de autolimpeza (*grooming*) na figura 14, quando comparado ao controle [1,93 ± 0,24 (13)], animais tratado com ET1 [3,6 ± 0,4 (6)] apresentaram um aumento do número desse comportamento [F(2,16)=16,96;p<0,01], contrastando com animais tratados isoladamente com ET3 [0,44 ±0,17 (9)] ou HALO [0,6 ± 0,24 (6)], que mostraram uma redução desses eventos [F(2,16)=16,96;p<0,001] e [F(2,16)=16,96;p<0,05], respectivamente. O grupo (HALO+ET1) [1,400 ±0,2449 (6)] assim como de (ATROP + ET1) [1,600 ±0,2449 (6)] resultou em menos eventos de grooming em comparação ao grupo que recebeu a administração apenas de ET1 [F(2,16)=15,86;p<0,001]; [F(2,16)=15,86;p<0,01], respectivamente, mostrando que o os bloqueio do sistemas dopaminérgico e colinérgico contribuíram para essa ação.

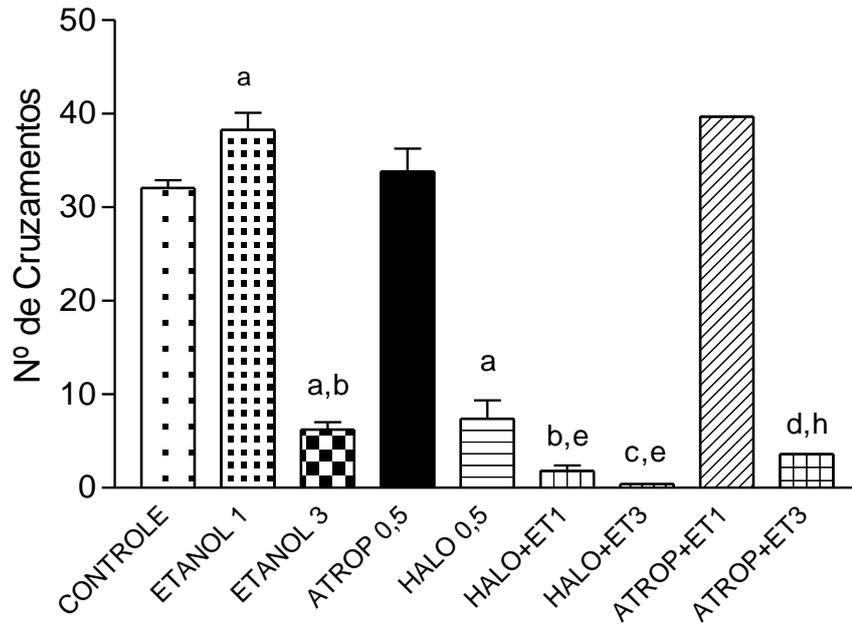


Figura 13 – Número de cruzamentos realizados por diferentes grupos de animais sob o tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina atividade locomotora de camundongos. Etanol (ET) (1 ou 3g/kg), haloperidol (HALO) (0,5mg/kg), atropina (ATROP) (0,5mg/kg), ou veículo (controle) foram administrados. No protocolo de associação, os animais foram pré-tratados com haloperidol 0,5mg/kg, ou atropina 0,5mg/kg e 30 minutos após com etanol (1 ou 3g/kg). Sessenta minutos após administração de etanol, os animais foram testados no aparato do campo aberto. Os resultados foram expressos considerando $p < 0.05$ e IC 95% (ANOVA seguida por Tukey como teste *post hoc*).

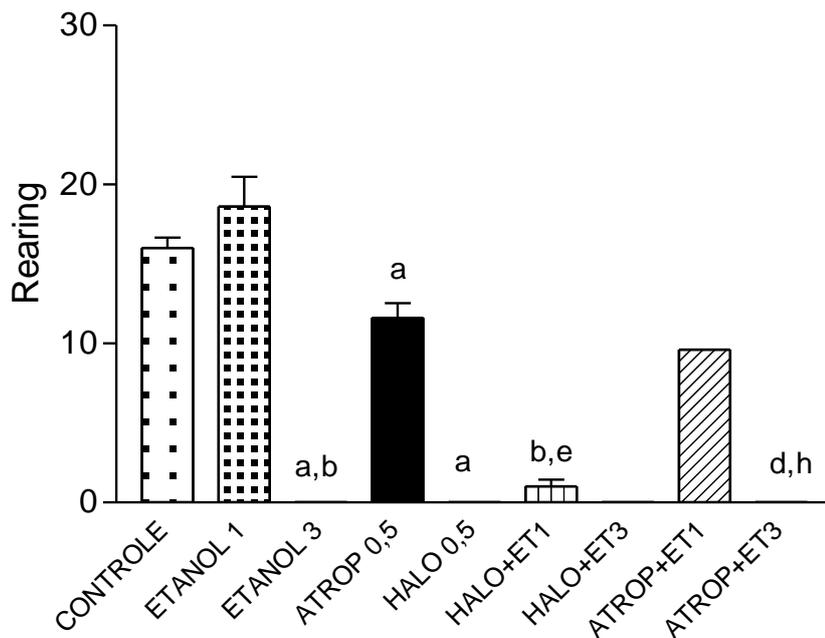


Figura 14 - Efeito do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina (*rearing*) de camundongos. Etanol (ET) (1 ou 3g/kg), haloperidol (HALO) (0,5mg/kg), atropina (ATROP) (0,5mg/kg), ou veículo (controle) foram administrados. No protocolo de associação, os animais foram pré-tratados com haloperidol 0,5mg/kg, ou atropina 0,5mg/kg e 30 minutos após com etanol (1 ou 3g/kg). Sessenta minutos após administração de etanol, os animais foram testados no aparato do campo aberto. Os resultados foram expressos considerando $p < 0.05$ e IC 95% (ANOVA seguida por Tukey como teste *post hoc*).

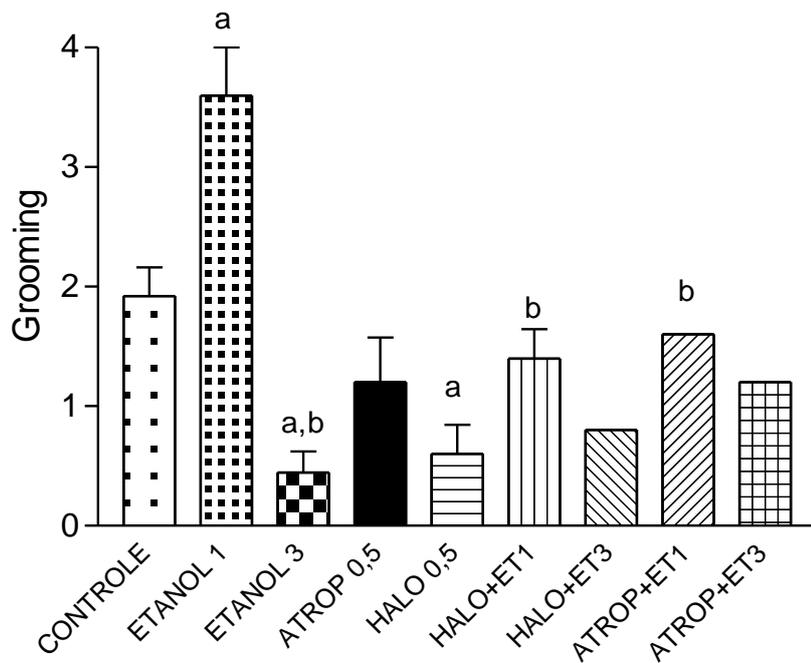


Figura 15 - Efeito do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina (*grooming*) de camundongos. Etanol (ET) (1 ou 3g/kg), haloperidol (HALO) (0,5mg/kg), atropina (ATROP) (0,5mg/kg), ou veículo (controle) foram administrados. No protocolo de associação, os animais foram pré-tratados com haloperidol 0,5mg/kg, ou atropina 0,5mg/kg e 30 minutos após com etanol (1 ou 3g/kg). Sessenta minutos após administração de etanol, os animais foram testados no aparato do campo aberto. Os resultados foram expressos considerando $p < 0.05$ e IC 95% (ANOVA seguida por Tukey como teste *post hoc*).

5.1.2 Teste do *Rota Rod*

O parâmetro avaliado neste teste foi o número de quedas do animal no aparelho, considerando que na terceira queda o animal não era mais colocado na plataforma giratória.

Como mostrado na figura 16, os animais tratados com etanol sozinho (1g/kg ou 3g/kg) [$1,1 \pm 0,11$ (6)]; [$3 \pm 0,0$ (9)] apresentaram aumento no número de quedas (NQ) [$F(4,48) = 60,06; p < 0,0001$] quando comparado ao controle [$0,3571 \pm 0,1329$ (14)], mostrando que independente da dose o etanol altera esse comportamento e que na dose maior (ET3) esse parâmetro se mostra mais acentuado, ou seja o número de quedas foi significativamente maior que na dose menor (ET1), quando comparados a essa mesma dose. Quanto às alterações provocadas pelas as associações (HALO + ET1 ou ATROP + ET1) foram inversas. A associação com haloperidol 0,5mg/kg [$1,571 \pm 0,2020$ (6)] aumentou o NQ, indicando um efeito potencializador do mesmo, e, a associação com atropina 0,5mg/kg [$0,3333 \pm 0,2020$ (6)], diminuiu esse parâmetro, indicando uma possível reversão do efeito do etanol. Das associações com haloperidol 0,5mg/kg, a única que apresentou alteração significativa foi quando associado a maior dose de etanol (3g/kg) [$3,000 \pm 0,0$ (6)] em comparação com a associação com a menor dose (1g/kg) [$1,571 \pm 0,2020$ (6)], mostrando que o etanol ocupa um papel importante nessa redução da incapacidade de se manter na plataforma.

A associação com atropina 0,5 mg/ kg que mostrou alteração significativa foi com o etanol na maior dose (ATROP + ET3) [$1,625 \pm 0,4605$ (6)]. Quando comparado a administração do etanol sozinho (3g/kg) [$3,000 \pm 0,0$ (9)], a atropina parece reverter o efeito do etanol evidenciado pela diminuição do número de quedas da plataforma [$F(2,24) = 9,527; p < 0,01$] e um aumento do NQ quando comparado apenas a atropina 0,5mg/kg [$0,1250 \pm 0,1250$ (6)], enfatizando a contribuição do etanol na dose de 3g/kg para o aumento desse parâmetro.

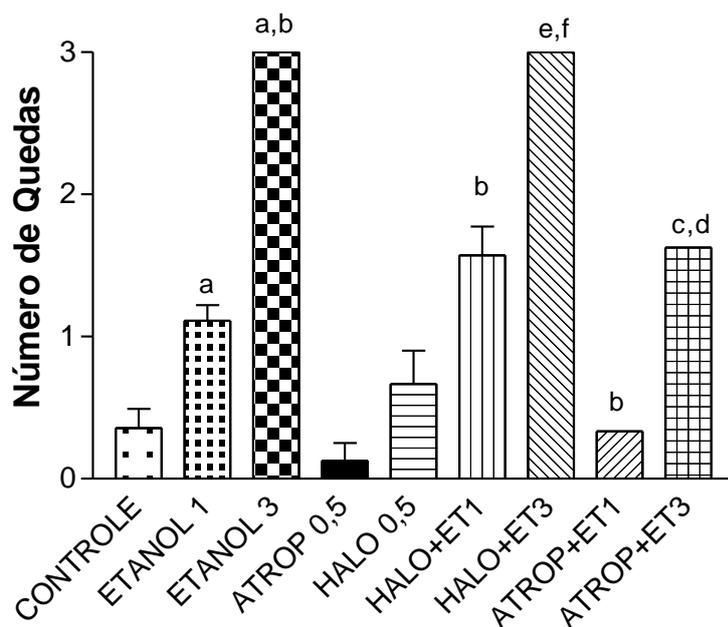


Figura 16 - Efeito do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina na atividade locomotora através teste do *rota rod* de camundongos. Etanol (ET) (1 ou 3g/kg), haloperidol (HALO) (0,5mg/kg), atropina (ATROP) (0,5mg/kg), ou veículo (controle) foram administrados. No protocolo de associação, os animais foram pré-tratados com haloperidol 0,5mg/kg, ou atropina 0,5mg/kg e 30 minutos após administração de etanol, os animais foram testados no aparato do campo aberto. Os resultados foram expressos considerando $p < 0.05$ e IC 95% (ANOVA seguida por Tukey como teste *post hoc*).

5.1.3 Teste da Placa Perfurada (*Hole Board*)

Quando avaliado o parâmetro deste teste, apenas os animais tratados com ET3 [$1,22 \pm 0,2$ (9)] ou HALO [$6,2 \pm 0,66$ (6)] apresentaram redução números de mergulhos quando comparados ao do grupo controle [$23,43 \pm 0,99$ (13)] [$F(4,37)= 90,91; p<0,001$]. Como mostra a figura 17. Os grupos tratados com a combinação (HALO + ET1) [$2,0 \pm 0,55$ (6); ($p<0,001$), ou ET3 [$1,2 \pm 0,22$ (9)]; $p <0,001$) apresentaram uma redução no número de mergulhos quando comparados os animais tratados com ET1 [$22,00 \pm 1,581$ (6)] isoladamente [$F(2,16)= 82,67; p<0,001$], indicando um possível efeito potencializador do etanol dessas associações, em contrapartida a associação ATROP + ET1 [$29,6 \pm 1,77$ (6); $p<0,01$] provocou um aumento desse parâmetro, paracendo potencializar o efeito do etanol.

Uma potencialização do efeito de etanol na maior dose ocorreu ao ser administrado associado com o haloperidol (HALO + ET3) [$0,0 \pm 0,0$ (6)] em comparação com ET3 ou HALO sozinho, considerando o fato de que o animal não introduziu a cabeça no orifício uma única vez. O tratamentos associado com atropina (ATROP + ET1 ou ET3) apresentaram uma redução no número de mergulhos quando comparado ao grupo tratado apenas com atropina isolada [$F(2,16)=1,81; p<0,001$]. O ET3 parece potencializar a redução do número de mergulhos gerada pelo haloperidol ou atropina com a relação dose dependente.

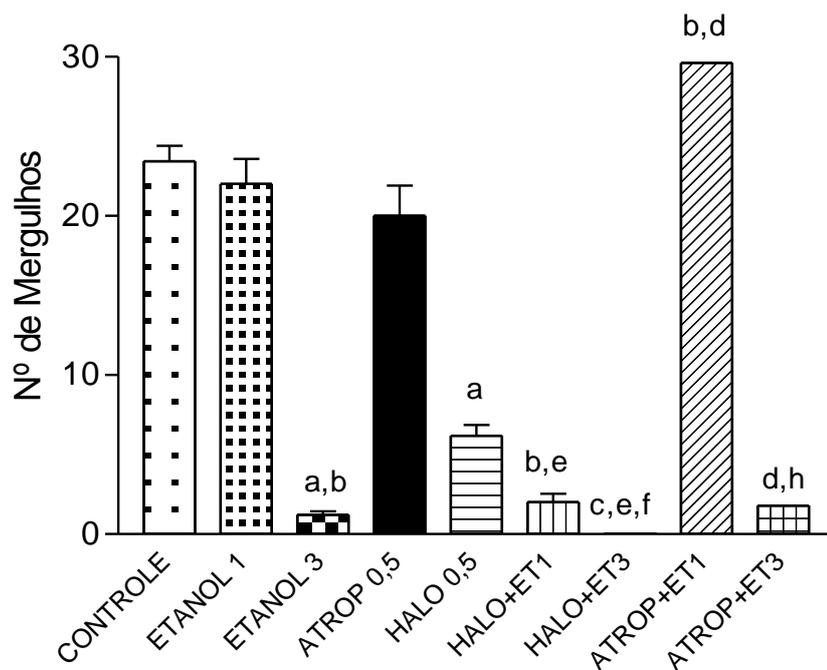


Figura 17 - Avaliação da atividade ansiolítica do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina no teste da placa perfurada. Etanol (ET) (1 ou 3g/kg), haloperidol (HALO) (0,5mg/kg), atropina (ATROP) (0,5mg/kg), ou veículo (controle) foram administrados. No protocolo de associação, os animais foram pré-tratados com haloperidol 0,5mg/kg, ou atropina 0,5mg/kg e 30 minutos após com etanol (1 ou 3g/kg). Sessenta minutos após administração de etanol, os animais foram testados no aparato do campo aberto. Os resultados foram expressos considerando $p < 0.05$ e IC 95% (ANOVA seguida por Tukey como teste *post hoc*).

5.1.4 Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*)

Neste teste foi avaliado o número de entrada em cada braço (aberto e fechado) e o tempo de permanência nos respectivos braços.

Como demonstrado na figura 18a (tempo de permanência no braço fechado) e 18b (número de entradas no braço fechado), quando comparado ao controle [TPBF: 175,6 ± 3,222 (14); NEBF: 7,30 ± 0,21 (14)], os animais tratados com ET1 [100,8 ± 12,68 (6)] provocaram redução no tempo de permanência no braço fechado (TPBF), ao contrário dos animais que receberam ET3 [228,3 ± 13,29(9)], no qual observou-se aumento no TPBF [F(4,37)=39,30;p<0,001] e redução do número de entradas no Braço fechado (NEBF) [0,89 ± 0,11 (9)]. Efeito semelhante foi observado quando administrado haloperidol sozinho [TPBF: 274,6 ± 4,84 (6); NEBF: 1,40 ± 0,24 (6)]. Na associação de haloperidol (HALO + ET1 ou ET3) observou-se uma redução significativa do NEBF quando comparados com etanol ou haloperidol sozinho [F(2,16)=26,3;p<0,001], [F(2,16)=12,3;p<0,05] para a primeira associação e apenas comparado ao etanol sozinho [F(2,18)=28,95;p<0,001] para segunda. Comparados apenas a haloperidol sozinho [274,6 ± 4,8 (6)], a associação HALO + ET1 [99 ± 3,5 (6)] teve o TPBF aumentado, contrastando com a associação HALO + ET3 [0,0 ± 0,0 (6)] que teve esse parâmetro diminuído, possivelmente devido à imobilidade do animal.

Quando comparada ao controle, a administração de atropina 0,5mg/kg, ip não provocou alteração significativa nos parâmetros analisados, no entanto, quando associada ao etanol 1g/kg, vo (ATROP + ET1) apresentou redução no NEBF [1,400 ± 0,5099 (6)] quando comparado ao tratado com etanol isolado (ET1) [7,200 ± 1,068 (6)] ou ATROP [7,600 ± 0,8124 (6)] e aumento no TPBF [193,4 ± 2,993(6)] apenas para quando comparado com ET1 [100,8 ± 12,68 (6)]. Comportamento semelhante foi observado nos animais tratados com ATROP + ET3 quando comparado ao grupo tratado com atropina isolada [F(2,16)=7,792;p<0,001]; [F(2,16)= 44,65;p<0,001].

Os resultados do teste de plus maze no braço aberto mostram que em comparação ao controle [TPBA: 38,07 ± 2,183 (14); NEBA: 9,4 ± 0,509 (14)]

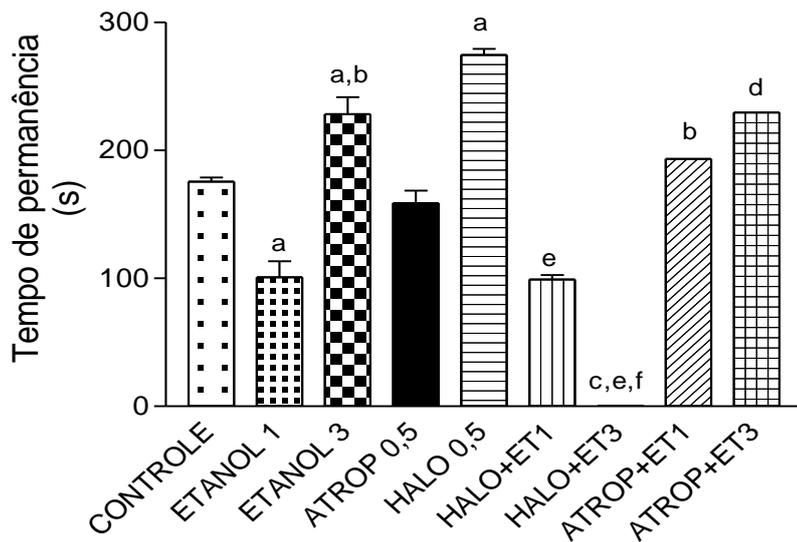


Figura 18a - Avaliação do tempo de permanência no brano teste de plus maze do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina no teste de *plus maze*. Etanol (ET) (1 ou 3g/kg), haloperidol (HALO) (0,5mg/kg), atropina (ATROP) (0,5mg/kg), ou veículo (controle) foram administrados. No protocolo de associação, os animais foram pré-tratados com haloperidol 0,5mg/kg, ou atropina 0,5mg/kg e 30 minutos após com etanol (1 ou 3g/kg). Sessenta minutos após administração de etanol, os animais foram testados no aparato do campo aberto. Os resultados foram expressos considerando $p < 0.05$ e IC 95% (ANOVA seguida por Tukey como teste *post hoc*).

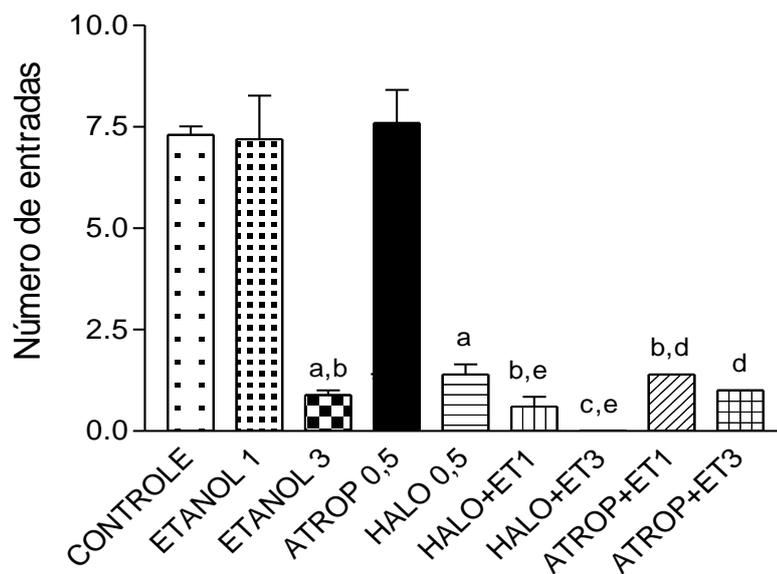


Figura 18b - Avaliação da atividade ansiolítica do tratamento subcrônico de etanol isolado ou associado ao haloperidol ou atropina no teste de *plus maze*. Etanol (ET) (1 ou 3g/kg), haloperidol (HALO) (0,5mg/kg), atropina (ATROP) (0,5mg/kg), ou veículo (controle) foram administrados. No protocolo de associação, os animais foram pré-tratados com haloperidol 0,5mg/kg, ou atropina 0,5mg/kg e 30 minutos após com etanol (1 ou 3g/kg). Sessenta minutos após administração de etanol, os animais foram testados no aparato do campo aberto. Os resultados foram expressos considerando $p < 0.05$ e IC 95% (ANOVA seguida por Tukey como teste *post hoc*).

5.2 ESTUDO NEUROQUÍMICO

5.2.1 Concentrações de monoaminas em corpo estriado de camundongos tratados com etanol sozinho ou associado com bloqueadores colinérgico e dopaminérgico através de HPLC

A Tabela 4 mostra os resultados após administrações de etanol (1g/kg ou 3g/kg, v.o.) ou em associação com haloperidol (HALO 0,5mg/kg, i.p) ou atropina (ATROP 0,5mg/kg, i.p.), sobre os níveis de monoaminas e seus metabólitos (NE, DA e DOPAC) em ng/g de tecido em corpo estriado de camundongos.

Foi observado que a concentração de NE não apresentou alteração significativa em nenhum grupo quando comparado ao controle, porém apresentou-se aumentada [F(2,16)=12,42; p<0,0001] nos grupos com a administração de etanol na maior dose associado com haloperidol 0,5mg/kg ou atropina 0,5mg/kg quando comparado ao grupo tratado apenas com etanol.

Nas análises da concentração de dopamina, foi observada que apenas a administração isolada de haloperidol 0,5mg/kg ou atropina 0,5mg/kg provocaram uma redução significativa nos níveis dessa amina quando comparados ao grupo controle [F(4,24)=62,21;p<0,0001]. Quando houve a administração associada (HALO ou ATROP + ET1), observou-se uma redução significativa dos níveis de dopamina quando comparado ao grupo tratado apenas com ET1 [F(2,15)= 112,2;p<0,0001], no entanto, quando comparado com a administração de haloperidol 0,5mg/kg ou atropina 0,5mg/kg isoladas, as associações com haloperidol 0,5mg/kg apresentam apenas uma tendência no aumento desses níveis, enquanto a associação ATROP + ET1 apresenta um aumento significativo desses níveis [F(2,16)=33,43;p<0,001]. O mesmo foi observado com as associações (HALO ou ATROP + ET3) quando comparados a administração isolada de etanol 3g/kg [F(2,15)= 372,0;p<0,0001], mostrando um possível efeito potencializador do etanol e uma tendência discreta de reversão dos níveis quando atropina isolada.

Como esperado, quando comparados ao controle, os níveis de DOPAC se mostraram aumentados nos grupos tratados isoladamente com haloperidol 0,5mg/kg, porém esse comportamento também foi observado na administração de atropina 0,5mg/kg [F(4,25)=7,96;p<0,0005]. Na associação (HALO + ET3), os níveis de DOPAC aumentaram significativamente quando comparada aos grupos tratados com ET3, HALO ou (HALO + ET1) [F(3,21)= 16,82;p<0,001].

O grupo com associação da atropina 0,5mg/kg com etanol em dose alta (3g/kg) apresentou diferença significativa apenas quando comparado à associação em doses baixas de etanol [F(2,14)=5,181;p<0,05].

Tabela 4: - Efeitos do etanol sozinho ou associado com haloperidol ou atropina nos níveis de monoaminas no corpo estriado de camundongos

	NE(n)	DA(n)	DOPAC(n)
CONTROLE	44,08 ± 7,14 (6)	3228 ± 656,6 (6)	942,2 ± 80,6 (5)
ET 1	46,34 ± 10,42 (6)	4406 ± 507,8 (6)	1138 ± 116,3 (6)
ET 3	31,42 ± 2,99 (6)	3674 ± 233 (6)	1017 ± 125 (6)
ATROP 0,5	53,24 ± 1,37 (5)	107,7 ± 23,36 (6) ^a	1362 ± 96,65 (6) ^a
HALO 0,5	65,10 ± 4,30 (6)	282,6 ± 84 (6) ^a	1714 ± 144 (6) ^a
HALO 0,5 + ET 1	49,17 ± 8,17 (5)	533,2 ± 175,9 (6) ^b	1654 ± 329,9 (6)
HALO 0,5 + ET 3	54,03 ± 3,0 (6) ^c	142,5 ± 28,5 (6) ^c	3751 ± 437,4 (6) ^{c, e, f}
ATROP 0,5 + ET1	51,15 ± 6,9 (5)	703,1 ± 85,5 (6) ^{b, d}	1453 ± 1619 (6)
ATROP 0,5 + ET3	59,94 ± 6,0 (6) ^c	146,3 ± 32,8 (6) ^c	1052 ± 100 (5) ^h

NE - Norepinefrina; DA - Dopamina; DOPAC - ácido 3, 4-dihidroxifenilacético . Os dados são apresentados como a média ± E.P.M. ^{a,b,c,d,h,i, e,f,g} p<0.05 comparados com grupo controle, etanol, atropina isolada e suas associações, haloperidol isolado e sua associações, respectivamente (ANOVA seguida por Tukey como teste *post hoc*).

5.2.2 Atividade da enzima acetilcolinesterase em corpo estriado de camundongos tratados com etanol sozinho ou associado com bloqueadores colinérgico e dopaminérgico através de espectrofotômetro.

A figura 20 (A, B) mostra os efeitos da administração subcrônica de etanol, atropina 0,5mg/kg ou haloperidol 0,5mg/kg (sozinhos ou em associação) sob a atividade da enzima acetilcolinesterase no corpo estriado de camundongos.

Quando comparados ao controle (A), houve uma redução importante da atividade de AchE quando administrados todas as drogas isoladas [F(2,27)=15,36;p<0,0001].

Os resultados expostos na figura 20 (B), indicam que a associação (ATROP + ET3) [(57,24 ± 5,9 (6))] reduziu a atividade de AchE quando comparada administração de ET3 [161,2 ± 36,7 (9)] ou (ATROP + ET1) [85,1 ± 8,4(6)] [F(2,15)=13,18;p<0,0001]. Esta última associação provocou aumento da atividade de AchE em relação a administração isolada de atropina 0,5mg/kg [39,05 ± 3,1(6)], enquanto a associação (HALO + ET3) [78,77 ± 8,6(6)] mostrou redução apenas quando comparada a ET3 [161,2 ± 36,7(6)] [F(2,15)= 6,197;p<0,002].

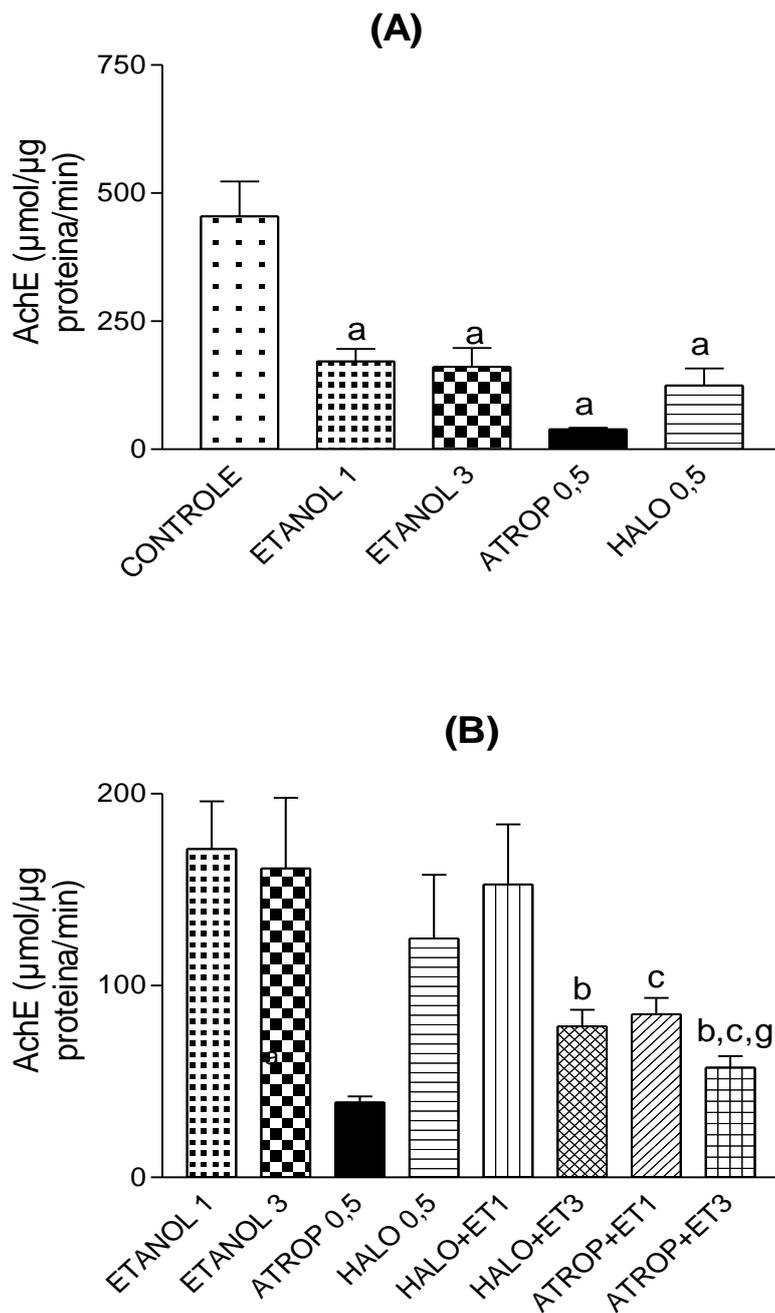


Figura 20: Efeitos do etanol sozinho ou associado com atropina ou haloperidol na atividade de acetilcolinesterase no corpo estriado de camundongos. (A) Grupos isolados. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. ^{a,b,c,d,e} $p < 0.05$ comparados com grupo controle, etanol1, etanol3, atropina, haloperidol, respectivamente. (B) Grupos associados. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. ^{a,b,c,g,h,d,e,f} $p < 0.05$ comparados com grupo etanol1, etanol3, atropina isolada e suas associações, haloperidol isolado e suas associações, respectivamente (ANOVA seguida por Tukey como teste *post hoc*).

6. DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos da associação subcrônica de etanol e bloqueadores do sistema colinérgico (atropina) e dopaminérgico (haloperidol) em modelos comportamentais de atividade locomotora, exploratória e ansiedade, assim como dosagem das concentrações de monoaminas e seus metabólitos no corpo estriado de camundongos e o comportamento da atividade da acetilcolinesterase frente à essas administrações. Estes testes são modelos clássicos para triagem de atividades sobre o sistema nervoso central, incluindo o etanol em animais e fornece informações tais como desempenho psicomotor, locomoção, atividade ansiolítica, miorelaxante.

Efeitos na atividade locomotora e coordenação motora

Os testes utilizados para esta avaliação foram o campo aberto e *rota rod*, considerando que no campo aberto o aumento do número de travessias, *rearing* e *grooming* significa uma efeito estimulante sobre a ALE e que no teste de *rota rod*, o aumento do número de quedas do animal da plataforma giratória evidencia a diminuição da coordenação motora.

Observou-se que o etanol em doses baixas (1g/kg) apresentou efeito estimulante com aumento da atividade locomotora, indicado pelo aumento no número de cruzamentos, *rearing* e *grooming* no teste do campo aberto, porém notou-se um prejuízo na coordenação motora com o aumento do número de quedas no teste do *rota rod*. Já o etanol em doses altas (3g/kg) o efeito apresentado foi oposto, apresentando redução em todos os parâmetros analisados tanto no teste de avaliação da atividade locomotora e coordenação motora, neste último não conseguindo se manter suspenso na plataforma giratória pelo tempo determinado.

O efeito bifásico do etanol é conhecido e foi descrito por Pohorecky em 1997 (Pohorecky, 1977) e confirmado em outros estudos. Em doses baixas, ele induz um transitório efeito excitatório, porém em doses altas ou utilizado cronicamente, exibe um efeito depressor do SNC (Boerngen-Lacerda e Souza-Formigoni, 2000; McIntosh e Chick, 2004; Soares, Patrocínio *et al.*, 2009). Esse efeito antagônico e dose-dependente podem estar relacionado com a grande variedade de neurotransmissores que o etanol pode interferir, incluindo GABA, glutamato, norepinefrina, dopamina, serotonina e acetilcolina (Hunt e Majchrowicz, 1983; Sharko e Hodge, 2008; Theile, Morikawa *et al.*, 2008;

Vasconcelos, Sales *et al.*, 2008). A administração isolada do bloqueador dopaminérgico teve comportamento semelhante ao do etanol na maior dose no teste do campo aberto e uma tendência no aumento do número de quedas na avaliação da coordenação motora. Embora o uso isolado de etanol tenha apresentado perfis de ALE distintos em diferentes doses de etanol, o bloqueio dopaminérgico por haloperidol resultou em redução da ALE independente da concentração de etanol, mostrando a correlação da via dopaminérgica sob a ação do etanol na ALE.

A atividade de locomoção, *rearing*, *grooming* parecem estar relacionadas com a hiperatividade dopaminérgica e a ligação principalmente com o receptor D2. Estudos apontam que o aumento da atividade dopaminérgica induz um maior comportamento desses parâmetros (Dreher e Jackson, 1989; Rowlett, Mattingly *et al.*, 1995).

Outro estudo que mostra os efeitos do haloperidol sobre a atividade locomotora mostra a influencia da dose administrada de haloperidol e a sua correlação com o fenômeno de imobilidade conhecido catalepsia. A catalepsia nos grupos tratados com 0,2 e 0,4 mg/kg de haloperidol foi observada em 30 e 70% dos animais, respectivamente. A dose de 0,1 mg/kg de haloperidol não induziu catalepsia, sugerindo que somente em doses mais elevadas é que esta substância é capaz de causar grande inibição da locomoção (Huang, Shyu *et al.*, 2010).

Num experimento dirigido por (Arias, Mlewski *et al.*, 2010) que utilizou ratos jovens que receberam 2,5 e 3g de etanol/kg foi relatado um aumento na concentração de dopamina no tecido estriatal bem como da atividade locomotora, quando associado bloqueadores dopaminérgicos D1 ou D2 o efeito na locomoção foi também revertido.

Observou-se que na administração isolada de atropina, a atividade locomotora não se alterou de forma significativa, porém quando associada ao etanol na menor dose (1g/kg) o efeito estimulante do etanol sobre a ALE aumentou, embora não tenha sido estatisticamente significativa, no entanto, estudo realizado camundongos fêmeas por (Scibelli e Phillips, 2009) obteve o mesmo achado ao utilizar escopolamina e etanol com resultado estatisticamente significativo. Em nosso estudo, os achado demonstram a tendência de que elevadas de etanol (3g/kg), a redução da locomoção foi mais acentuada assim como a diminuição da coordenação motora.

Efeitos na atividade de ansiedade

Os testes utilizados para esta avaliação foram placa perfurada (*hole board*) e labirinto em cruz elevado (LCE) (*plus maze*), considerando que no teste da placa perfurada

o aumento no número de vezes que o animal introduz a cabeça no orifício está relacionado com efeito ansiolítico e no teste do labirinto, o estado de ansiedade estar relacionado com a preferência pelos braços fechados.

Em nosso estudo observou-se que o etanol na menor dose e atropina não modificou o comportamento de ansiedade dos animais, no entanto, os animais tratados com etanol 3g/kg, isoladamente com haloperidol 0,5mg/kg ou com sua associação com etanol (1g/kg ou 3g/kg), apresentaram comportamento ansiogênico devido a significativa redução do número de mergulhos (*head dippings*), o que vai de encontro com mecanismo de ação do etanol nos receptor gabaérgico, realizando efeito semelhante ao dos benzodiazepínicos, e pelo mecanismo de ação do haloperidol por bloquear um neurotransmissor excitatório, utilizado na clínica como antipsicótico e também mostrado no estudo de (Sena, Nunes *et al.*, 2011) que neste teste, os animais que consumiram etanol, aumentaram no número de *head dippings*. O resultado encontrado no nosso estudo provavelmente ocorreu devido a redução na atividade locomotora dos animais, considerando que na associação do haloperidol com a maior dose de etanol foi observada nenhum *head dip*.

Observou-se que o etanol na menor dose apresentou comportamento inverso à administração do etanol na maior dose ou haloperidol sozinho no teste do LCE. O primeiro apresentando comportamento ansiolítico, por reduzir o tempo de permanência no braço fechado e o dois últimos, comportamento ansiogênico por aumentar esse parâmetro. Já quando associamos o bloqueador dopaminérgico ao etanol na menor dose, efeito ansiolítico se sobrepôs ao ansiogênico mostrado na administração sozinha do etanol, contrapondo o achado no teste anterior (placa perfurada). Outro estudo que mostra o efeito do álcool como ansiolítico, concordando com nosso achado, é o realizado por (Sena, Nunes *et al.*, 2011), onde mostra que o consumo (livre escolha) crônico, durante seis semanas, de etanol e destilados da cana de açúcar, no teste do LCE, provocou o aumento do tempo de permanência nos braços abertos, evidenciando um efeito ansiolítico.

Já associação com a maior dose, o animal se manteve imóvel, o que indica a interferência do comprometimento motor. Estudo mostrou que drogas que alteram a atividade locomotora podem levar a resultados falso positivos/negativos no LCE (Onaivi, Maguire *et al.*, 1992).

Em um recente estudo (Kholodar, Amikishieva *et al.*, 2011) que utilizou a administração da dopamina intra-nasal para realização de estudo de comportamento de ansiedade em linhagem específica de camundongos, mostrou que a dopamina apresenta atividade ansiolítica e aumento da atividade motora, o que concorda com nosso estudo,

considerando que a dopamina foi bloqueada pelo haloperidol com consequente comprometimento da ALE.

As associações com o bloqueador colinérgico no aparato *hole board* mostrou comportamentos inversos. Considerando na associação com a menor dose, observou-se um aumento de *head dippings*, no entanto, quando associado a maior dose, esse parâmetro foi drasticamente reduzido, mostrando a soberania do efeito do etanol nesta associação.

O bloqueio do sistema colinérgico, aqui representado pela atropina, no teste do LCE se comportou de forma inversa quando associado às diferentes doses de etanol. Na menor dose, o efeito ansiolítico do etanol foi revertido pela atropina, provocando um comportamento de ansiedade, ou seja, maior permanência no braço fechado. Já na associação com a maior dose de etanol, o efeito foi semelhante ao do etanol sozinho (ansio gênico) e elevado em relação à atropina sozinha. O efeito ansio gênico da atropina foi descrito também por (Zarrindast, Homayoun *et al.*, 2000) em estudo que avaliou o envolvimento dos sistemas adrenérgico, colinérgico muscarínico e nicotínico na qual a resposta após sete minutos da injeção de nicotina, alterou os parâmetros do teste *de plus maze* indicando um efeito ansio gênico, o mesmo comportamento foi observado na administração do antagonista de receptor muscarínico, atropina (2,5 ou 5 mg/kg) que quando aplicado previamente em conjunto com a nicotina não alterou a resposta da mesma, mas provocou um efeito ansio gênico quando administra sozinha.

Como no teste realizado de atividade locomotora a atropina não causou alteração negativa, o que indica que não houve prejuízo motor, neste teste seu resultado não foi influenciado por esse comportamento, no entanto, notadamente afetado na administração do etanol (3g/kg) e isto pode ser um fator de confusão neste teste.

Efeitos sobre as monoaminas e acetilcolinesterase

Trinta minutos ou uma hora após a administração das substâncias testadas neste estudo, retiramos o corpo estriado dos animais e as peças foram submetidas aos testes no HPLC para detecção de NE, DA e DOPAC e espectrofotômetro para detecção de da atividade da acetilcolinesterase.

Em nosso estudo, embora não estatisticamente significante, em dose baixa o etanol pareceu aumentar os níveis de NE, DA e seu principal metabólito DOPAC no corpo estriado de camundongos, contrapondo-se a um estudo anterior (Vasconcelos, Cavalcante *et al.*, 2004) feito com ratos machos na dose de 2 ou 4g/kg, vo, onde ambas as doses

resultaram na diminuição dos níveis de DA e DOPAC. Outro estudo que avaliou a administração subcrônica de etanol 2g/kg, ip, mostrou resultado semelhante, com a diminuição de todas as monoaminas, porém com aumento de DOPAC. (Kaneyuki, Morimasa *et al.*, 1991).

Nossos achados mostram uma tendência na diminuição da concentração de NE na administração de etanol (3g/kg), já que não houve significância estatística. Este achado pode ser reforçado pelos achados de Vasconcelos (2004) no qual apresenta essa redução de forma significativa. Um segundo estudo realizado por Huang (1993) que utilizou ratos espontaneamente hipertensos foi administrado 2,4g/kg, vo, de etanol durante quatro semanas e os resultados indicaram que nos níveis de dopamina no corpo estriado aumentaram em dobro. Essa diferença pode ter se dado pela administração crônica neste último estudo.

Quando administrados bloqueadores colinérgico e dopaminérgico sozinhos, notou-se uma acentuada diminuição dos níveis de DA e aumento dos níveis de DOPAC, o que concorda com estudo realizado por Hyde (1992) que analisou as alterações no metabolismo da dopamina bilateralmente no corpo estriado, tubérculo olfatório e córtex frontal de ratos, o qual identificou níveis significativamente menores de dopamina no corpo estriado e aumento de DOPAC na mesma área.

Outro achado do nosso estudo mostra que ao associar o haloperidol ao etanol em pequenas doses, o efeito de redução da DA e aumento de DOPAC encontrado na administração sozinha de haloperidol foi mantido, mostrando o potente efeito do haloperidol nessa análise, porém com uma tendência para o aumento desses níveis, fato não observado quando associado à maior dose de etanol. Efeito semelhante foi observado para as associações com atropina sobre os níveis de DA. Estudo realizado por (Fekete, Herman *et al.*, 1979) que determinou os níveis NE, DA e DOPAC nos corpo estriado, sistema límbico e hipotálamo encontrou um aumento de DOPAC provocado pela administração de haloperidol.

Uma maior dificuldade em correlacionar os estudos se dá pela escassez de estudos que avaliam os níveis de monoaminas e a administração do bloqueador dopaminérgico haloperidol.

A região do corpo estriado está ligada a diversos eventos no SNC, tais como motivacionais, associativos ou sensorio motor. Esses efeitos são regulados por diferentes neurotransmissores, dentre eles a acetilcolina e a dopamina, que são encontrados em altas densidade no corpo estriado (Descarries, Gisiger *et al.*, 1997; Threlfell e Cragg, 2011).

Quando avaliamos o sistema colinérgico, através da atividade da enzima acetilcolinesterase no corpo estriado de camundongos, foi observado que o etanol em todas as doses, a atropina ou haloperidol isolados ou associados ao etanol, provocaram a redução de mais de 60% dos níveis de desta enzima, sendo mais evidente quando administrado atropina isolada. Esses resultados indicam o aumento de Ach induzido pelo etanol, haloperidol e atropina. Corroborando com estudo de (Mahadik e Mukherjee, 1995), que ao bloquear o sistema dopaminérgico administrando haloperidol durante oito dias, os níveis de AchE foram aumentados, provavelmente gerado pela inibição do efeito inibitório da dopamina sobre a acetilcolina, ou seja, causado o aumento desse neurotransmissor. O estudo de SOUSA, (1997) mostrou que ao bloquear o sistema colinérgico com atropina durante sete dias, os níveis de AchE foram reduzidos, igualmente encontrado em nosso estudo.

Outro estudo que avaliou a modulação de Ach no estriado pela dopamina, utilizando microdiálise em ratos tratados como anfetamina (agonista indireto dos receptores dopaminérgicos) encontrou que baixas doses do agonista não afetaram as concentração de Ach, no entanto em doses mais elevadas (10mg/kg, ip) diminuiu significativamente a concentração de Ach do corpo estriado (Deboer e Abercrombie, 1996).

Outra correlação importante é que na avaliação das concentrações de monoaminas deste estudo, as administrações que apresentaram redução significativa da concentração de DA, apresentaram também a AchE reduzida, evidenciando ainda mais a interação desses dois sistemas.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostra a interação entre o etanol e os sistemas colinérgico e dopaminérgico, onde substâncias que afetam um dos sistemas podem, também, afetar o outro. Ficou evidente que o etanol possui a capacidade de interagir com diversos neurotransmissores do sistema nervoso central e também é capaz de interferir nos sistemas que são modulados entre si. Ao bloquear o sistema dopaminérgico houve uma potencialização do efeito do etanol e a redução dos níveis de dopamina parecem resultar também na redução da atividade da acetilcolinesterase. Essa interação: etanol, dopamina e acetilcolina parece contribuir para os sintomas observados decorrente do consumo do etanol como alteração da atividade locomotora possam estar relacionados a essa modulação. Após essa demonstração, fica a perspectiva da busca de substâncias que ao interagir com esses sistemas (colinérgico e dopaminérgico) possam se tornar possíveis alvos no desenvolvimento de medicamento que coadjuvem no tratamento do alcoolismo.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, P. H. et al. Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 6, p. 231-6, Jun 1990.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v. 21, n. 2, p. 205-35, May 1973.

ARIAS, C. et al. Dopamine receptors modulate ethanol's locomotor-activating effects in preweanling rats. **Dev Psychobiol**, v. 52, n. 1, p. 13-23, 2010.

BALDESSARINI, R. J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: Psychosis and Anxiety. In: MCGRAW-HILL (Ed.). **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York, 1995. p.399-430.

BERTORELLI, R.; CONSOLO, S. D1 and D2 dopaminergic regulation of acetylcholine release from striata of freely moving rats. **J Neurochem**, v. 54, n. 6, p. 2145-8, Jun 1990.

BERTORELLI, R. et al. Dopamine depletion preferentially impairs D1- over D2-receptor regulation of striatal in vivo acetylcholine release. **J Neurochem**, v. 59, n. 1, p. 353-7, Jul 1992.

BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, n. 2, p. 225-32, Oct 2000.

BRASIL. Trânsito é responsável por mais de 40 mil mortes no Brasil. 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=1529&CO_NOTICIA=13454 >. Acesso em: 19 de novembro.

CARLINI, E. A. et al. **Levantamento Domiciliar sobre o uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 107 Maiores Cidades do País – 2001**. PSICOTRÓPICAS, C. C. B. D. I. O. E. S. D. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo 2002.

CHARNESS, M. E.; SIMON, R. P.; GREENBERG, D. A. Ethanol and the nervous system. **N Engl J Med**, v. 321, n. 7, p. 442-54, Aug 17 1989.

CIVELLI, O. The neuroreceptors: one key for many locks. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 15, n. 1-4, p. 161-72, Jan-Mar 1995.

CIVELLI, O.; BUNZOW, J. R.; GRANDY, D. K. Molecular diversity of the dopamine receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 33, p. 281-307, 1993.

CONN, M. P. **Neuroscience in medicine**. Filadélfia: Lippincott company, 1995.

CONSOLO, S. et al. Increase in rat striatal acetylcholine content by bromocriptine: evidence for an indirect dopaminergic action. **Life Sci**, v. 29, n. 5, p. 457-65, Aug 3 1981.

CORDIOLI, A. V. **Psicofármacos**. 3^a ed. São Paulo: 2000. p.126-127

DAR, M. S. Modulation of ethanol-induced motor incoordination by mouse striatal A(1) adenosinergic receptor. **Brain Res Bull**, v. 55, n. 4, p. 513-20, Jul 1 2001.

DE KEULENAER, G. W.; BRUTSAERT, D. L. Dilated cardiomyopathy: changing pathophysiological concepts and mechanisms of dysfunction. **J Card Surg**, v. 14, n. 1, p. 64-74, Jan-Feb 1999.

DEBOER, P.; ABERCROMBIE, E. D. Physiological release of striatal acetylcholine in vivo: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 277, n. 2, p. 775-83, May 1996.

DESCARRIES, L.; GISIGER, V.; STERIADE, M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. **Prog Neurobiol**, v. 53, n. 5, p. 603-25, Dec 1997.

DI CHIARA, G.; NORTH, R. A. Neurobiology of opiate abuse. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, n. 5, p. 185-93, May 1992.

DIANA, M. et al. Enduring effects of chronic ethanol in the CNS: basis for alcoholism. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 27, n. 2, p. 354-61, Feb 2003.

DIANA, M.; ROSSETTI, Z. L.; GESSA, G. Rewarding and aversive effects of ethanol: interplay of GABA, glutamate and dopamine. **Alcohol Alcohol Suppl**, v. 2, p. 315-9, 1993.

DRACHMAN, D. A.; LEAVITT, J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? **Arch Neurol**, v. 30, n. 2, p. 113-21, Feb 1974.

DREHER, J. K.; JACKSON, D. M. Role of D1 and D2 dopamine en mediating locomotor activity elicited from the nucleos accumbens of rats. **Brain Res**, v. 487, n. 2, p. 267-77, 1989.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)**, v. 46, n. 3, p. 208-9, Mar 1957.

EDWARDS, G.; MARSHALL, E.; COOK, C. **O tratamento do alcoolismo: um guia para profissionais de saúde**. Porto Alegre/RS: Artmed, 2005.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-95, Jul 1961.

FEKETE, M. I. et al. Dopamine, noradrenaline and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) levels of individual brain nuclei, effects of haloperidol and pargyline. **J Neural Transm**, v. 45, n. 3, p. 207-18, 1979.

FIGUEIRA, I. Etanol e bebidas alcoólicas: pode a atividade farmacológica do álcool explicar a diversidade de efeitos nos diferentes sistemas? , VI jornadas de atualização em terapêutica farmacológica, RFML, 2002. p.165- 171.

FIGUEREDO, V. M. Chemical cardiomyopathies: the negative effects of medications and nonprescribed drugs on the heart. **Am J Med**, v. 124, n. 6, p. 480-8, Jun 2011.

FIGUEREDO, V. M. et al. Chronic alcohol-induced changes in cardiac contractility are not due to changes in the cytosolic Ca²⁺ transient. **Am J Physiol**, v. 275, n. 1 Pt 2, p. H122-30, Jul 1998.

FILE, S. E.; PELLOW, S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. **Br J Pharmacol**, v. 86, n. 3, p. 729-35, Nov 1985.

FORTES, J. R. A.; CARDOSO, W. **Alcoolismo: diagnóstico e tratamento**. São Paulo/SP: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 1991.

GARRIOTT, J. Analysis for alcohol in postmortem specimens. In: (Ed.). **Medico legal Aspects of Alcohol**. Tucson: Lawyers & Judges Publishing, 1996. p.151-63.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. Rio de Janeiro/RJ: McGraw Hill, 2006.

GRACE, A. A. Cortical regulation of subcortical dopamine systems and its possible relevance to schizophrenia. **J Neural Transm Gen Sect**, v. 91, n. 2-3, p. 111-34, 1993.

GRAEFF, F. D.; BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das Doenças Mentais**. 5ª São Paulo: 1999. p.46-47

GUTIÉRREZ, J. M.; CANO, R. P. **Hígado y alcohol: hepatitis alcohólica**. Madrid: Castalia, 1978.

HEIDBREder, C. A.; NEWMAN, A. H. Current perspectives on selective dopamine D(3) receptor antagonists as pharmacotherapeutics for addictions and related disorders. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1187, p. 4-34, Feb 2010.

HUANG, A. C.; SHYU, B. C.; HSIAO, S. Dose-dependent dissociable effects of haloperidol on locomotion, appetitive responses, and consummatory behavior in water-deprived rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 95, n. 3, p. 285-91, May 2010.

HUANG, P. H. et al. Moderate intake of red wine improves ischemia-induced neovascularization in diabetic mice--roles of endothelial progenitor cells and nitric oxide. **Atherosclerosis**, v. 212, n. 2, p. 426-35, Oct 2010.

HUNT, W. A.; MAJCHROWICZ, E. Studies of neurotransmitter interactions after acute and chronic ethanol administration. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 18 Suppl 1, p. 371-4, 1983.

JOHANSON, C.; SHUSTER, C. Cocaine. In: (Ed.). **Psychopharmacology**. Nova York: Raven Press, 1995. p.1685 -1697.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Fundamentos da neurociência e do comportamento**. Rio de Janeiro: Prentice Hall do Brasil, 1997. p.489-500

KANEYUKI, T. et al. The effect of acute and repeated ethanol administration on monoamines and their metabolites in brain regions of rats. **Acta Med Okayama**, v. 45, n. 4, p. 201-8, Aug 1991.

KARSON, C. N. et al. The brain stem reticular formation in schizophrenia. **Psychiatry Res**, v. 40, n. 1, p. 31-48, May 1991.

KAYANI, M. A.; PARRY, J. M. The in vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. **Toxicol In Vitro**, v. 24, n. 1, p. 56-60, Feb 2010.

KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v. 277, p. 93-96, 1979.

KEBABIAN, J. W.; PETZOLD, G. L.; GREENGARD, P. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor". **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 69, n. 8, p. 2145-9, Aug 1972.

KHOLODAR, A. V.; AMIKISHIEVA, A. V.; ANISIMOV, M. P. [Effect of intranasal administration of dopamine on anxiety and locomotor activity of two lines of mice]. **Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova**, v. 97, n. 7, p. 690-9, Jul 2011.

KOOB, G. F. Neurobiological mechanisms in cocaine and opiate dependence. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis**, v. 70, p. 79-92, 1992.

LAONIGRO, I. et al. Alcohol abuse and heart failure. **Eur J Heart Fail**, v. 11, n. 5, p. 453-62, May 2009.

LARINI, L. **Toxicologia**. 1. São Paulo/SP: Manole, 1997. p.301

LARSSON, A.; ENGEL, J. A. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 8, p. 713-20, Jan 2004.

LEFF, S. E.; CREESE, I. Interactions of dopaminergic agonists and antagonists with dopaminergic D3 binding sites in rat striatum. Evidence that [3H]dopamine can label a high affinity agonist-binding state of the D1 dopamine receptor. **Mol Pharmacol**, v. 27, n. 2, p. 184-92, Feb 1985.

LIEBER, C. **Medical and Nutritional Complications of Alcoholism: Mechanisms and Management**. Plenum Press, 1992.

LIEBER, C. S. Medical disorders of alcoholism. **N Engl J Med**, v. 333, n. 16, p. 1058-65, Oct 19 1995.

_____. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. **J Hepatol**, v. 32, n. 1 Suppl, p. 113-28, 2000.

_____. Alcoholic liver injury: pathogenesis and therapy in 2001. **Pathol Biol (Paris)**, v. 49, n. 9, p. 738-52, Nov 2001.

_____. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. **Drug Metab Rev**, v. 36, n. 3-4, p. 511-29, Oct 2004.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987.

LOVINGER, D. M. 5-HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. **Neurochem Int**, v. 35, n. 2, p. 125-30, Aug 1999.

MACEDO, D. S. et al. Different times of withdrawal from cocaine administration cause changes in muscarinic and dopaminergic receptors in rat premotor cortex. **Neurosci Lett**, v. 312, n. 3, p. 129-32, Oct 26 2001.

MAHADIK, S. P.; MUKHERJEE, S. Monosialoganglioside cotreatment prevents haloperidol treatment-associated loss of cholinergic enzymes in rat brain. **Biol Psychiatry**, v. 38, n. 4, p. 246-54, Aug 15 1995.

MANEESH, M. et al. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 50, n. 3, p. 291-6, Jul-Sep 2006.

MARUMO, M.; WAKABAYASHI, I. Sensitivity of thrombin-induced platelet aggregation to inhibition by ethanol. **Clin Chim Acta**, v. 402, n. 1-2, p. 156-9, Apr 2009.

MARUYAMA, S. et al. Red blood cell status in alcoholic and non-alcoholic liver disease. **J Lab Clin Med**, v. 138, n. 5, p. 332-7, Nov 2001.

MCINTOSH, C.; CHICK, J. Alcohol and the nervous system. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 75 Suppl 3, p. iii16-21, Sep 2004.

MELIS, M. et al. Ethanol and acetaldehyde action on central dopamine systems: mechanisms, modulation, and relationship to stress. **Alcohol**, v. 43, n. 7, p. 531-9, Nov 2009.

MELLION, M.; GILCHRIST, J. M.; DE LA MONTE, S. Alcohol-related peripheral neuropathy: nutritional, toxic, or both? **Muscle Nerve**, v. 43, n. 3, p. 309-16, Mar 2011.

MOURA, D. Oswald, W & Guimarães, S. Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: Manual de farmacologia e farmacoterapia. In: (Ed.). Porto: Porto Editora, 2001. p.108-118.

NEVO, I.; HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. **Neurochem Int**, v. 26, n. 4, p. 305-36; discussion 337-42, Apr 1995.

NHTSA. **Motor Vehicle Traffic Crash Fatalities and Injuries: 2005 Projections.** ADMINISTRATION, N. H. T. S.: NHTSA's National Center for Statistics and Analysis 2005.

NIEMELA, O.; PARKKILA, S. Alcoholic macrocytosis--is there a role for acetaldehyde and adducts? **Addict Biol**, v. 9, n. 1, p. 3-10, Mar 2004.

OGA, S.; BASILE, A.; CARVALHO, M. **Guia Zanini-Oga de interações medicamentosas: base teórica das interações.** São Paulo/SP: Atheneu, 2008.

OHNO, M.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, S. Blockade of hippocampal nicotinic receptors impairs working memory but not reference memory in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 45, n. 1, p. 89-93, May 1993.

OLIVEIRA, I.; PEREIRA, E. Farmacologia do álcool etílico: tratamento farmacológico do alcoolismo. In: (Ed.). **Farmacologia.** 4. São Paulo/SP: Guanabara Koogan, 1994. p.60.

OMS. **Global status report on alcohol 2004.** Genebra: Organização Mundial de Saúde: 94 p. 2004.

_____. **Global status report on alcohol and health.** SAÚDE, O. M. D.: Organização Mundial de Saúde 2011.

ONAIWI, E. S. et al. Comparison of behavioral and central BDZ binding profile in three rat lines. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 43, n. 3, p. 825-31, Nov 1992.

ORELAND, S. et al. Ethanol-induced effects on the dopamine and serotonin systems in adult Wistar rats are dependent on early-life experiences. **Brain Res**, v. 1405, p. 57-68, Aug 8 2011.

PALADIN, F.; RUSSO PEREZ, G. The haematic thiamine level in the course of alcoholic neuropathy. **Eur Neurol**, v. 26, n. 3, p. 129-33, 1987.

PARSONS, S. M.; PRIOR, C.; MARSHALL, I. G. Acetylcholine transport, storage, and release. **Int Rev Neurobiol**, v. 35, p. 279-390, 1993.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 24, n. 3, p. 525-9, Mar 1986.

PIANO, M. R. Alcoholic cardiomyopathy: incidence, clinical characteristics, and pathophysiology. **Chest**, v. 121, n. 5, p. 1638-50, May 2002.

POHORECKY, L. Biphasic action of ethanol. **Biobehavioural reviews**, v. 1, p. 231-240, 1977.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia.** 6. Rio de Janeiro/RJ: Elsevier, 2007.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 6, p. 801-10, Nov 1997.

RODGERS, R. J. et al. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trail 1 and response to post-trail cholinergic receptor blockade. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 41-50, May 1996.

ROH, M. S. et al. Regulation of NMDA Receptor Subunits after Acute Ethanol Treatment in Rat Brain. **Alcohol Alcohol**, v. 46, n. 6, p. 672-9, Nov 2011.

ROSSETTI, Z. L. et al. Biphasic effect of ethanol on noradrenaline release in the frontal cortex of awake rats. **Alcohol Alcohol**, v. 27, n. 5, p. 477-80, Sep 1992.

ROWLETT, J. K.; MATTINGLY, B. A.; BARDO, M. T. Repeated quinpirole treatment: locomotor activity, dopamine synthesis, and effects of selective dopamine antagonists. **Synapse**, v. 20, n. 3, p. 209-16, 1995.

RUBIN, R. Effect of ethanol on platelet function. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 23, n. 6, p. 1114-8, Jun 1999.

RUDOLPH, U. et al. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid (A) receptor subtypes. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 796-800, 1999.

SALASPURO, M. Acetaldehyde and gastric cancer. **J Dig Dis**, v. 12, n. 2, p. 51-9, Apr 2011.

SCIBELLI, A. C.; PHILLIPS, T. J. Combined scopolamine and ethanol treatment results in a locomotor stimulant response suggestive of synergism that is not blocked by dopamine receptor antagonists. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 33, n. 3, p. 435-47, Mar 2009.

SECRETAN, B. et al. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 11, p. 1033-4, Nov 2009.

SEIBEL, S. D.; TOSCANO, J. **Conceitos básicos e classificação geral das substâncias psicoativas**. São Paulo/SP: Atheneu, 2001.

SENA, M. C. et al. Chronic consumption of distilled sugarcane spirit induces anxiolytic-like effects in mice. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 66, n. 5, p. 873-8, 2011.

SHARKO, A. C.; HODGE, C. W. Differential modulation of ethanol-induced sedation and hypnosis by metabotropic glutamate receptor antagonists in C57BL/6J mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 1, p. 67-76, Jan 2008.

SHATTUCK, G. The relation of beri-beri to polyneuritis from other causes. **Am J Trop Med**, n. 8, p. 539-543, 1928.

SOARES, P. M. et al. Aminophylline (a theophylline-ethylenediamine complex) blocks ethanol behavioral effects in mice. **Behav Pharmacol**, v. 20, n. 4, p. 297-302, Jul 2009.

SOUSA, F. C. **Interação dopamina-acetilcolina - ação de drogas que atuam nos sistemas dopaminérgico e colinérgico em córtex motor e corpo estriado re rato.** 1997. (Doutorado). Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

STAHL, S. M. Selecting an antidepressant by using mechanism of action to enhance efficacy and avoid side effects. **J Clin Psychiatry**, v. 59 Suppl 18, p. 23-9, 1998.

STANCAMPIANO, R. et al. Biphasic effects of ethanol on acetylcholine release in the rat prefrontal cortex. **Brain Res**, v. 997, n. 1, p. 128-32, Jan 30 2004.

SUN, A. Y.; SUN, G. Y. Ethanol and oxidative mechanism in the brain. **J Biomed Aci**, v. 8, n. 1, p. 37-43, 2001.

THEILE, J. W. et al. Ethanol enhances GABAergic transmission onto dopamine neurons in the ventral tegmental area of the rat. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 6, p. 1040-8, Jun 2008.

THRELFELL, S.; CRAGG, S. J. Dopamine signaling in dorsal versus ventral striatum: the dynamic role of cholinergic interneurons. **Front Syst Neurosci**, v. 5, p. 11, 2011.

TOKUDA, K.; IZUMI, Y.; ZORUMSKI, C. F. Ethanol enhances neurosteroidogenesis in hippocampal pyramidal neurons by paradoxical NMDA receptor activation. **J Neurosci**, v. 31, n. 27, p. 9905-9, Jul 6 2011.

TUCEK, S. Short-term control of the synthesis of acetylcholine. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 60, n. 1, p. 59-69, 1993.

URBANO-MARQUEZ, A. et al. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. **N Engl J Med**, v. 320, n. 7, p. 409-15, Feb 16 1989.

VASCONCELOS, S. M. et al. Effects of chronic ethanol treatment on monoamine levels in rat hippocampus and striatum. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 12, p. 1839-46, Dec 2004.

_____. Effect of one-week ethanol treatment on monoamine levels and dopaminergic receptors in rat striatum. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 4, p. 503-9, Apr 2003.

_____. Determination of amino acid levels in the rat striatum, after administration of ethanol alone and associated with ketamine, a glutamatergic antagonist. **Neurosci Lett**, v. 444, n. 1, p. 48-51, Oct 17 2008.

VASCONCELOS, S. M. M. **Efeitos comportamentais, neuroquímicos e bioquímicos do etanol em roedores, na presença e na ausência de antagonistas dopaminérgico, glutamatérgico e opióide.** 2001. (Doutorado). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

WEINER, J. L.; DUNWIDDIE, T. V.; VALENZUELA, C. F. Ethanol inhibition of synaptically evoked kainate responses in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Mol Pharmacol**, v. 56, n. 1, p. 85-90, Jul 1999.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZALESKI, M. et al. [Neuropharmacological aspects of chronic alcohol use and withdrawal syndrome]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26 Suppl 1, p. S40-2, May 2004.

ZARRINDAST, M. R. et al. Involvement of adrenergic and cholinergic systems in nicotine-induced angiogenesis in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 407, n. 1-2, p. 145-58, Oct 27 2000.