

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Patricia Acordi Cesconetto

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA
EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL DURANTE OS
PERÍODOS GESTACIONAL E LACTACIONAL SOBRE
HIPOCAMPO DA PROLE**

Florianópolis
2015

Patricia Acordi Cesconetto

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA
EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL DURANTE OS
PERÍODOS GESTACIONAL E LACTACIONAL SOBRE
HIPOCAMPO DA PROLE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.
Orientador: Prof.^a Dr.^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cesconetto, Patricia Acordi
ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO
MATERNA AO ETANOL DURANTE OS PERÍODOS GESTACIONAL E
LACTACIONAL SOBRE HIPOCAMPO DA PROLE / Patricia Acordi
Cesconetto ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza -
Florianópolis, SC, 2015.
130 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Síndrome alcoólica fetal. 3. Estresse
oxidativo. 4. Hipocampo. 5. Sistema Glutamatérgico. I.
Souza, Ariane Zamoner Pacheco de. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.
III. Título.

Dedico esta dissertação aos meus amados pais Eduardo Cesconetto e Melania Acordi Cesconetto, pela vida, formação e incentivo que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proteger e me abençoar nesta caminhada.

Agradeço aos meus pais Eduardo e Melania, meus maiores exemplos. Obrigada por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, pela preocupação, pela sabedoria, pelo incentivo de nunca desistir e de sempre ir em frente, enfrentar os obstáculos e conquistar os meus sonhos.

Ao meu namorado Kevin por todo amor, carinho, paciência e compreensão que tem me dedicado. Obrigada pelo companherismo, pelo sorriso, pelo abraço e pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem você.

A todos os meus amigos e familiares por todo apoio e cumplicidade, principalmente pela paciência por ter me ausentado tanto, porque mesmo estando distante todos estavam presentes em minha vida.

À minha orientadora Ariane Zamoner Pacheco de Souza por me receber de portas abertas, pela confiança e paciência, por passar seus conhecimentos com toda sua calma e sabedoria (que levarei para a vida toda), pelo exemplo de orientadora e professora, pela orientação, e por sua amizade.

As Amigas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal, por me recebem de braços abertos, por me passar todos os seus conhecimentos e técnicas, pelos momentos de companherismo nos experimentos realizados, pelas conversas descontraídas. Principalmente às minhas queridas amigas: Juliana que primeiramente me recebeu no laboratório, que me ajudou nos primeiros experimentos, pela sua amizade, sua alegria contagiante e por sempre estar por perto, tanta para desabafos e sorrisos; a Daiane pela amizade, companheira de congresso, pelas conversas, e conhecimentos, além da ajuda nos experimentos; a Camila, pela amizade dentro e fora do laboratório, pelas conversas maduras e descontraídas, e pela saudade que deixou; a Carla, pela sua amizade e pela sua agitação contagiante; as ICs Mauren, Paulina e Bianka pelo carinho, amizade e confiança; a Nathalia e a Vitória pela amizade, companherismo, pelas conversas e algumas parcerias de experimento. Guardo cada uma de um modo especial no meu coração.

Aos amigos e colegas do laboratório da Professora Dr.^a Rosângela e Professor Dr. Danilo, em especial ao Beni pela ajuda no

“estresse” e pelas suas conversas divertidas, deixando o dia mais animado.

À professora Dr.^a Fátima Regina Mena Barreto da Silva pela colaboração no desenvolvimento desta dissertação. Aos Colegas e amigos do laboratório de Hormônios e Transdução de Sinais, Delsi, Gabrielle, Renata, Ana, Marisa e Alisson, pela amizade, pelas conversas e conhecimentos trocados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – PGFAR por ter oportunizado a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menos se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

O abuso de álcool durante a gravidez leva à deficiência intelectual e defeitos morfológicos após o nascimento. O objetivo deste estudo foi demonstrar que o consumo materno crônico de etanol durante os períodos de gestação e lactação provoca a síndrome alcoólica fetal (SAF), associada com alteração na transmissão glutamatérgica, déficit energético e estresse oxidativo no hipocampo da prole. A SAF foi induzida com doses crescentes de etanol (de 2% a 20%) em água potável a partir do 5º dia de gestação até o dia 21 da lactação. O consumo de água e etanol foi mensurado diariamente, bem como a ingestão de ração. A exposição materna ao etanol diminuiu o peso corporal da prole, demonstrando a toxicidade do mesmo aos filhotes. O hipocampo de filhotes de 21 dias de idade foi removido para determinar o influxo de glicose, glutamato e cálcio. Os resultados mostraram que o etanol induziu aumento no influxo de glutamato, diminuindo, conseqüentemente, a transmissão glutamatérgica e o influxo de cálcio. Além disso, a exposição materna ao etanol afetou o metabolismo energético e do glutamato através da diminuição do influxo de glicose, inibição da glutamina sintetase (GS), indução da lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST), sem alterar a atividade da alanina aminotransferase (ALT). Também foi investigada a possível indução de estresse oxidativo pela exposição ao etanol através da determinação da concentração de GSH, TBARS e proteína carbonilada (PC), bem como a atividade das seguintes enzimas antioxidantes: glutationa-redutase enzimas (GR), glutationa-peroxidase (GPx), glutationa-S-transferase (GST), catalase (CAT) e γ -glutamil transferase (GGT). Os resultados mostraram que o consumo materno de etanol não altera as concentrações de GSH, TBARS e de PC, bem como não afeta a atividade da GPx e da GST no hipocampo de filhotes de 21 dias de idade. Por outro lado, a atividade de GR foi aumentada, ao passo que as atividades da CAT e da GGT foram inibidas pela exposição ao etanol. Estes resultados demonstram claramente modificações no sistema de defesa antioxidante enzimático associado com abuso de etanol durante a gravidez e lactação. Em conjunto, os resultados demonstram que a exposição materna ao etanol diminui a transmissão glutamatérgica, induz déficit energético e estresse oxidativo em hipocampo de ratos imaturos.

Palavras chave: Síndrome alcoólica fetal, Estresse oxidativo, Hipocampo, Sistema Glutamatérgico.

ABSTRACT

Alcohol abuse during pregnancy leads to intellectual disability and morphological defects after birth. The objective of this study was to demonstrate that chronic maternal ethanol consumption during gestational and lactational periods causes fetal alcohol syndrome (FAS), associated with changes in glutamatergic transmission, energy deficit and oxidative stress in the hippocampus of the offspring. The SAF was induced with increasing doses of ethanol (2% to 20%) in drinking water from the 5th day of gestation to lactation day 21. The ethanol and water consumption was measured daily, as well as the feed intake. The toxicity of maternal exposure to ethanol was demonstrated by decreased offspring body weight. The hippocampus of 21-day-old pups was removed to determine the uptake of glucose, glutamate and calcium. The results showed that ethanol induced increase in glutamate uptake, reducing therefore the glutamatergic transmission and calcium influx. Furthermore, maternal exposure to ethanol affected the metabolism of glutamate as demonstrated by decreased glucose uptake, inhibition of glutamine synthetase (GS), induction of lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST) activities, without altering the activity of alanine aminotransferase (ALT). We also observed the induction of oxidative stress due to ethanol exposure by measuring the levels of GSH, TBARS and protein carbonyl (PC), as well as the antioxidant activity of the following enzymes: glutathione reductase enzymes (GR), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT) and gamma-glutamyl transferase (GGT). The results showed that maternal exposure to ethanol does not alter the GSH, TBARS and PC levels. Also, ethanol exposure does not affect the activity of GPx and GST in the hippocampus of 21-day-old pups. On the other hand, the GR activity was increased, whereas the activities of CAT and GGT were inhibited by maternal ethanol exposure. These results clearly demonstrate that ethanol abuse during pregnancy and lactation might be associated with changes in the enzymatic antioxidant defense system. Taken together, the results demonstrate that maternal exposure to ethanol decreases the glutamatergic transmission, induces oxidative stress and energy deficit in immature rat hippocampus.

Key words: Fetal alcoholic syndrome, Oxidative stress, Hippocampus, glutamatergic system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo do etanol	32
Figura 2 - Possíveis vias de metabolismo do etanol no cérebro	37
Figura 3 - Características morfológicas da SAF	42
Figura 4 - Receptores e transportadores glutamatérgicos	49
Figura 5 - Ciclo glutamato – glutamina de uma sinapse glutamatérgica	51
Figura 6 - Destino metabólico do glutamato captado pelos astrócitos...53	
Figura 7 - Esquema das defesas antioxidantes, mostrando a geração de espécies reativas	57
Figura 8 - Possíveis alterações em hipocampo de ratos imaturos expostos ao etanol na gestação e lactação	61
Figura 9 - Consumo materno diário de água ou solução contendo etanol durante a gestação e lactação	73
Figura 10 - Consumo materno diário de ração durante a gestação e lactação	74
Figura 11 - Peso corporal dos filhotes de 21 dias de idade expostos ou não ao etanol durante a gestação e lactação	75
Figura 12 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre os produtos fluorescentes de reação com aldeídos presentes em hipocampus de ratos de 21 dias de idade	76
Figura 13 - Efeito da exposição materna ao etanol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampus de ratos de 21 dias de idade	77
Figura 14 - Consequências da exposição materna ao etanol no influxo [^{14}C] – glutamato em hipocampus de ratos de 21 dias de idade	78
Figura 15 - Efeito da exposição materna ao etanol na atividade da GS no hipocampo da prole de 21 dias de idade	79
Figura 16 - Efeito da exposição materna ao etanol na atividade da aminotransferases AST e ALT em hipocampus de ratos de 21 dias de idade	79
Figura 17 - Efeito do etanol na atividade de influxo de [^{14}C] – desoxiglicose em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e na lactação	80
Figura 18 - Efeito do etanol na atividade da LDH em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação	81

Figura 19 - Efeito do etanol nas concentrações de TBARS em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol durante a gestação e lactação	82
Figura 20 - Efeito do etanol na concentração de proteína carbonilada em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação	82
Figura 21 - Efeito do etanol na atividade de G6PD em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação	83
Figura 22 - Efeito do etanol na concentração de GSH em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação ...	83
Figura 23 - Efeito do etanol na concentração de GST em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação ...	84
Figura 24 - Efeito do etanol na atividade de GR em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação	84
Figura 25 - Efeito do etanol na atividade de GPx em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação....	85
Figura 26 - Efeito do etanol na atividade de GGT em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação	85
Figura 27 - Efeito do etanol na atividade de SOD em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação	86
Figura 28 - Efeito do etanol na atividade de CAT em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação	86
Figura 29 - Mecanismo de toxicidade do etanol no hipocampo da prole após exposição materna durante os períodos gestacional e lactacional	100

LISTA DE ABREVIATURAS

α -KG	Alfa-cetoglutarato
AA	Acetaldeído
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADH	Álcool desidrogenase
ALT	Alanina aminotransferase
ALDH	Aldeído desidrogenase
ARND	Deficiência do desenvolvimento neurológico relacionados com o álcool
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
APA	Associação americana de psiquiatria
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHE	Barreira hematoencefálica
14 C-DG	14 C-2-desoxi-D-glicose
CaMKII	Proteína cinase dependente de Ca^{++} /Calmodulina II
CAT	Catalase
CCDV	Canal de cálcio dependente de voltagem
CID	Classificação internacional das doenças
DAG	Diacilglicerol
DG	Giro dentiado
DG	Dias de gestação
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPN	Dias pós-natal
DSM	Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
EROs	Espécies reativas do oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
ERSs	Espécies reativas de enxofre
FAE	Efeitos fetais do álcool
FASD	Transtornos do espectro do álcool fetal
GABA	Ácido γ -aminobutírico
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	Gama-glutamiltransferase
GLAST	Transportador glutamato/aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato-1

GLUR	Receptor de glutamato
GLUT	Transportador de glicose
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona S-transferase
HNE	4-hidroxinonenal
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxil
HO_2^-	Radical hidroperoxil
HOCl	Ácido hipocloroso
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
KA	Cainato
LDH	Lactato desidrogenase
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MDA	Malondialdeído
MEOS	Sistema microsossomal de oxidação do etanol
mGluRs	Receptores de glutamato metabotrópicos
NAD^+	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP^+	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NMDA	N-metil-D-aspartato
N_2O_3	Ácido nitroso
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
$\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico
ONOO $^-$	Peroxinitrito
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical ânion superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
OMS	Organização mundial da Saúde
ONOO $^-$	Peroxinitrito
PAG	Glutaminase ativada por fosfato
PC	Piruvato carboxilase
PDH	Piruvato desidrogenase

RGD	Arginina-Glicina-Aspartato
SAF	Síndrome Alcolica fetal
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SOD-CuZn	Superóxido dismutase-cobre-zinco
SOD-Mn	Superóxido dismutase-mangânes
SOD-EC	Superóxido dismutase-extracelular
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácidos tricarboxílicos
VGLUT	Transportador de glutamato vesicular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
2.	OBJETIVOS.....	27
2.1.	<i>Objetivo geral</i>	<i>27</i>
2.2.	<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>27</i>
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
3.1.	<i>ASPECTOS HISTÓRICOS DO ETANOL.....</i>	<i>29</i>
3.2.	<i>ETANOL E METABOLISMO HEPÁTICO</i>	<i>30</i>
3.2.1.	<i>Álcool Desidrogenase – ADH</i>	<i>32</i>
3.2.2.	<i>Sistema Microsossomal de Oxidação do Etanol - MEOS</i>	<i>33</i>
3.2.3.	<i>Catalase.....</i>	<i>34</i>
3.2.4.	<i>Aldeído Desidrogenase - ALDH</i>	<i>34</i>
3.3.	<i>METABOLISMO CEREBRAL</i>	<i>35</i>
3.4.	<i>CONSEQUÊNCIAS AO FETO DEVIDO AO CONSUMO DE ÁLCOOL NA GESTAÇÃO.....</i>	<i>37</i>
3.5.	<i>SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....</i>	<i>45</i>
3.5.1.	<i>Hipocampo.....</i>	<i>45</i>
3.6.	<i>GLUTAMATO.....</i>	<i>46</i>
3.6.1.	<i>Receptores e transportadores para glutamato</i>	<i>47</i>
3.6.2.	<i>Ciclo glutamato-glutamina.....</i>	<i>49</i>
3.6.3.	<i>Metabolismo do glutamato e aminotransferases</i>	<i>51</i>
3.7.	<i>ESPECIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....</i>	<i>53</i>
3.7.1.	<i>Peroxidação lipídica</i>	<i>55</i>
3.8.	<i>DEFESAS ANTIOXIDANTES.....</i>	<i>55</i>
3.9.	<i>ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS</i>	<i>56</i>
3.9.1.	<i>Superóxido dismutase – SOD.....</i>	<i>57</i>
3.9.2.	<i>Catalase – CAT</i>	<i>58</i>
3.9.3.	<i>Glutationa peroxidase e glutatona redutase</i>	<i>58</i>
3.9.4.	<i>Glutationa-S-transferase - GST</i>	<i>59</i>
3.9.5.	<i>γ-Glutamil transferase – GGT.....</i>	<i>59</i>
3.10.	<i>ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICOS.....</i>	<i>60</i>
4.	HIPÓTESE.....	61

5.	MATERIAIS E MÉTODOS	63
5.1.	<i>MATERIAIS.....</i>	63
5.2.	<i>ANIMAIS.....</i>	63
5.3.	<i>TRATAMENTO COM ETANOL</i>	63
5.4.	<i>INFLUXO DE [¹⁴C]-GLUTAMATO</i>	64
5.5.	<i>INFLUXO DE ⁴⁵Ca²⁺</i>	65
5.6.	<i>INFLUXO DE [¹⁴C]-DESOXIGLICOSE</i>	65
5.7.	<i>CONTEÚDO DE GSH.....</i>	66
5.8.	<i>ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....</i>	66
5.8.1.	Glutamina sintetase	66
5.8.2.	Atividade das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase	66
5.8.3.	Atividade da γ -glutamil transferase - GGT	67
5.8.4.	Lactato desidrogenase - LDH.....	67
5.9.	<i>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES ...</i>	68
5.9.1.	Superóxido Dismutase- SOD	68
5.9.2.	Catalase - CAT	68
5.9.3.	Glutationa peroxidase - GPx	68
5.9.4.	Glutationa redutase	69
5.9.5.	Glutationa-S-transferase.....	69
5.9.6.	Glicose-6-fosfato Desidrogenase	69
5.10.	<i>DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVO</i>	70
5.10.1.	Lipoperoxidação tecidual – TBARS	70
5.10.2.	Proteína carbonilada.....	70
5.11.	<i>QUANTIFICAÇÃO DE ALDEÍDOS.....</i>	71
5.12.	<i>CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS</i>	71
5.13.	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	71
6.	RESULTADOS.....	75
6.1.	<i>CONSUMO DE ÁGUA OU ETANOL POR RATAS DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO</i>	73
6.2.	<i>CONSUMO DIÁRIO DE RAÇÃO POR RATAS DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO</i>	74
6.3.	<i>PESO CORPORAL DOS FILHOTES EXPOSTOS OU NÃO AO ETANOL DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO</i>	75
6.4.	<i>FORMAÇÃO DE ALDEÍDOS.....</i>	75
6.5.	<i>INFLUXO DE ⁴⁵Ca²⁺</i>	76

6.6.	<i>PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EM HIPOCAMPO DE FILHOTES EXPOSTOS AO ETANOL NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.....</i>	<i>77</i>
6.7.	<i>EFEITOS DO ETANOL EM HIPOCAMPO DE FILHOTES DE 21 DIAS EXPOSTOS NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO NA OXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS E PROTEÍNAS.....</i>	<i>81</i>
6.8.	<i>EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL SOBRE AS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS E NÃO ENZIMÁTICAS EM HIPOCAMPO DE FILHOTES DE 21 DIAS DE IDADE</i>	<i>83</i>
7.	DISCUSSÃO	87
7.1.	<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</i>	<i>99</i>
8.	CONCLUSÃO	101
9.	PERSPECTIVAS	103
10.	REFERÊNCIAS.....	105

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aprovou no ano de 2010 a resolução 63.13 da Assembleia Mundial da Saúde: Estratégia Mundial para reduzir o uso nocivo do álcool (WHA 63.13), com o objetivo de ressaltar o problema de saúde pública desencadeado mundialmente pelo consumo de álcool.

O etanol é uma molécula ativa de bebidas alcoólicas e é, sem dúvida, a droga de abuso mais utilizada no mundo, juntamente com a nicotina. Devido ao seu estatuto jurídico e disponibilidade, o etanol provoca dependência levando a problemas de saúde graves e numerosas mortes prematuras (MOYKKYNNEN e KORPI, 2012). O álcool é uma droga lícita muito popular, e o consumo por mulheres em idade reprodutiva continua sendo um importante problema de saúde pública (Barr & Streissguth, 2001). Estudos concordam que as mulheres são mais vulneráveis aos efeitos do etanol por suas peculiaridades hormonais, fisiológicas e metabólicas (MANCINELLI *et al.*, 2006).

Em humanos, o consumo de álcool durante a gestação causa disfunções no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) causando atraso na migração neuronal, além de anomalias cerebrais estruturais e funcionais (GOODLETT *et al.*, 2001). Filhos de mulheres que consomem etanol durante a gestação podem ser afetados por distúrbios no neurodesenvolvimento ou pela síndrome alcoólica fetal (SAF), a causa mais comum de retardo mental no mundo (SAMPSON *et al.*, 1997). Entretanto, nem sempre o neonato exposto ao etanol nasce com SAF e, apesar de alguns déficits neurocomportamentais serem frequentemente relatados nessa síndrome, não existe um consenso para o fenótipo específico da SAF (HOUEY *et al.*, 2004; GOODLETT *et al.*, 2005).

Evidências têm demonstrado que nenhum nível de consumo de etanol é seguro durante a gravidez (MUKHERJEE *et al.*, 2005). Mesmo o consumo leve, de aproximadamente uma dose bebida alcoólica por semana, pode afetar negativamente o comportamento da criança (SOOD *et al.*, 2001).

Embora o SNC seja um dos sistemas mais afetados pelo consumo crônico de etanol, pouco se sabe sobre os efeitos dessa substância nas células neurais, em especial, de filhotes expostos ao álcool durante a gestação e amamentação. O etanol afeta diversos sistemas de neurotransmissores no cérebro (NEVO e HAMON, 1995) e prejudica o metabolismo energético celular por alterar o transporte e a utilização de

glicose, provocando déficit no neurodesenvolvimento (MILLER *et al.*, 1988; GOODLETT *et al.*, 2005; MIKI *et al.*, 2008). O prejuízo do desenvolvimento cerebral intrauterino provocado pelo etanol também pode ser evidenciado pelo volume diminuído do cérebro, bem como alterações na estrutura e constituição cerebrais (MIKI *et al.*, 2008).

O etanol é um dos agentes teratogênicos mais comuns, que facilmente atravessa a barreira hematoencefálica, interferindo em diferentes sistemas neurotransmissores como o GABAérgico, o glutamatérgico, o opióide, o serotoninérgico, o noradrenérgico e o colinérgico. Tais interações estão associadas a alterações comportamentais e cognitivas (GILPIN e KOOB, 2008). De um modo geral, o etanol inibe a função de todas as classes de receptores de glutamato ionotrópicos, mas diferentes condições experimentais parecem produzir uma grande variabilidade de resultados obtidos (GOODLETT e HORN, 2001).

A exposição excessiva ao etanol pode resultar em aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo o radical ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, e/ou supressão de mecanismos de defesa antioxidante, que normalmente inativam EROs, incluindo inibição da atividade do superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona (GSH), resultando em estresse oxidativo (COHEN- KEREM e KOREN, 2003). O aumento do estresse oxidativo pode ocorrer devido a um efeito direto do etanol e dos produtos de oxidação (PUSHPAKIRAN *et al.*, 2004). A principal lesão nas células após alteração de EROs induzida por etanol ocorre em macromoléculas, tais como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácidos graxos poli-insaturados presentes nos lipídios de membrana (RENIS *et al.*, 1995). De particular importância para SAF é o fato de que as concentrações de antioxidantes são menores no feto em desenvolvimento do que em células maduras (SARSIMAZ *et al.*, 2003), tornando os neurônios em desenvolvimento mais vulneráveis aos efeitos negativos do estresse oxidativo (HENDERSON *et al.*, 1999).

Considerando o que foi exposto, este estudo pretende demonstrar, pelo menos em parte, os mecanismos envolvidos nas alterações induzidas pela exposição materna ao etanol sobre o hipocampo da prole. Os resultados obtidos neste estudo poderão fornecer evidências dos alvos celulares e moleculares de ação do etanol que possam servir de base para estratégias de prevenção ou reversão dos danos nos indivíduos expostos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar as alterações neuroquímicas induzidas pela exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação sobre o hipocampo da prole.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da exposição crônica ao etanol durante a gestação e o aleitamento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, ^{14}C -glicose e ^{14}C -glutamato em fatias de hipocampo de ratos imaturos de 21 dias de idade;
- Investigar as consequências da exposição ao etanol na atividade da glutamina sintetase (GS), da ALT, da AST, da G6PD e da γ -GT;
- Verificar o efeito do etanol na concentração de TBARS, proteína carbonilada, aldeídos e GSH em hipocampo de ratos imaturos;
- Estudar o efeito da exposição materna ao etanol na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR, GST em hipocampo de ratos imaturos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. ASPECTOS HISTÓRICOS DO ETANOL

O consumo de álcool vem acompanhando a história da humanidade, sendo ele a substância psicoativa mais utilizada desde o velho testamento (MAHEW, 1992). Originário de um processo natural de fermentação, com um teor alcoólico relativamente baixo, há aproximadamente 10.000 anos a humanidade passou a consumir e a atribuir diferentes significados ao uso do álcool (LAZO, 1989). O consumo de álcool vem sempre ocupando um lugar de destaque em todas as culturas, como elemento principal nos rituais religiosos, fonte de água não contaminada ou ainda nos momentos de comemoração e de confraternização (BACHELARD, 1999). Dados do passado nos ajudam a entender melhor os fatos atuais, como Hipócrates, que por volta de 385 a.C., relatou o uso do álcool como um causador de várias doenças e descreveu as loucuras provocadas por essa substância (FORTES, 1975).

Já no Egito, se acreditava que as bebidas fermentadas eliminavam germes e parasitas provenientes das águas do Nilo, sendo estas usadas como medicamento. Documentos egípcios relataram também as etapas de fabricação, produção e comercialização da cerveja e do vinho (VIALA-ARTIGUES e MECHETTI, 2003). Neste sentido, Louis Pasteur, em 1865, não encontrando germes maléficos no vinho, declara este como a mais higiênica das bebidas.

A Idade Média foi marcada pelo aumento da comercialização de cerveja e de vinho. A intoxicação alcoólica (“a bebedeira”) deixava de ser apenas condenada pela igreja e passava a ser considerada um pecado por esta instituição (BOFF, 2004).

À medida que as sociedades foram sofrendo transformações econômicas e sociais, principalmente com a revolução industrial, tanto na Europa como nos Estados Unidos, o uso excessivo de bebidas alcoólicas aumentou vertiginosamente e, com isso, aumentou o número de pessoas que passaram a ter algum problema social ou de saúde causado pelo consumo exagerado de álcool (JEROME, 1993).

Durante o século 20, a França e outros países passaram a estabelecer a maioridade de 18 anos para o consumo de álcool. Em 1920, nos Estados Unidos da América foi decretada a Lei Seca que proibia o consumo, a fabricação, a venda, o transporte, a importação, a exportação, a distribuição e a posse de bebida alcoólica, tendo como

consequência a diminuição das pesquisas sobre os efeitos do álcool sobre a prole.

O termo alcoolismo foi utilizado pela primeira vez em 1949 (KALINA *et al.*, 1999). Em 1952 o alcoolismo foi tratado como doença, sendo incluído no Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSMI) da associação americana de psiquiatria (APA). Na segunda edição deste manual (DSM-II) seguiu a classificação internacional das doenças (CID-8) da organização mundial da saúde (OMS). Na DSM-IV e a CID-10 teve-se o consenso sobre o conceito de síndrome de dependência, reduzindo os sintomas necessários para o diagnóstico de dependência ao álcool.

A OMS estima que 2 bilhões de pessoas de todo o mundo consomem bebidas alcoólicas, o que corresponde a aproximadamente 40% (ou 2 em cada 5) da população mundial acima dos 15 anos, e que 76.3 milhões apresentem doenças associadas ao consumo de álcool (WHO, 2004).

3.2. ETANOL E METABOLISMO HEPÁTICO

O etanol é obtido por um processo natural consequente da fermentação de alimentos que contem açúcar, fornecendo calorias ao organismo, sendo essas cerca de 7,1 kcal/g. No cotidiano ele surge com uma droga e não como um alimento, sendo uma fonte de energia não estocável no organismo. Portanto, pode ser uma substância tóxica e deve ser eliminado (SUTER, 2005).

Depois de ingerido, o etanol é rapidamente absorvido através das mucosas do trato digestivo (PIETRANTONI, 1991). Sua absorção se inicia na mucosa oral e se completa pelas mucosas gástrica e intestinal (CORBETT, 1982; HOLFORD, 1987). A taxa de absorção do etanol após a administração oral é especialmente influenciada pela concentração da bebida alcoólica, pela taxa de ingestão, pelo estado alimentado ou em jejum, a natureza e composição dos alimentos ingeridos, a taxa de esvaziamento gástrico, sexo, idade, ritmos biológicos, atividade física, assim como outras síndromes genéticas e fatores ambientais (WILKINSON *et al.*, 1977; KALANT 2000).

O etanol, ingerido em jejum, é rapidamente absorvido com picos de concentração entre 30 a 90 minutos, isso dependendo se a bebida tem alta concentração etílica ou se está quente, o que contribui para a dilatação dos capilares gástricos levando a maior absorção. Em jejum, o etanol é absorvido de forma quase imediata, principalmente no duodeno

e no jejuno. Quando ingerido em associação com alimentos, mais de 70% do etanol é absorvido no estômago, diminuindo a velocidade de sua absorção devido ao aumento do tempo de esvaziamento gástrico (CARTOT *et al.*, 1986; Hoffman *et al.*, 1996).

A biodistribuição do etanol é regulada pelo teor de água nos vários compartimentos corporais, e atinge o equilíbrio ligeiramente com a concentração de etanol no plasma, já que o etanol é uma molécula pequena, solúvel em meio aquoso e em meio lipídico, alterando a maioria das funções vitais (JUNIOR *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que não há ligação do etanol às proteínas. A passagem dessa molécula através das barreiras hematoencefálica e placentária ocorre de maneira facilitada (HOFFMAN *et al.*, 1996; GILMAN *et al.*, 1996).

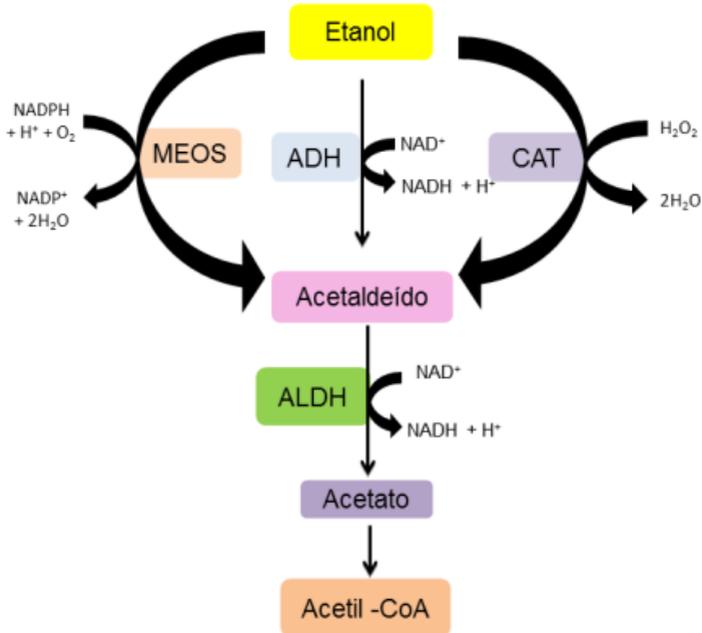
A mesma dose de etanol pode ocasionar diferentes concentrações plasmáticas em indivíduos distintos devido às grandes variações nas proporções de gordura e água no organismo (COLE-HARDING *et al.*, 1987). O efeito exarcebado observado em mulheres se dá geralmente pela maior biodisponibilidade, maior porcentagem de gordura corporal, variações na absorção no decorrer do ciclo menstrual, menor quantidade de água total no organismo e menor atividade da enzima álcool-desidrogenase. As mulheres apresentam maior alcoolemia do que os homens a partir da ingestão da mesma dose de álcool em gramas por kg de peso corporal (KWOET *et al.*, 1998). O metabolismo de primeira passagem pode ser maior no sexo masculino, o que também pode contribuir para os níveis de álcool no sangue superiores encontrados em mulheres (COLE-S *et al.*, 1987; FREZZA *et al.*, 1990).

Depois de absorvido pelo trato gastrointestinal, o álcool é transportado através da circulação portal ao fígado onde é oxidado. Apenas de 2% a 10% da quantidade absorvida é eliminada e isso ocorre em pequenas quantidades através da excreção via respiração (0,7%), suor (0,1%) e urina (0,3%) (HOFFMAN *et al.*, 1996).

O etanol é metabolizado no fígado, sendo este órgão mais predisposto aos efeitos tóxicos efetuados pelo consumo excessivo de bebidas alcoólicas (LIEBER C., 1980; DUESTER *et al.*, 1999). No metabolismo hepático do etanol, atuam duas rotas enzimáticas alternativas e uma principal, localizadas em diferentes compartimentos celulares. A rota principal para a oxidação do etanol no fígado ocorre através da atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH), encontrada no citoplasma das células hepáticas. As outras duas rotas são constituídas pelo sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS – composto pelo CYP450IIIE1, NADPH-citocromo-c-redutase e

fosfolipídios), encontrado no retículo endoplasmático, e pela ação da catalase, localizada nos peroxissomos. O produto final destas três rotas é o acetaldeído, posteriormente transformado em acetato, pela ação da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (ARTEEL *et al.*, 2003), como demonstrado na figura abaixo (Figura 1).

Figura 1 - Metabolismo do etanol



A oxidação do etanol ocorre principalmente através da ação de três vias: atividade da ADH, do MEOS e da catalase. Todas as três vias tem como produto final o acetaldeído, que será então oxidado em acetato e água pela ALDH e por fim em Acetil-CoA.

Fonte: adaptado de Smith (2007).

3.2.1. Álcool Desidrogenase – ADH

A ADH é uma enzima que contém zinco, sendo de uma família que possui diversas isoenzimas com variações específicas no comprimento

da cadeia e na afinidade por álcoois (BOSRON *et al.*, 1993; SMITH *et al.*, 2007). A ADH foi localizada no citosol das células e é encontrada em maior quantidade no fígado, seguido pelo trato gastrointestinal, os rins, a mucosa nasal, testículos e útero (BOSRON *et al.*, 1993). O etanol é convertido em acetaldeído através da enzima ADH e sua coenzima, a dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD^+), que é convertida na sua forma reduzida (NADH), conforme demonstrado na figura 1 (KACHANI *et al.*, 2008).

As enzimas da família de ADH metabolizam uma ampla variedade de substâncias, incluindo o etanol, a vitamina A, outros álcoois simples, hidroxiesteroides e os produtos da degradação de lipídios e de peroxidação lipídica (KITSON, 1996).

Existem pelo menos cinco classes diferentes de genes de ADH (classes I a V) que já foram descritas em seres humanos e oito diferentes tipos de genes, e um adicional de duas classes (categorias VI e VII) ter sido encontrado em outras espécies, tais como o rato e galinha, respectivamente (DUESTER *et al.*, 1999), cada uma apresentando um polimorfismo variável (alélico) (SMITH *et al.*, 2007). Estas isoformas variam de acordo com sua eficácia de oxidação do álcool.

3.2.2. Sistema Microsossomal de Oxidação do Etanol - MEOS

O consumo crônico de álcool, tanto pelo homem quanto pelo rato, está associado ao aumento do retículo endoplasmático liso no fígado, possível local de oxidação do etanol (GAYOTTO *et al.*, 2001). A via que assume grande relevância nos alcoolistas é do MEOS (Sistema Microsossomal Oxidante de Etanol), que pertence à família de proteínas chamadas citocromos, presentes no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, que utiliza o citocromo P-450 ou CYP2E1, NADPH-citocromo redutase e os fosfolipídios, tendo como aceptor de hidrogênio o NADP^+ (LIEBER e DE CARLI, 1991).

Os Citocromos P450 são de uma família de enzimas que estão envolvidas na oxidação de esteroides, ácidos graxos e numerosos xenobióticos. As concentrações mais elevadas de citocromo P450 estão presentes no fígado, principalmente no retículo endoplasmático liso, mas alguns são encontrados na mitocôndria (LEWIS *et al.*, 1998). Existem muitas isoformas de P450, a CYP2E1 é uma das isoformas associadas na oxidação do etanol para o acetaldeído. Além de etanol, ela também pode oxidar muitos outros compostos, incluindo a acetona, o benzeno, e outros álcoois (LIEBER, 1997; KOOP, 1992).

As enzimas da família dos citocromos P450 tem um papel central na detoxificação de xenobióticos, especialmente do etanol. Estas enzimas tem como propriedade a ligação de elétrons ao oxigênio molecular e no ciclo do dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato na sua forma reduzida (NADPH). Como consequência, as EROS são formadas, incluindo o radical hidroxila, que pode iniciar a peroxidação lipídica na membrana plasmática, gerando produtos tóxicos finais como o malondialdeído (SONG & CEDERBAUM, 1996; JÚNIOR *et al.*, 1998). Na metabolização do etanol através do MEOS, que utiliza o citocromo P-450E1 (CYP2E1) ocorre a formação de acetaldeído. Para esta reação, os elétrons são doados pelo NADPH (MELLO *et al.*, 2001). A reação catalisada pelo MEOS está representada na figura 1.

3.2.3. Catalase

A biotransformação hepática do etanol nos peroxissomos é limitada pela produção endógena de peróxido de hidrogênio. Sob circunstâncias fisiológicas, o sistema catalase responde por menos 2% da oxidação do etanol (Júnior *et al.*, 1998). Já nesta via de metabolização do etanol, também ocorre a formação de acetaldeído através da catalase em uma reação enzimática reduzindo o peróxido de hidrogênio em água, conforme mostrado na figura 1 (MELLO *et al.*, 2001).

3.2.4. Aldeído Desidrogenase - ALDH

O produto final da primeira etapa de oxidação do etanol é o acetaldeído, seja qual for a via oxidativa (ADH, MEOS ou catalase), e este será finalmente oxidado em acetato e água pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH). Esta enzima está presente no citosol dos hepatócitos, na matriz da membrana mitocondrial externa e nos microssomos. O acetato é lançado na corrente sanguínea, sendo rapidamente metabolizado nos tecidos extra-hepáticos em dióxido de carbono e água. Este acetato, no final do metabolismo é convertido em acetil-coenzima A (acetil-CoA), com hidrólise de ATP para AMP (adenosina monofosfato). A acetil-CoA, no entanto, entrará no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) (AGUIAR *et al.*, 2007). Assim, o acetato, metabolito final da degradação do álcool, atua como fonte de energia, inibindo a oxidação lipídica, podendo como consequência contribuir para a esteatose hepática e obesidade (SUTER *et al.*, 1997; KACHANI *et al.*, 2008).

Existem várias isoformas de ALDH que intervêm em diferentes metabolismos, nomeadamente nos dos aldeídos derivadas de aminas. O ALDH pode condensar-se com catecolaminas ou com as indolaminas, para formar compostos de estrutura muito semelhante à de certos produtos psicoativos e alucinógenos (CORDEIRO, 1986; MELLO *et al.*, 2001). A partir disso, tem sido atribuído ao acetaldeído um papel importante na formação da dependência alcoólica (Mello *et al.*, 2001).

A ALDH é responsável pela oxidação de aproximadamente 90% do aldeído acético formado pelo metabolismo do etanol. Existem múltiplas isoformas da ALDH que estão reunidas em quatro classes: isoenzimas de classe I e II (ALDH1 e ALDH2) e de classe III e IV (ALDH3 e ALDH4). As ALDH1 e ALDH3 estão situadas no citoplasma, enquanto as ALDH2 e ALDH4 encontram-se na mitocôndria. Existem isoformas da aldeído desidrogenase presentes no fígado humano, mas apenas de classe I e isoenzimas de classe II, codificados por ALDH (VASILIOU *et al.*, 1999) e ALDH2, respectivamente, estão envolvidas na oxidação de acetaldeído. ALDH1 é a enzima citosólica ubiquamente distribuída em todos os tecidos, incluindo o cérebro.

3.3. METABOLISMO CEREBRAL

Após a ingestão do etanol, o acetaldeído é formado na periferia, principalmente pela atividade da ADH no fígado, sendo que esta enzima não é expressa no cérebro (ZIMATKIN *et al.*, 2006, DEITRICH, 2011). No entanto, dada a alta atividade da ALDH, a principal enzima responsável por metabolizar o acetaldeído, dentro da barreira hematoencefálica, uma pequena quantidade de acetaldeído é transferida para o cérebro a partir da periferia (Figura 2) (HUNT, 1996; ZIMATKIN e BUBEN, 2007).

Muitos estudos sobre o metabolismo do etanol no cérebro tem mostrado que este não é fragmentado de forma igual pelos tecidos cerebrais (LUTWAK-MANN, 1938; TOWNE, 1964; MUKHERJI *et al.*, 1975; XIANG *et al.*, 2011). Para ultrapassar a barreira hematoencefálica o acetaldeído deve primeiro entrar nas células endoteliais ricas em ALDH2 na barreira, sendo oxidado. Assim, sob condições normais o acetaldeído sistêmico não atravessa a barreira hematoencefálica (ERIKSSON, 1977; LINDROS & HILLBOM, 1979; PETERSON & TABAKOFF, 1979; STOWELL *et al.*, 1980; ISRAEL, 2013). Entretanto, foi demonstrado que em níveis mais elevados deste

metabolito na periferia, este pode ser capaz de entrar rapidamente no cérebro (WARD *et al.*, 1997; QUERTEMONT *et al.*, 2005). Somente quando as concentrações sistêmicas excedem 100 mM, o acetaldeído consegue entrar no SNC (TABAKOFF *et al.*, 1976; ISRAEL, 2013).

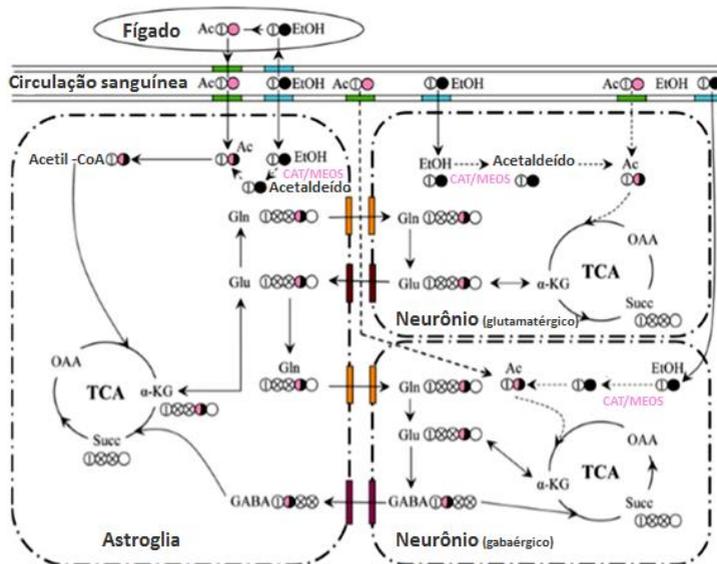
O acetaldeído pode ser gerado a partir de etanol por meio da reação de catalase, e em menor extensão por CYP2E1, ambas as enzimas estão presentes no cérebro (TAMPIER e MARDONES, 1979; ARAGÃO *et al.*, 1992; GILL *et al.*, 1992; ZIMATKIN *et al.*, 2006; XIANG *et al.*, 2011) (Figura 2). Estudos *in vivo* apresentam a atividade da catalase como um componente chave na formação do acetaldeído no cérebro após a exposição ao etanol. Posteriormente, ocorre uma diminuição dos níveis cerebrais de acetaldeído (JAMAL *et al.*, 2007). Contudo, a inibição da catalase não suprime de forma completa a produção de acetaldeído. Outras vias metabólicas, tais como citocromo P450, também foram encontradas produzindo localmente acetaldeído no cérebro após o consumo de etanol (ZIMATKIN *et al.*, 1998; ZAKHARI, 2006). Estudos *in vitro* apontam que a catalase gera 60-70% do acetaldeído no cérebro, enquanto a CYP2E1 gera cerca de 20% (ZIMATKIN *et al.*, 2006). Portanto, para sua ação central, o acetaldeído deve ser produzido no cérebro; isso é possível, pois as principais enzimas de metabolização de etanol (CYP2E1 e catalase) estão disponíveis no tecido cerebral (ZIMATKIN & DIETRICH, 1997; ZIMATKIN *et al.*, 2006).

Considerando-se que o acetaldeído é um composto altamente reativo que interage com vários neurotransmissores endógenos do cérebro, este pode formar produtos biologicamente ativos (COHEN & COLLINS, 1970; DAVIS E WALSH, 1970; COHEN, 1976; JUNIOR *et al.*, 2013), causando diversos efeitos no cérebro, incluindo as alterações comportamentais, neuroquímicas e neurotóxicas, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento do alcoolismo (HUNT, 1996; DIETRICH, 2006; QUERTEMONT *et al.*, 2005; ZIMATKIN e BUBEN, 2007). Por conseguinte, afirma-se que é o próprio etanol no cérebro que induz o alcoolismo crônico (TAMPIER *et al.*, 1988; ARAGON *et al.*, 1992; GILL *et al.*, 1992; ZIMATKIN e BUBEN, 2007).

Assim, pode concluir-se que no cérebro de humanos e de roedores a oxidação do acetaldeído é principalmente feita pela catalase. A CYP2E1 também desempenha um papel importante na oxidação do etanol. No entanto, nem todo o acetaldeído presente no cérebro é gerado a partir destes dois processos. Deve haver uma via, ainda não

identificada, que contribui para a produção do acetaldeído no cérebro (Figura 2) (ZIMATKIN *et al.*, 1998; 2006).

Figura 2 - Possíveis vias de metabolismo do etanol no cérebro



A oxidação do etanol no cérebro pode ocorrer em neurônios, bem como em astrócitos, onde ele é oxidado a acetaldeído através das vias de MEOS e CAT e em seguida a acetato. O acetato é convertido em acetil-CoA, que entra no ciclo de TCA. O alfa-cetoglutarato (α -KG) é convertido em glutamato (Glu). Glu pode deixar o neurônio glutamatérgico através da liberação de neurotransmissores e é rapidamente convertido em glutamina (Gln) na astroglia. Gln é então transportado de volta para os neurônios glutamatérgicos como precursor de neurotransmissor de Glu, completando assim o ciclo de Glu-Gln. Neurônios GABAérgicos podem sintetizar GABA a partir de Glu. Uma vez liberado, o GABA tem dois destinos potenciais: recaptação pelos neurônios GABAérgicos para reutilização e/ou oxidação direta no neurônio GABAérgico; ou captação e oxidação em astroglia.

Fonte: adaptado Wang, 2013.

3.4. CONSEQUÊNCIAS AO FETO DEVIDO AO CONSUMO DE ÁLCOOL NA GESTAÇÃO

O consumo de bebidas alcoólicas vem crescendo demasiadamente no Brasil e em todo mundo e um dos grandes problemas desse consumo envolve a saúde da mulher. Em 1999, nos EUA 53% das mulheres eram consumidoras de bebidas alcoólicas (COOK, 2003). A prevalência do alcoolismo entre mulheres até então era significativamente menor que a dos homens, em torno de 33%. O consumo abusivo e/ou a dependência do álcool trazem diversas consequências negativas sobre a saúde física, psíquica e a vida social da mulher (ECKART *et al.*, 1998). Mulheres grávidas também possuem alto risco à saúde devido ao consumo excessivo de álcool (MANCINELLI *et al.*, 2006).

Na mulher, a presença de altas concentrações de etanol no sangue eleva o risco para doenças alcoólicas do fígado, doenças do coração, úlceras, problemas reprodutivos, osteoporose, pancreatite, danos cerebrais, bem como câncer de mama e do trato gastrointestinal (CHANG *et al.*, 2000). Além disso, as complicações físicas decorrentes do consumo de álcool aparecem antes e de forma mais grave nas mulheres que nos homens.

O consumo de etanol deve diminuir quando a mulher engravida, mas com o aumento do consumo de bebidas alcoólicas pela população feminina, uma maior proporção de mulheres e seus fetos são expostos a doses variáveis deste agente toxicante. As bebedoras moderadas têm maior chance de parar ou reduzir seu consumo durante a gravidez, mas entre bebedoras mais severas 2/3 diminuem o consumo e 1/3 ainda continuam a abusar do álcool durante toda gestação (PASSINI, 2005).

Entre 14 a 20% das mulheres grávidas relataram o consumo de álcool em algum momento da gravidez (MORSE e HUTCHINS., 2000). Um estudo demonstrou que uma em cada treze mulheres relatou uso de álcool no último trimestre da gestação (CLOUD *et al.*, 1997) e aproximadamente 55% das mulheres adultas grávidas consomem bebidas alcoólicas, dentre as quais 6% são classificadas como etilistas (CHUDLEY *et al.*, 2005).

Para as mulheres que não estão grávidas, médicos e pesquisadores definem como consumo leve de 1,2 doses de bebidas alcoólicas diárias, consumo moderado de 2,2 doses por dia, e beber pesado como 3,5 ou mais doses por dia (ABEL *et al.*, 1998). Contudo, o risco de consumir bebidas alcoólicas durante a gravidez (o suficiente para danificar a prole) tem sido definido como uma média de mais de 1 dose por dia, ou menos, se reunidas em episódios de 5 ou mais doses e, um único episódio (HANKIN e SOKOL, 1995).

Embora ainda não se tenha conhecimento de qual a dose de etanol que poderia causar dano fetal, evidências recentes mostram que mesmo uma dose por semana está associada com probabilidade significativa de dificuldades mentais. Como a dose segura de álcool para cada gestante não foi definida, recomenda-se total abstinência durante a gravidez. Entretanto, a mãe que expõe o feto a um teratôgeno, é moral e causalmente responsável pelo resultado (JONES e BASS, 2003).

A maioria dos pesquisadores e médicos dependem do auto-relato da gestante sobre o uso do álcool durante a gestação para se fazer a subnotificação e intervenção sobre o ato de beber materno (ERNHART *et al.*, 1989; SOKOL *et al.*, 2003).

A carência de dados epidemiológicos do consumo de álcool por grávidas no Brasil demonstra a necessidade de uma investigação para avaliar melhor a extensão do problema. A caracterização do perfil de gestantes consumidoras de álcool é importante para a assistência pré-natal e para a adoção de medidas populacionais de prevenção e intervenção (SEGRE, 2010). O amplo uso social de bebidas por mulheres em idade reprodutiva e o papel do etanol como agente teratogênico tem sido objeto de vários estudos (WONG *et al.*, 2008).

O álcool atravessa facilmente a barreira placentária e quando ingerido pela gestante é entregue diretamente para o líquido amniótico e para o feto. Como efeito primário ocorre uma vasoconstrição no cordão umbilical e na placenta, o que pode ampliar a duração da exposição fetal devido à redução do fluxo sanguíneo (GRINFELD, 2009). A exposição a esse agente tem muitos efeitos complexos na função da placenta, no crescimento e desenvolvimento fetal. Os níveis de etanol no sangue fetal e no líquido amniótico são equivalentes ao do sangue da gestante em cerca de uma hora após a ingestão (BURD *et al.*, 2007). O acetaldeído também atravessa a barreira placentária, mas as concentrações dessa substância são variáveis. A capacidade metabólica da placenta humana é limitada para metabolização do álcool; e o fígado fetal por sua vez, não possui um sistema eficaz para metabolizá-lo. Portanto, a redução das concentrações de etanol no feto se dá primordialmente pela sua reentrada na circulação materna (BURD *et al.*, 2007, 2008).

Após o estágio de desenvolvimento, o feto ingere o líquido amniótico, absorve o álcool, que vai para a circulação fetal, e o transfere para a circulação materna, o que parece ser um mecanismo de eliminação do álcool contido no líquido amniótico. Ainda assim, pode haver um intervalo de 3 horas nesse processo, mesmo após a ingestão de apenas uma dose de bebida alcoólica. É plausível que o líquido

amniótico dessa gestante transforme-se em um reservatório, pois o nível de etanol permanece elevado por mais tempo no líquido amniótico que no sangue materno (BURD *et al.*, 2007).

O etanol também é transferido para o leite materno, equivalendo a apenas 2% da alcoolemia materna. A eliminação do álcool no sangue e no leite obedece a padrões individuais. Quanto à amamentação de filhos de etilistas, pode ocorrer uma redução na produção, não alterando a qualidade do leite. Contudo, o etanol pode causar efeitos adversos no sono da criança, no desenvolvimento neuromotor e, conseqüentemente, no aprendizado. Dessa forma, é recomendado que a mãe que ingeriu algum tipo de bebida alcoólica se abstenha de amamentar nas horas seguintes à ingestão (BURD *et al.*, 2007, 2008).

Os efeitos teratogênicos do álcool sobre o feto em desenvolvimento estão relacionados com a ocasião e o nível máximo de exposição intrauterina (SILVA *et al.*, 2007). Como um teratôgeno, ele interfere no desenvolvimento do feto, em especial sobre o cérebro (GOODLETT *et al.*, 2001). Mesmo o consumo moderado durante a gravidez está associado a efeitos adversos fetais e é especialmente prejudicial se a ingestão ocorre durante o período crítico de formação de órgãos, especialmente da 1^a a 6^a semanas de gestação (ALLEBECK *et al.*, 1998; BEAN, 2002).

Os estágios do desenvolvimento cerebral são similares em humanos e roedores, com exceção da duração de cada período em relação ao nascimento. O período de gestação humana é caracterizado por três trimestres da gravidez, os quais ocorrem no pré-natal. O crescimento cerebral ocorre entre as semanas 25 e 38 da gestação no terceiro trimestre, neste tempo ocorrem o crescimento e a diferenciação. Este período de crescimento rápido do cérebro começa no final do segundo trimestre e depois vai diminuindo gradualmente nos primeiros anos de vida (WEST, 1987; GIL-MOHAPELA *et al.*, 2010). O período de gestação do rato e dos camundongo é mais curto do que os seres humanos (21-22 dias e 18-21 dias, respectivamente), e os filhotes continuam a sofrer substancial desenvolvimento cerebral pós-natal. Como acontece com os seres humanos, o período do rato e do camundongo no desenvolvimento é normalmente dividido em três etapas. O primeiro trimestre em humanos corresponde aos dias de gestação (DGS) 1-10 em roedores. O segundo trimestre corresponde a DGS 11-21/22 (camundongos geralmente terminam a gestação em DGS 21 e ratos em DGS 22). O terceiro trimestre corresponde aos dias 1-10 pós-natal (DPNS) (GIL-MOHAPELA *et al.*, 2010).

Durante a gestação, o etanol induz a formação de radicais livres de oxigênio que são capazes de danificar proteínas e lipídios celulares, aumentando a apoptose e prejudicando a organogênese. Também inibe a síntese de ácido retinoico, que regula o desenvolvimento embrionário (Freire *et al.*, 2005). Já durante a organogênese, no primeiro trimestre, que é um período sensível a mudanças, ocorre uma rápida transformação e migração celular, o feto fica exposto aos componentes do álcool porque é carente de enzimas necessárias para sua biotransformação e de seu metabólito. Além disso, o álcool ou um de seus metabólitos, pode interromper a síntese proteica resultando em retardo de crescimento celular com consequências graves para o desenvolvimento do cérebro fetal (RAAFAT *et al.*, 1999).

Efeitos adversos fetais associados com ingestão de etanol incluem aborto espontâneo, morte fetal, parto prematuro, baixo peso ao nascer, anomalias de crescimento, retardo mental, perímetro cefálico menor, SAF e os efeitos fetais do álcool (FAE), também conhecido como deficiência do desenvolvimento neurológico relacionados com o álcool (ARND) ou transtornos do espectro do álcool fetal (FASD) (RUSSELL *et al.*, 1998).

A SAF foi primeiramente descrita por Jones e Smith (1973), mas já havia relatos feitos por Lenoine, em 1968 na França (LEMOINE *et al.*, 1968). Esta síndrome é caracterizada por retardo de crescimento intrauterino, malformações craniofaciais, retardamento físico e mental, e defeitos do septo cardíaco. O termo FASD é atualmente usado para descrever um menor grau de deformidades associadas com SAF, às vezes imperceptível, exceto por um exame minucioso, bem como um grau variável de retardo mental. FAE é muito mais difícil diagnosticar, porque a criança afetada apresenta apenas deficiências mentais (COOK, 2003).

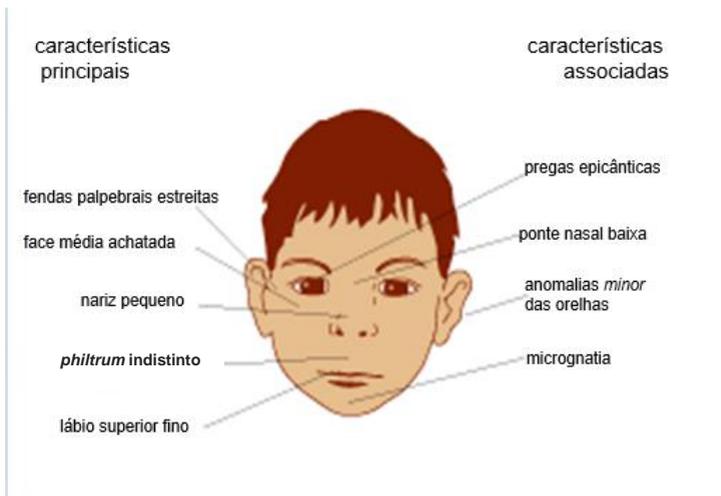
A SAF é uma doença irreversível que atinge todas as etnias, níveis socioeconômicos e culturais, mostrando-se como a principal causa conhecida de retardo mental em países de primeiro mundo, apesar de seu difícil diagnóstico em neonatos (ROSSETT, 1980; CHAUDHURI, 2000).

A probabilidade de mulheres que consomem bebidas alcoólicas durante a gravidez terem filhos com a SAF é maior do que a de terem filhos comprometidos com FAE (MILLER, 1996). Ambos SAF e FAE resultantes dos efeitos do etanol sobre o desenvolvimento do sistema nervoso fetal, causando alterações estruturais, comportamentais e cognitivas. A SAF provoca alterações graves no feto, incluindo

anormalidades craniofaciais, microcefalia, deficiência de crescimento, e as dificuldades na cognição, nas atividades mentais e interações sociais (COOK, 2003). Retardo de crescimento, no peso e na altura, ou circunferência craniana diminuída, antes e após o parto, são os sinais mais comuns dessa síndrome. Mulheres que ingerem mais do que 30 g de etanol por dia apresentam maior risco de aborto (SILVA *et al.*, 2007).

Crianças com SAF têm aspectos faciais muito característicos, incluindo hipoplasia do terço médio da face, fendas oculares curtas, olhos pequenos que aparecem amplamente espaçados e epicanto interno, lábio superior fino, indistinto sulco entre o lábio superior e o nariz e filtro nasal longo liso, restrição de crescimento, incluindo microcefalia relativa. Além disso, as crianças apresentam anomalias do desenvolvimento neurológico, incluindo comprometimento oftalmológico (Figura 3) (STOLER *et al.*, 1999).

Figura 3 - Características morfológicas da SAF



Características encontradas em crianças expostas ao etanol durante a gravidez e portadoras da SAF. Essas características são completas para diagnóstico da doença.

Fonte: adaptado Clarke e Gibbard, 2003.

A pior consequência já estudada decorrente da ingestão de etanol pela gestante é o retardo mental, pois o cérebro do feto em desenvolvimento é especificamente vulnerável à exposição ao álcool.

Além das alterações fenotípicas descritas na síndrome, o álcool etílico gera efeitos neurotóxicos no SNC dos fetos e da prole recém-nascida. Dessa forma, as ações neurotóxicas do etanol podem ser morfológicas e/ou funcionais, prejudicando o SNC durante parte ou toda a vida dos indivíduos acometidos, e essas ações podem ser lesões desencadeadoras que levam à neurodegeneração (GRINFELD, 2004).

Problemas com atividade intelectual em portadores de SAF incluem dificuldades na aprendizagem, memória, resolução de problemas, fala, audição e atenção. Mesmo com essas características visíveis exteriormente, o diagnóstico muitas vezes é tardio ou não atendido por completo (COOK, 2003).

O Grupo “Fetal Alcohol Survey Group of the Research Society on Alcoholism” propôs critérios para o diagnóstico da SAF, em 1980. A constatação de uma anormalidade se dá quando os pacientes mostrarem sinais em cada uma das três categorias listadas abaixo:

- a) Retardo no crescimento pré-natal e pós-natal, que podem ser caracterizados como déficit de crescimento, peso, altura ou circunferência craniana menor que o percentual 10 para a idade gestacional.
- b) Alterações que envolvem o sistema nervoso central. Dentre elas destacam-se sinais de anormalidades neurológicas (irritabilidade e hiperatividade durante a infância), atraso no desenvolvimento intelectual, dificuldade no aprendizado e/ou impulsividade.
- c) Dismorfismo facial característico incluindo microcefalia, microftalmia e/ou fissuras palpebrais curtas, philtrum pouco desenvolvido, lábio superior fino e achatamento ou ausência da maxila. Pelos critérios diagnósticos pelo menos duas destas características devem estar presentes (ABEL, 1989; COOK, 2003).

Até o momento, o diagnóstico da FAE não pode ser feito de forma confiável até que a criança esteja em idade escolar. (ABEL, 1989; COOK, 2003).

Outras anomalias que podem ser encontradas em crianças com SAF são as cardíacas, que ocorrem em 29 a 50% dos pacientes submetidos aos efeitos do álcool ingerido pelas suas mães. Estenose aórtica, coarctação de aorta e transposição dos grandes vasos, são cardiopatias congênitas que podem decorrer da teratogenia do etanol. As malformações renais são consequências raras. Alterações esqueléticas são mais frequentes e incluem anomalias de falanges, malformações vertebrais e escoliose (MESQUITA, 2008). Contudo, as crianças têm tempos mais longos de reação a situações cotidianas quando expostas a baixas a moderadas concentrações de etanol no

período pré-natal (Jacobson *et al.*, 1994). Também se observou diminuição do tempo de reação, desatenção e hiperatividade em crianças em idade pré-escolar expostas a concentrações moderadas de bebidas alcoólicas (LANDESMAN-DWYER e RAGOZIN, 1981; EUSTACE *et al.*, 2003). Em crianças em idade escolar expostas a níveis de consumo moderado de álcool foram observados problemas de aprendizagem, atenção, impulsividade, déficits de memória, distração e problemas psiquiátricos (principalmente transtornos de humor) (STREISSGUTH *et al.*, 1989; O'CONNOR *et al.*, 2002).

Estudos de neuroimagem mostraram mudanças estruturais e funcionais no hipocampo, no cerebelo, nos gânglios da base e no corpo caloso de crianças com SAF. Essas alterações levaram a diminuição da função cognitiva e desempenho escolar deficitário (KODITUWAKKU, 2009). A SAF tem sido apontada como a causa mais comum de retardo mental e a principal causa evitável de malformações congênitas nos Estados Unidos, sendo responsável por gastos significativos para a saúde e educação públicas (STRATTON *et al.*, 1996).

Apesar das incidências de SAF e FAE serem significativamente subnotificadas, a prevalência da SAF nos Estados Unidos varia entre 0.3 e 5.6 por 1.000 nascidos vivos, enquanto as estimativas de FAE parecem ser ainda mais elevadas, atingindo cerca de 1 em cada 100 nascidos vivos (Coles, 1993; COOK, 2003).

Enquanto alguns filhos de mães etilistas desenvolvem SAF e evidenciam todos os sintomas descritos anteriormente, outros não apresentam todos os sintomas, uma condição conhecida como resistência ao etanol. Além disso, um número considerável de nascidos vivos mostram fenótipos parciais relacionados com a síndrome (Gemma *et al.*, 2006, 2007).

A SAF representa uma das principais causas evitáveis de retardo mental e malformações congênitas. As estratégias de prevenção são claras: se a mãe se abstém de beber álcool antes da concepção e durante a gravidez, esses transtornos são completamente evitáveis. Consultas pré-natais fornecem uma iniciativa para intervenção daquelas mulheres que exibem um alto risco no consumo de bebidas alcoólicas (CLOUD *et al.*, 1997). A identificação do uso do álcool no início da gravidez é importante para reduzir o risco dos efeitos adversos relacionados com o uso do álcool no feto, e a redução da ingestão do mesmo, tanto antes, quanto durante a gravidez, é capaz de reduzir a incidência de SAF e FAE (COOK, 2003).

3.5. SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O parênquima do SNC é composto de células nervosas e seus aferentes, dendritos e axônios, envolvido de forma íntima por células gliais (SIEGEL *et al.*, 2006). É através dos seus padrões de circuitos neuronais que os neurônios individuais formam conjuntos funcionais para regular o fluxo de informações dentro e entre as regiões do cérebro (SQUIRE *et al.*, 2008). Além de neurônios e células gliais, tais como astrócitos e oligodendrócitos, o parênquima normal do SNC contém vasos sanguíneos e células da microglia, os macrófagos residentes do SNC (SIEGEL *et al.*, 2006).

3.5.1. Hipocampo

Os seres humanos e outros mamíferos possuem dois hipocampos, um em cada lado do cérebro e está localizado no lóbulo temporal central, por baixo da superfície cortical, estando associado com o córtex cerebral. Pertencendo ao sistema límbico, desempenha uma importante função na consolidação das informações da memória de curto prazo para a memória de longo prazo, além de estar relacionado com aprendizagem e orientação espacial (HOU *et al.*, 2013).

A formação do hipocampo abrange a extensão posterior para anterior da base dos lóbulos temporais. Em seu eixo transversal a formação do hipocampo é organizada como um circuito unidirecional composta por várias sub-regiões: o córtex entorrinal, o giro denteado, sub-regiões do hipocampo CA1 e CA3 e o subiculum (AMARAL *et al.*, 1989; SMALL *et al.*, 2011).

O hipocampo é talvez a região mais estudada em relação a alterações morfológicas de doenças que afetam o cérebro. Características mais específicas da função do hipocampo, com base em dados experimentais de animais e seres humanos, demonstram que alterações no hipocampo estão relacionadas com a doença de Alzheimer, doença vascular cerebral, envelhecimento, epilepsia do lobo temporal, amnésia, esquizofrenia, transtornos depressivos e de ansiedade (SMALL *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que cada sub-região do hipocampo tem um perfil molecular distinto (THOMPSON *et al.*, 2008; SMALL *et al.*, 2011) e esta "anatomia molecular" proporciona um substrato parcial para a vulnerabilidade regional. Assim, o elevado aumento de expressão de certos receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) em CA1 ajuda a

explicar a sua vulnerabilidade a excitotoxicidade no contexto de hipóxia e isquemia associada com a doença vascular, enquanto que os níveis elevados de receptores de mineralocorticoides no giro dentado conferem a vulnerabilidade à efeitos das reduções do nível de corticosteroides circulantes (SLOVITER *et al.*, 1989; SMALL *et al.*, 2011).

A maioria das doenças do cérebro está associada com mudanças regionais no metabolismo basal. O metabolismo energético nos neurônios requer a absorção de glicose e o consumo de oxigênio. O estado metabólico em qualquer estrutura do cérebro pode ser determinado *in vivo*, medindo diretamente a influxo de glicose ou o consumo de oxigênio (SMALL *et al.*, 2011).

A perda de interneurônios GABAérgicos em CA3 de pacientes com esquizofrenia pode causar hiperatividade neuronal associada com aumento na liberação de glutamato na fenda sináptica e, com base nas propriedades do circuito hipocampal, foi proposto que este efeito ocorra mais proeminentemente na sub-região CA1. O glutamato pode ainda modular a expressão de diferentes genes, como a diminuição da glutaminase, e este evento pode estar implicado na fisiopatologia da esquizofrenia (GAISLER-SALOMON *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2010; THAL *et al.*, 2002; SMALL *et al.*, 2011).

3.6. GLUTAMATO

O cérebro contém grandes quantidades de glutamato, mas, apenas uma pequena fração deste está normalmente presente no meio extracelular (DANBOLT, 2001). O aminoácido L-glutamato regula a maior parte da neurotransmissão excitatória rápida no SNC, estimula praticamente todos os neurônios e provavelmente está envolvido em muitos aspectos da função cerebral. O glutamato é o principal mediador da informação sensorial, coordenação motora, emoções e cognição, incluindo a formação e recuperação da memória (SIEGEL *et al.*, 2006).

O glutamato também desempenha um papel importante no desenvolvimento de SNC, incluindo a indução e eliminação de sinapses, migração, diferenciação e morte celular. (DANBOLT, 2001). Por volta de 90% dos neurônios do cérebro utilizam glutamato como neurotransmissor, e cerca de 80-90% das sinapses no cérebro são glutamatérgicas (BRAITENBERG *et al.*, 1998; HASSEL & DINGLEDINE, 2006). A maioria dos neurônios, e até mesmo células gliais expressam receptores glutamatérgicos na superfície celular (VERNADAKIS, 1996; BERGLES *et al.*, 2000; DANBOLT, 2001).

Repolarização das membranas que são despolarizadas durante a atividade glutamatérgica pode ser responsável por até 80% das despesas de energia do cérebro (ATTWELL *et al.*, 2001; SIEGEL *et al.*, 2006). Além disso, o glutamato desempenha um papel na sinalização nos tecidos periféricos, bem como em células do sistema endócrino (DANBOLT, 2001).

O glutamato exerce seu papel de sinalização, agindo sobre seus receptores localizados na superfície das células que os expressam. A ativação excessiva dos receptores de glutamato é prejudicial tornando-se tóxico em concentrações elevadas (DANBOLT, 2001). Além disso, o glutamato atua como percussor para o ácido γ -aminobutírico (GABA) em neurônios GABAérgicos e, para glutamina em células gliais. Ele participa também como constituinte de proteínas e peptídeos, como por exemplo, a glutatona (γ -glutamil-cisteinil-glicina), a qual é o principal agente de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo (ORREGO *et al.*, 1993; HERTZ *et al.*, 1999).

O glutamato exógeno é impedido de entrar no SNC pela barreira hematoencefálica (BHE); assim, a maior parte do glutamato presente no cérebro é sintetizada *de novo* pelos astrócitos. Deste modo, os astrócitos impedem a difusão do glutamato a partir da fenda sináptica, após o mesmo ser liberado pelos neurônios. Este também pode ser sintetizado a partir da glicose plasmática, que chega ao cérebro a partir de transportadores de glicose (GLUT), presentes nos astrócitos, neurônios, células endoteliais, entre outras (HERTZ *et al.*, 1999; COUITER e EID, 2012).

3.6.1. Receptores e transportadores para glutamato

Os receptores para glutamato pertencem a duas principais categorias distintas: receptores ionotrópicos, canais iônicos cuja abertura é reforçada quando o glutamato se liga ao receptor; e os receptores metabotrópicos, acoplados a proteína G (SIEGEL *et al.*, 2006).

Os receptores para glutamato ionotrópicos são importantes na fisiologia do cérebro, participando da neuroplasticidade envolvida nas funções cognitivas e mediando a neurodegeneração em isquemia cerebral (MÖYKKYNE e KORPI, 2012). As três classes de receptores ionotrópicos foram identificadas como: N-metil-de-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiônico (AMPA) e cainato (KA) (Figura 4). A afinidade para o glutamato é diferente para seus diferentes receptores (SIEGEL *et al.*, 2006). Sua ativação é acoplada a

alterações nas correntes de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . A função dos receptores para glutamato ionotrópicos é excitar o neurónio durante a transmissão sináptica rápida. Os receptores NMDA (NMDAr) e, com menor significância, os AMPAr, desempenham um papel na modulação da força da neurotransmissão e também podem servir como canais para a entrada de cálcio, um importante segundo mensageiro (MÖYKKYENEN e KORPI, 2012).

Várias moléculas endógenas podem ativar os receptores NMDA, algumas delas são, assim como o próprio glutamato, outros aminoácidos, como aspartato e a homocisteína (SIEGEL *et al.*, 2006). Os receptores do AMPA medeiam a despolarização rápida dos neurónios, enquanto os NMDA desempenham um papel especial na transmissão sináptica (MÖYKKYENEN e KORPI, 2012).

Os receptores KA estão localizados principalmente nas membranas celulares pré-sinápticas e funcionam como auto-receptores que regulam a liberação de glutamato e também intercedem na plasticidade sináptica (LAURI *et al.*, 2006; MÖYKKYENEN e KORPI, 2012).

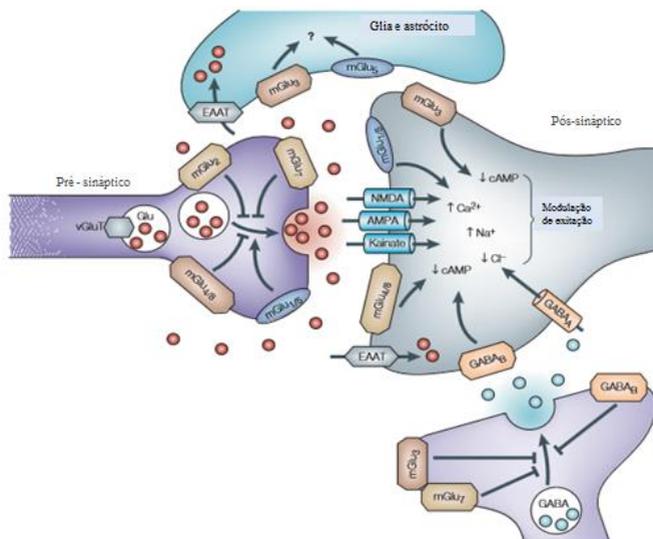
Oito receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs) identificados, incorporam três classes funcionais mGLU_1 , mGLU_2 e mGLU_3 . Receptores de glutamato metabotrópicos são assim chamados porque estão ligados por proteínas G triméricas às enzimas citoplasmáticas (Figura 4) (CONN, 2003; SIEGEL *et al.*, 2006).

Os níveis de glutamato extracelular são regulados por uma série de transportadores. Esses transportadores de glutamato são nomeadamente classificados em duas categorias, os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) e os transportadores de glutamato vesicular (vGLUTs) (DANBOLT, 2001; RAO *et al.*, 2012). Os EAATs depende do gradiente eletroquímico de íons de sódio e potássio para suas ações, estes são bombas ligadas à membrana, que são responsáveis pela manutenção de baixos níveis fisiológicas de glutamato extracelular (BEART *et al.*, 2006; RAO *et al.*, 2012). Três destes transportadores foram identificados como glutamato/aspartato transportador (GLAST), GLT1 e um tipo de portador de aminoácido excitatório 1 (EAAC1); EAAT1, EAAT2, e EAAT3, EAAT4 e EAAT5 (Figura 4) (RAO *et al.*, 2012).

Ao contrário dos EAATs, os transportadores de glutamato vesiculares (vGLUTs) não envolvem gradiente electroquímico de Na^+ para acumulá-lo. De maneira oposta dos EAATs que reconhecem e transportam tanto glutamato e aspartato, os vGLUTs são seletivos para o transporte de glutamato. Três tipos de transportadores de glutamato

vesiculares foram identificados, VGLUT1, VGLUT2 VGLUT3 (MORIYAMA e YAMAMOTO, 2004; RAO *et al.*, 2012).

Figura 4 - Receptores e transportadores glutamatergicos



Localização e função sináptica geral de receptores glutamatergicos e transportadores. Os receptores de glutamato ionotrópicos, NMDA, KA e AMPA, medeiam a transmissão rápida e estão associados a plasticidade neuronal. Os transportadores vesiculares (vGLUT1 e vGluT2) carregam o glutamato em vesículas pré-sinápticas. A glia, os astrócitos e os transportadores pós-sinápticos de glutamato são responsáveis pela captação de glutamato e, portanto, cessação da transmissão sináptica. Os receptores de glutamato metabotrópicos têm uma localização e função de pré-sináptica e pós-sinaptica diversificada para modular a liberação de neurotransmissores e excitabilidade pós-sináptica, respectivamente.

Fonte. Adaptado Swanson, 2005.

3.6.2. Ciclo glutamato-glutamina

A eliminação do glutamato a partir da fenda sináptica, acontece a fim de manter sua concentração baixa, necessária para a neurotransmissão, sendo esta uma das funções mais importantes dos astrócitos no cérebro (MCKENNA, 2003; 2007). A concentração de glutamato aumenta dramaticamente durante a neurotransmissão e a

baixa atividade de astrócitos para remover este excesso de glutamato leva a lesão excitotóxica e/ou até a morte neuronal (DANBOLT, 2001; MCKENNA, 2007).

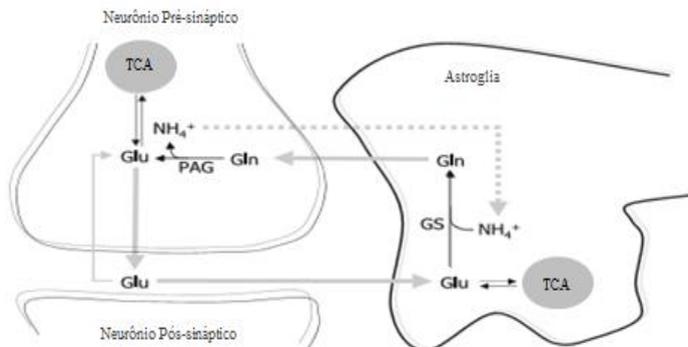
O glutamato retomado por astrócitos tem muitos destinos metabólicos possíveis, incluindo a utilização direta para formação de glutamina (SCHOUSBOE *et al.*, 1993; MCKENNA, 2007), participação no ciclo de nucleotídeos de purina a incorporação de proteínas ou o tripeptídeo glutatona (DRINGEN, 2000), e através de metabolismo do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para a energia que pode levar à formação de aspartato, lactato ou alanina (MCKENNA, 2007).

O destino metabólico do glutamato em astrócitos é imensamente controlado pela concentração de glutamato no meio extracelular. Baixas concentrações de glutamato extracelular são facilmente recaptadas e convertidas em glutamina; no entanto, quando a concentração extracelular de glutamato aumenta, grande parte deste é metabolizada via ciclo do TCA tendo como consequência a formação de lactato e aspartato (Sonnewald *et al.*, 1993; MCKENNA, 2007).

O fluxo de glutamato ocorre a partir do neurônio para o compartimento de astrócitos durante a neurotransmissão glutamatérgica. O aminoácido glutamina foi demonstrado como um predominate precursor de glutamato, sendo esta glutamina rapidamente metabolizada a glutamato em neurônios (SHANK *et al.*, 1989; LAJTHA *et al.*, 2007). A glutamina é sintetizada em astrócitos por uma amidação dependente de ATP do glutamato, catalisada pela enzima citosólica glutamina sintetase (GS) (NORENBERG e MARTINEZ, 1979; LAJTHA *et al.*, 2007). Assim, o fluxo de glutamato dos neurônios para os astrócitos é contrabalançado por um fluxo de glutamina a partir de astrócitos para os neurônios, um conceito conhecido como o ciclo glutamato-glutamina (BERL *et al.*, 1983; LAJTHA *et al.*, 2007).

O ciclo de uma sinapse glutamatérgica começa quando o neurotransmissor é captado pelos astrócitos, convertido em glutamina pela GS, enzima específica dos astrócitos; e liberados no espaço extracelular do qual ele é transportado para os neurônios e transformado novamente em glutamato por glutaminase ativada por fosfato (PAG) Kvamme *et al.*, 2001) (Figura 5). O glutamato formado pela atividade PAG nos neurônios GABAérgicos é convertido pela glutamato descarboxilase (GAD) para GABA (SCHOUSBOE *et al.*, 2004; BAK *et al.*, 2006).

Figura 5 - Ciclo glutamato-glutamina de uma sinapse glutamatérgica



Nas sinapses glutamatérgicas o neurotransmissor glutamato liberado é captado pelos astrócitos, onde é amidado a glutamina pela GS. A glutamina retorna aos neurônios onde o glutamato é regenerado. Como indicado pela linha tracejada, os amoníacos serão transportados de volta aos astrócitos para desintoxicação. O glutamato pode, em certa medida, ser metabolizado no ciclo de TCA tanto nos astrócitos quanto nos neurônios. Abreviaturas: Glu, glutamato; Gln, Glutamina; GS, glutamina sintetase; PAG, glutaminase ativada por fosfato; TCA, ácido tricarboxílico.

Fonte. Adaptado Bak, 2006.

3.6.3. Metabolismo do glutamato e aminotransferases

Grande proporção de glutamato do cérebro é sintetizado a partir da glicose plasmática que entra no cérebro por meio de uma família de moléculas transportadoras de glicose (GLUTs). Ela entra primeiro no compartimento de astrócitos do cérebro e é convertida em glicogênio através da reação de glicogênio sintase ou através de piruvato (LOMAKO *et al.* 1993; COULTER e EID, 2012). O piruvato pode ser convertido em lactato pela lactato desidrogenase (LDH) e também pode entrar no ciclo do TCA como acetil coenzima A via complexo piruvato desidrogenase (PDH). O alfa-cetoglutarato (α -KG), intermediário do ciclo do TCA, em seguida, dá origem a glutamato via glutamato desidrogenase (GDH) (COULTER e EID, 2012).

É importante notar que a síntese do glutamato pela glicose ou lactato irá esgotar o ciclo TCA e seus intermediários. A reposição de intermediários do ciclo do TCA, ou seja anaplerose, é, portanto, necessária para que síntese de ATP continue. Os astrócitos são capazes

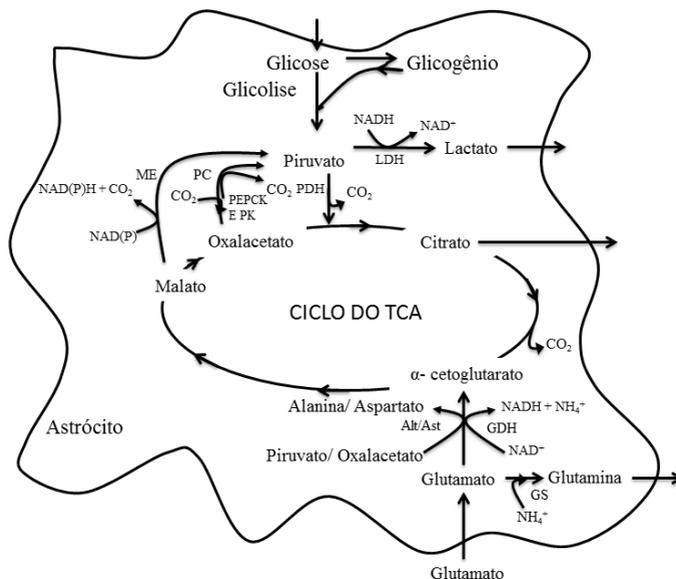
de realizar anaplerose devido à expressão da enzima piruvato carboxilase (PC), que converte piruvato em oxaloacetato (SHANK *et al.*, 1985; COULTER *et al.*, 2012). Como a piruvato carboxilase não está presente em neurônios, estas células são incapazes de fazer anaplerose e são extremamente dependentes de astrócitos para a síntese do glutamato (COULTER e EID, 2012).

O metabolismo de glutamato através do ciclo do TCA astrocitário pode representar uma via alternativa para sua eliminação (MCKENNA, 2007). O α -KG, intermediário do ciclo do TCA, além de ser convertido a glutamato via atividade da GDH, também pode gerar glutamato através de uma reação de transaminação. Por outro lado, o α -KG também pode ser oxidado no ciclo de TCA a succinato, fumarato e malato, sucessivamente. O malato, por sua vez pode ser oxidado a oxaloacetato, ou ser descarboxilado a piruvato, o qual pode ser reduzido a lactato (Figura 6) (DANBOLT, 2001).

A GDH e as aminotransferases, tais como AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), são capazes de catalisar a conversão reversível de glutamato ao seu correspondente alfa-cetoácido, α -KG. GDH é uma enzima altamente regulada que catalisa a desaminação oxidativa do glutamato em α -KG usando NAD^+ ou NADP^+ , e, por conseguinte, contribuindo para a produção de energia celular (BAK *et al.*, 2006).

As aminotransferases transferem o grupo amino do glutamato para um grupo amino α -cetoácido gerando α -KG e um novo aminoácido. Essas reações são reversíveis, podendo beneficiar a formação de glutamato ou α -KG (LANOUE *et al.*, 2001). Quando o glutamato é acumulado nos astrócitos, ocorre uma reação com piruvato para formar alanina pela ALT. Já nos neurônios a alanina poderá fornecer seu grupo amino ao α -KG, que é convertido em glutamato através da reação de transaminação (ARMANO *et al.*, 2002). Além de que, o grupo α -amino do glutamato também pode ser transferido ao oxaloacetato produzindo α -KG e aspartato, em uma reação catalisada pela AST (LANOUE *et al.*, 2001)

Figura 6 - Destino metabólico do glutamato captado pelos astrócitos



O glutamato captado pelo astrócitos pode ser metabolizado por 2 rotas diferentes: i) transformado em glutamina pela ação da GS; ou ii) convertido em α -cetoglutarato (α -KG), por desaminação pela glutamato desidrogenase (GDH) ou transaminação por uma aminotransferase. O α -KG será metabolizado através do ciclo do TCA, produzindo em última instância o lactato. Ambos, lactato e glutamina, são liberados no fluido extracelular.

Fonte. Adaptado Lajtha, 2007.

3.7. ESPECIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O cérebro é um alvo fácil dessas moléculas reativas, por conter alta concentração de lipídeos e consumir muito oxigênio. A ingestão de etanol diminui as defesas endógenas antioxidantes como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), responsáveis pela detoxificação do radical superóxido e hidroperóxidos (LI e WANG, 2004). O etanol também pode promover o estresse oxidativo, que é uma condição de desequilíbrio entre espécies reativas e defesas antioxidantes, envolvido em muitos efeitos tóxicos. Isso ocorre pelo aumento da formação de radicais superóxido e

hidroxila, via mitocôndria pelas enzimas citocromo P450, como a CYP2E1, durante a oxidação do acetaldeído à acetato (GOODLETT *et al.*, 2005).

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados que são altamente instáveis e ativo no sentido de reações químicas com outras moléculas. Eles derivam de três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre, criando, assim, espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de enxofre (ERSs) (CAROCHO e FERREIRA, 2013; VALKOA *et al.*, 2006). Os radicais livres estão relacionados com variedade de doenças, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento.

As EROs incluem os radicais livres, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroperoxil (HO_2^{\cdot}), o radical hidroxil ($\cdot OH$), o óxido nítrico (NO^{\cdot}) bem como outras espécies reativas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). As ERNs derivam do NO^{\cdot} por reação com $O_2^{\cdot-}$, e formam $ONOO^{\cdot}$. As ERSs são facilmente formadas por reação de tióis com EROs (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

EROS e ERNs podem ser gerados durante radiação ultravioleta, raios-X, por poluentes na atmosfera, produzidas por neutrófilos e macrófagos durante inflamação, subprodutos de reações de transporte de elétrons das mitocôndrias que é catalisada por outros mecanismos, xenobióticos, medicamentos, tabagismo, entre outros (VALKOA *et al.*, 2006).

EROs/ERNs são conhecidos por desempenhar um papel duplo em sistemas biológicos, uma vez que pode ser prejudicial ou benéfico para sistemas vivos. Os efeitos benéficos de EROs envolvem funções fisiológicas em respostas celulares, como na defesa contra agentes infecciosos. Outro exemplo vantajoso de EROs em baixas concentrações é a indução de uma resposta mitogênica. No entanto, em altas concentrações, podem ser importantes mediadores de danos nas estruturas celulares, incluindo lipídeos e membranas, proteínas e ácidos nucleicos, denominado assim de estresse oxidativo (POLI *et al.*, 2004; VALKOA *et al.*, 2006).

Denomina-se estresse oxidativo a situação em que as células estão expostas a um ambiente pró-oxidante e os mecanismos defensivos antioxidantes são excedidos de forma que chega a afetar o estado redox celular. Nos sistemas biológicos os elementos pró-oxidantes provém em sua maioria do oxigênio. Contudo o estresse oxidativo é o desequilíbrio

entre os mecanismos oxidativos e as defesas antioxidantes celulares (SANCHEZ, 2012).

3.7.1. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (LPO) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais sobre lipídios das membranas celulares, gerando principalmente L^{\bullet} , LO^{\bullet} e LOO^{\bullet} , essa peroxidação consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. Isso leva à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos, e numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996).

A LPO leva a um evento citotóxico primário que desencadeia sequência de lesões na célula, essas alterações nas membranas alteram a permeabilidade, o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (BARBER; HARRIS, 1994).

A mensuração da peroxidação lipídica é importante *in vivo*. Geralmente são determinadas as concentrações dos produtos finais do processo, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonal (HNE), que podem causar danos a proteínas e ao DNA. (AROUMA, 1998).

3.8. DEFESAS ANTIOXIDANTES

Os efeitos nocivos das EROs são equilibrados pela ação de antioxidantes não-enzimáticos (endógenos ou nutricionais) e enzimáticos (VALKOA *et al.*, 2006). Através da ação das enzimas antioxidantes, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim a formação do radical hidroxil, que é altamente reativo e deletério às células (BOVERIS & CADENAS, 1997). Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Para proteção da célula, existe um sistema de defesa que atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão constituída por glutathiona reduzida (GSH), SOD, CAT, GPx, e vitaminas E e C, entre outros. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um

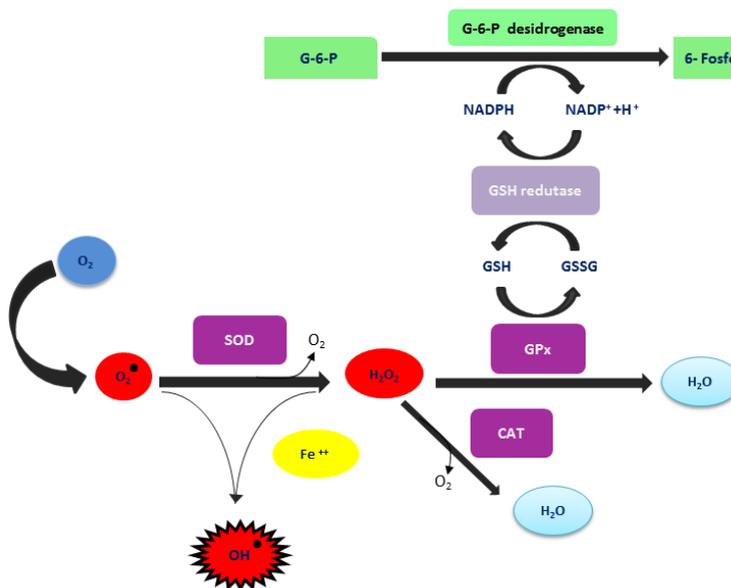
antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (RAHMAN, 2007).

Apesar da presença de um sistema de defesa antioxidante da célula contra danos oxidativos de EROs, esses danos são acumulados durante o ciclo de vida, e os danos relacionados com a DNA, as proteínas e os lipídeos podem desempenhar um papel chave no desenvolvimento de doenças.

3.9. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Os antioxidantes enzimáticos são divididos em defesas enzimáticas primárias e secundárias. A defesa primária é composta por três enzimas importantes que neutralizam os radicais livres: a SOD, que converte o radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio; a CAT, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular; e a GPx, que transfere dois elétrons da GSH para reduzir os peróxidos (RAHMAN, 2007; CAROCHO e FERREIRA, 2013). As defesas enzimáticas secundárias incluem a glutatona redutase (GR) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). A GR reduz a glutatona a partir de sua forma oxidada (GSSG) para sua forma reduzida (GSH). Esta reciclagem de GSH é fundamental no intuito de neutralizar mais radicais livres. A G6PD regenera o NADPH, criando um ambiente redutor (RATNAM *et al.*, 2006; CAROCHO e FERREIRA, 2013) (Figura 7).

Figura 7 - Esquema das defesas antioxidantes, mostrando a geração de espécies reativas.



Antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa reduzida (GSH), glutationa redutase (GR).
Espécies reativas: radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

3.9.1. Superóxido dismutase – SOD

Nos seres humanos, há três formas de SOD: citosólica de Cu, Zn-SOD; mitocondrial Mn-SOD; e SOD extracelular (EC-SOD). A SOD destrói $O_2^{\cdot-}$ com taxas de reação extremamente altas, por oxidação e redução sucessiva do íon de metal de transição no sítio ativo, mas também faz a eliminação de $O_2^{\cdot-}$ mesmo em baixas concentrações. Cu, Zn-SOD catalisa especificamente a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e água (MATES et al., 1999). Cada subunidade contém como o sítio ativo um aglomerado de metal dinuclear constituído por íons de cobre e zinco. Mn-SOD mitocondrial é um homotetrâmero contendo um átomo de manganês por subunidade. Mn-SOD é uma das enzimas

antioxidantes mais eficazes que tem atividade antitumoral (VALKOA *et al.*, 2006).



3.9.2. Catalase – CAT

A CAT é uma enzima encontrada em células vegetais, animais e em bactérias, localizada nos peroxissomos e na mitocôndria; entretanto, nos eritrócitos encontra-se no citosol. Esta enzima é muito eficiente na conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (VALKOA *et al.*, 2006). Abaixo está demonstrada a reação catalisada pela CAT.



A CAT tem uma das maiores taxas de eficiência catalítica: uma molécula de catalase pode converter ±6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular a cada minuto (VALKOA *et al.*, 2006).

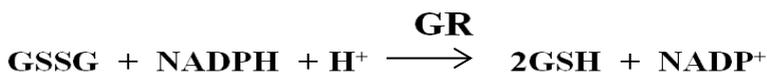
3.9.3. Glutationa peroxidase e glutaciona redutase

A GPx possui duas formas da enzima, uma das quais é independente do selênio, enquanto que a outra é dependente (MATES *et al.*, 1999). A GPx atua em conjunção com o tripeptídeo GSH, que está presente nas células em elevadas concentrações. Sua atividade baseia-se em reduzir o H_2O_2 através da reação mostrada abaixo. Significativamente, a GPx compete com CAT para utilizar H_2O_2 como substrato e é a principal fonte de proteção contra os baixos níveis de stress oxidativo (VALKOA *et al.*, 2006).



A GPx converte a GSH em sua forma oxidada (GSSG), e para evitar a depleção da GSH e o aumento da GSSG, a glutaciona redutase

(GR) reduz a GSSG as custas de NADPH, regenerando a GSH e mantendo o estado redox intracelular. A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (proveniente da via das pentoses) fornece os equivalentes redutores (NADPH) para regeneração de GSSG em GSH. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da GSH também é afetada, pois a GSSG não pode ser regenerada, causando assim, sérios danos ao metabolismo celular (SANCHEZ, 2012).



3.9.4. Glutationa-S-transferase - GST

As GSTs estão envolvidas na excreção de substâncias fisiológicas e xenobiótico, detoxificação celular e auxiliando na proteção celular contra danos oxidativos (LEE *et al.*, 2002). As GSTs catalisam o ataque nucleofílico da glutationa reduzida (GSH) a grupos eletrofílicos de compostos orgânicos (xenobióticos e compostos endógenos), tornando os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção (WILCE e PARKER, 1994). Uma vez formados os conjugados da GSH/xenobióticos são reconhecidos por transportadores específicos e conduzidos para o meio intercelular. No meio intercelular estes conjugados são clivados pela ação da enzima GGT e dipeptidases presentes na porção externa da membrana celular. O glutamato e a glicina livres podem ser reabsorvidos pela célula e utilizados na síntese de GSH (HUBER *et al.*, 2008).

3.9.5. γ -Glutamil transferase – GGT

A γ -glutamil transferase (GGT) é uma glicoproteína ligada à membrana celular, amplamente distribuída nos tecidos de mamíferos, responsável pela transferência de grupos glutamyl da GSH para inúmeros aminoácidos ou peptídeos, tendo a glutationa como principal substrato (ZHANG *et al.*, 2005). Ela participa na reciclagem de aminoácidos da glutationa e conjugados de glutationa secretados para o meio extracelular. Esses aminoácidos são reintroduzidos para o meio intracelular participando da síntese *de novo* de GSH. Sua ação possibilita a captação de cisteína, elemento limitante para a síntese de

GSH. A GGT também é responsável pela degradação da glutathione, tornando-a disponível como fonte de cisteína para síntese proteica (TATEISHI *et al.*, 1977).

3.10. ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICOS

Há diversos antioxidantes endógenos não enzimáticos como, por exemplo, as vitaminas (C, E), cofatores de enzimas (Q10), compostos de nitrogênio (ácido úrico) e peptídeos (GSH) (CAROCHO e FERREIRA., 2013).

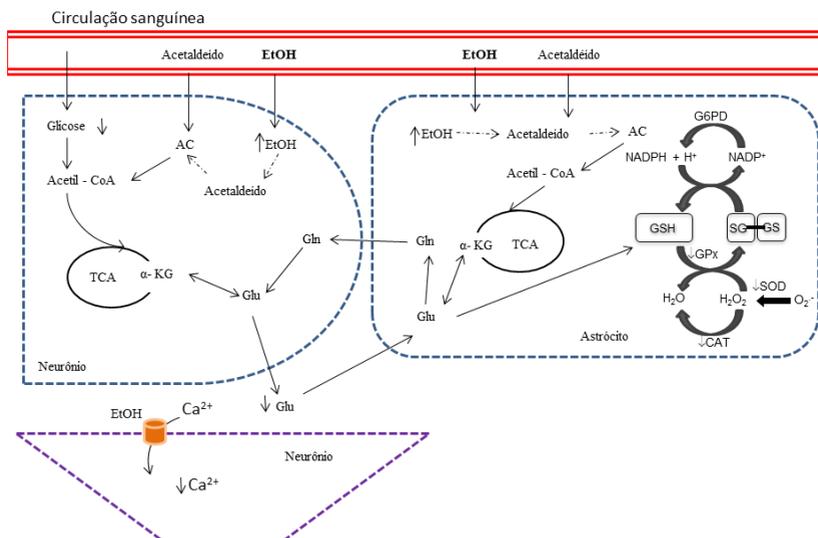
O principal antioxidante tiol é a GSH, um antioxidante não enzimático intracelular multifuncional. Ela é considerada como o principal tampão redox tiol-dissulfeto da célula, abundante no citosol, núcleo e mitocôndrias. Geralmente, a capacidade antioxidante dos compostos tiólicos é devido ao átomo de enxofre, que pode facilmente acomodar a perda de um único elétron. Dentre as funções da GSH inclui-se a participação no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática, bem como detoxificação do peróxido de hidrogênio e de peróxidos lipídicos através da ação catalítica da GPx. No entanto, a depleção de GSH pode estar associada com a diminuição da proliferação celular em células endoteliais vasculares e aumento da proliferação de fibroblastos (VALKOA *et al.*, 2006).

A vitamina C (ácido ascórbico) é um importante e poderoso antioxidante atuando em compartimentos aquosos do organismo, podendo atuar na redução da vitamina E, que é o principal antioxidante biológico presente nas membranas celulares. Sua principal função é a proteção antioxidante frente à peroxidação lipídica (VALKOA *et al.*, 2006).

4. HIPÓTESE

Considerando-se dados da literatura, que demonstram que o etanol induz o estresse oxidativo e afeta a neurotransmissão glutamatérgica no cérebro adulto, este estudo pretende atestar que a exposição materna crônica ao etanol durante os períodos de gestação e aleitamento é capaz de afetar diferentes parâmetros neuroquímicos no hipocampo da prole. Para comprovar esta hipótese, foram estudadas as ações no hipocampo de ratos imaturos expostos ao etanol durante a gestação e lactação avaliando diferentes parâmetros bioquímicos: influxo de $^{45}\text{Ca}^{++}$, influxo de $[^{14}\text{C}]$ -desoxiglicose e $[^{14}\text{C}]$ -glutamato, atividade das aminotransferases (AST e ALT) e atividade das enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, bem como níveis de GSH, TBARS e proteína carbonilada. A figura 8 apresenta esquematicamente a hipótese deste estudo.

Figura 8 - Possíveis alterações em hipocampo de ratos imaturos expostos ao etanol na gestação e lactação.



Propõe-se que tanto o etanol quanto o acetaldeído podem penetrar a barreira hematoencefálica, interferir no metabolismo energético e no ciclo glutamato-glutamina com consequente indução de estresse oxidativo. A hipótese deste

estudo é que o etanol inibe o influxo de cálcio, e diminui o influxo e metabolismo do glutamato, assim como a indução do estresse oxidativo. Glu = glutamato, Gln = glutamina, GS = glutamina sintetase, α -KG = alfa-cetoglutarato, EtOH = etanol.

Fonte: do autor

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. MATERIAIS

O etanol absoluto foi obtido da Synth (Diadema, SP, Brasil). As substâncias radiotivas, [$^{45}\text{Ca}^{2+}$]- CaCl_2 (atividade específica 321 KBq/mg Ca^{2+}) e [^{14}C]-2-deoxi-D-glicose (^{14}C -DG), (atividade específica 9,25 GBq/mmol) e [^{14}C]-glutamato (atividade específica 1,85 MBq) foram obtidos da “Du Pont NEN Products” (Boston, EUA), e o líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foi adquirido da Perkin Elmer (São Paulo, SP, Brasil). Os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.2. ANIMAIS

Ratas linhagem Wistar fêmeas prenhas foram obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e submetidos a um ciclo claro/escuro (12/12 horas), em sala climatizada com temperatura controlada, ração e água à vontade. Todos os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária (CMV) e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), protocolo CEUA/UFSC#PP00854. Os animais foram randomizados em dois grupos: controle e tratado. O grupo controle recebeu água e ração *ad libitum* durante todo o período do experimento. Já o grupo tratado recebeu etanol diluído na água de beber e ração *ad libitum* durante todo o experimento. As fêmeas grávidas foram colocadas em caixas individuais. O dia do parto foi designado como dia 1 da lactação, e o dia 21, o dia final da lactação. Durante o período de amamentação, os filhotes terão livre acesso ao leite materno.

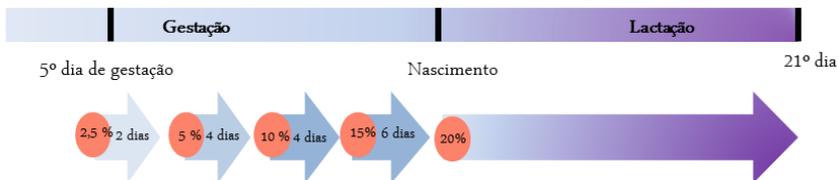
5.3. TRATAMENTO COM ETANOL

O etanol foi administrado na água de beber, conforme método já descrito por Tavares *et al.*, (1998), com modificações, a partir do 5º dia de gestação. O álcool introduzido durante a gestação e a amamentação, começou com uma dose baixa diluído em água e ao longo dos dias a

concentração do álcool foi aumentada. A dose começou com 2,5% de etanol (v/v), *ad libitum*, durante dois dias, 5% de etanol durante quatro dias, 10% durante quatro dias, 15% de etanol durante seis dias e posteriormente as ratas passaram a receber 20% de etanol até os filhotes completarem 21 dias de idade, para assim caracterizar um modelo de exposição crônica. Durante a gestação e lactação, as ratas permaneceram em caixas separadas individualmente e receberam ração *ad libitum* e etanol no grupo tratado ou água no grupo controle como única fonte de líquido. A prole, portanto, também foi exposta ao etanol durante esse período.

Os animais foram eutanasiados e o hipocampo removido. Os testes bioquímicos foram realizados em fatias de hipocampo. As fatias foram homogeneizadas nos tampões específicos dependendo da determinação bioquímica a ser realizada.

Representação esquemática do tratamento com etanol.



5.4. INFLUXO DE [¹⁴C]-GLUTAMATO

O influxo de glutamato foi determinada em fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade, estas foram pré-incubadas por 15 minutos a 37°C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄) para estabilização do tecido, a captação foi iniciada, o meio foi trocado com a adição de 0,2 μCi [¹⁴C]-glutamato. As fatias permaneciam por 10 minutos nesse meio de captação. A incubação foi interrompida com a retirada do meio de captação e lavagem por duas vezes com 200 μl de HBSS gelado. Para solubilização das fatias, estas foram adicionada em 300μL de uma solução de NaOH 0,1 M/SDS 0,01%. Após a completa solubilização, foi determinado o conteúdo intracelular de glutamato pela avaliação de cintilação líquida. A captação de glutamato foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons

sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados foram expressos como nmol [^{14}C] - glutamato/ μg proteína/min.

5.5. INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

O influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi determinada em fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade tratados ou não com etanol, estas foram pré-incubadas por 15 minutos a 37°C , em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl_2 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO_4 0,65 mM, Na_2HPO_4 . Após, o meio foi trocado por HBSS fresco com $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e o tecido incubado durante 5, 15, 30 ou 60 minutos. Posteriormente, o $^{45}\text{Ca}^{2+}$ extracelular foi totalmente lavado com uma solução de cloreto de lantânio (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO_4 1,2 mM, HEPES 10 mM, Glicose 11 mM, LaCl_3 10 mM, pH 7) interrompendo o fluxo de cálcio na preparação. Após 10 min, a solução de cloreto de lantânio foi removida e $300 \mu\text{L}$ de NaOH 0,5 M foram adicionados a cada amostra e determinada a concentração de proteínas em cada amostra. Aliquotas de $100 \mu\text{L}$ deste homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Os resultados foram expressos como pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ / μg de proteína (ZAMONER *et al.*, 2007).

5.6. INFLUXO DE [^{14}C]-DESOXIGLICOSE

Fatias do hipocampo foram pré-incubadas em solução salina balanceada de Hanks, durante 15 min para estabilização. O tecido foi incubado por 30 ou 60min em HBSS fresco contendo D-glicose 2 mM e [^{14}C]-deoxiglicose $0,2 \mu\text{Ci/mL}$. Posteriormente, o meio de incubação foi retirado e o tecido lavado por 3vezes com HBSS fresco, e lisado em solução NaOH 0,5 M. Aliquotas de $100 \mu\text{L}$ deste homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida e uma alíquota de $5 \mu\text{L}$ foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados foram expressos como pmol [^{14}C]-deoxiglicose/ mL/mg proteína (ZAMONER *et al.*, 2007).

5.7. CONTEÚDO DE GSH

Para determinar o conteúdo de GSH, os hipocampus foram pesados e posteriormente homogeneizados com solução de ácido tricloroacético 12%, (TCA 12%) na proporção de 1:10 (p/v). As determinações foram realizadas com o sobrenadante após a centrifugação do homogeneizado. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e mantidas em gelo durante todo o ensaio. Os níveis de glutatona foram determinados segundo o método descrito por Beutler *et al.* (1963), que é baseado na reação da GSH com DTNB (5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) formando um ânion conjugado, TNB (ácido tionitrobenzóico) de cor amarelada, que é mensurável em 412 nm. Para a realização da técnica, uma alíquota de 50 μL da amostra foi acrescentada na cubeta contendo 950 μL de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0, seguida da adição de 100 μL de DTNB 2,5 mM. Após cerca de 2 min obtém-se a máxima formação de TNB, que foi medido espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos como conteúdo de GSH em $\mu\text{mol.g}^{-1}$.

5.8. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.8.1. Glutamina sintetase

Fatias de hipocampo foram homogeneizadas em 150 μL de tampão de lise (Imidazol 20 mM; KCl 150 mM; EDTA 0,1 mM – pH 6,8), em seguida as amostras foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi separado. 50 μL deste sobrenadante foi adicionado em 100 μL de imidazol-HCl 80 mM, pH 7,0 (imidazol-HCl 80 mM, glutamina 30 mM, MnCl_2 3 mM, hidroxilamina-HCl 30 mM, arseniato de sódio 20 mM, ADP 4 mM). Após 30 minutos de incubação a 37°C a reação foi interrompida por adição de 200 μL de uma mistura contendo FeCl_3 3,7 mM; Ácido tricloroacético 1,2 M; HCl 10 M e água. O produto da reação, γ -glutamilhidroxamato, foi medido a 540 nm utilizando um leitor de ELISA e convertido para a quantidade de produto formado por comparação com uma curva padrão. A atividade enzimática foi expressa como mM hidroxamato/mg proteína. (SHAPIRO e STADTMAN, 1970; COSTA *et al.*, 2012).

5.8.2. Atividade das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase

Os hipocampos retirados e homogeneizados em 300 μ l de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4 e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). As atividades das enzimas ALT e AST foram determinadas através de reações colorimétricas. Na reação, a alanina aminotransferase (ALT/TGP) catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. A aspartato aminotransferase (AST/TGO) catalisa especificamente a transferência do grupo amina do aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. Tanto o piruvato quanto o oxaloacetato reagem com a 2-4- dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra, e é medida espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 505 nm. Os resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

5.8.3. Atividade da γ -glutamil transferase - GGT

Os hipocampos de ratos imaturos foram homogeneizados em 300 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5. A atividade enzimática da GGT foi realizada através da seguinte reação: o grupo glutamil, da γ - glutamil-p-nitroanilida (substrato) é transferido pela GGT para a glicilglicina (ceptor), com liberação de p-Nitroanilina, a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea com uma absorbância que pode ser medida num comprimento de onda de 530 nm. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados da atividade da GGT foram expressos como U/L/ μ g proteína.

5.8.4. Lactato desidrogenase - LDH

Os hipocampos de ratos imaturos foram homogeneizados em Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e a atividade enzimática da LDH foi determinada através de uma mistura de reagentes contendo lactato (substrato), difosfopiridino nucleótido (NAD^+), fenazina metossulfato (FMS), alumínio férrico e 1,10-fenantrolina, utilizando a reação de lactato à piruvato, com determinação quantitativa e simultânea do NADH formado na reação enzimática. Os resultados foram expressos como % do controle.

5.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx, GR e GST, assim como dos marcadores de danos oxidativos (TBARS e proteína carbonilada - PC), o hipocampo foi pesado e homogeneizado com uma solução contendo tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4; 0,1% Triton e NaCl 150 mM, (1:20 p/v), e uma alíquota foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al.*, (1951). As determinações enzimáticas foram realizadas usando-se o sobrenadante após centrifugação do homogeneizado (5.000 x g por 5 min).

5.9.1. Superóxido Dismutase- SOD

A atividade da SOD foi realizada de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2.0 para pH 10.0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm. Em uma placa de 96 poços uma curva de amostras é feita (5, 10, 15, 20, 40 μ l) após foi adicionado glicina 50 mM, pH 10.2, foram adicionados 5 μ L de adrenalina 60 mM (pH em torno de 2.0. Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD (USOD/g) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo.

5.9.2. Catalase - CAT

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984), que é baseado na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Adicionou-se 2 μ L desta solução na placa de 96 poços, com acréscimo de 20 μ L da amostra, em seguida realizou-se leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 5 minutos. Os valores foram expressos em $\text{mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.9.3. Glutationa peroxidase - GPx

Para a análise enzimática de GPx o método de Flohé e Gunzler (1984) foi utilizado, no qual a reação é baseada na redução de

tertbutilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx, e conseqüente regeneração de GSH através da enzima GR, com oxidação de NADPH em 340 nm. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GPx na amostra. Para a realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7.0), 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) a 5 mM, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5U de GR, no momento do ensaio. Em seguida, foram adicionados 5 μ L de t-BuOOH e 5 μ L de amostra em 200 μ L de um meio de reação na placa de 96 poços. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.9.4. Glutaciona redutase

A GR foi determinada pelo método de Calberg e Mannervick (1985), o qual verificou em 340 nm a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da GSSG, pela ação desta enzima presente na amostra. Um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutaciona oxidada e DPTA 5 mM foi adicionado placa de 96 poços (200 μ L), e a adição de 5 μ L de amostra deu início a reação que foi monitorada durante 3 minutos, gerando uma curva descendente. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.9.5. Glutaciona-S-transferase

A atividade da GST foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Habig e colaboradores (1976). A reação baseia-se na capacidade da GST em conjugar GSH no substrato, formando uma substância mensurável em 340 nm, monitorada durante 3 minutos. A amostra foi adicionada a um meio contendo 5 μ L de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) (substrato), 5 μ L de GSH 0,1 M e 250 μ L de tampão fosfato 0,1 M pH 7.0. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.9.6. Glicose-6-fosfato Desidrogenase

Para o ensaio da enzima G6PD, as fatias de hipocampo foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4, e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). Uma alíquota do homogeneizado foi incubada na presença de NADP^+ levando a oxidação da

glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato. O NADPH produzido foi quantificado de modo cinético durante 10 minutos. Os resultados foram calculados pela avaliação do aumento da densidade óptica por minuto (declínio) da amostra contra o "declínio" da atividade enzimática do padrão de G6PD. Os resultados foram expressos como U/ μ g proteína.

5.10. DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVO

5.10.1. Lipoperoxidação tecidual – TBARS

A avaliação do dano oxidativo lipídico foi realizada no homogeneizado através da detecção de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o produto majoritário, MDA (malondialdeído), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa, os quais são derivados de oxidação do processo de lipoperoxidação (BIRD; DRAPER, 1984). O método consiste na precipitação da amostra (100 μ L) com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 12%, seguido da incubação em 900 μ L de tampão tris-HCl 60 mM 7,4 e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min. a 100 °C. Posteriormente, o material foi resfriado em banho de gelo, centrifugado (5.000 x g por 5 min), e a mensuração do cromóforo rosa foi detectada 535 nm. Os valores obtidos foram expressos em nmol MDA.g⁻¹.

5.10.2. Proteína carbonilada

Dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado pelo método descrito por Levine e colaboradores (1990). Inicialmente foram adicionados 100 μ L da amostra em 600 μ L de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 Mm preparado em solução de HCl 2 N, seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação contínua. Após, foi adicionado 600 μ L de TCA 20 %, com agitação e banho de gelo durante 10 min, seguido de centrifugação (5 min a 10.000 x g), e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min a 10.000 x g), com 800 μ L de etanol-acetato de etila (1:1 v/v). Finalmente, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados 900 μ L de guanidina 6,0 M preparada em solução de KH₂PO₄ 20 Mm, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C com agitação contínua por 60 min, para posteriormente proceder à

leitura a 360 nm. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol.mg^{-1} proteína.

5.11. QUANTIFICAÇÃO DE ALDEÍDOS

A quantificação de aldeídos foi determinada através do método descrito por Chio e Tappel (1969). Inicialmente o hipocampo foi removido e pesado $\pm 0,1$ g de tecido que foi homogeneizado (P:V, 1:20) na mistura cloroformio: etanol. Após foi adicionada a mesma quantidade de água destilada e centrifugado a 3000 rpm por 3 minutos, até ocorrer a separação das fases. Após retirou-se 1 mL da camada de clorofórmio e a qual foi adicionado 100 μL de metanol. Os produtos fluorescentes solúveis em lipídios resultantes da lipoperoxidação foram analisados através da excitação em 355 e da emissão em 450 nm.

5.12. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais foi avaliada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Uma curva padrão utilizando a albumina de soro bovino (Sigma®) foi utilizada para calcular os níveis de proteína nas amostras.

5.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações realizadas em duplicatas em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste “t” de Student ou ANOVA de uma ou duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, quando necessário, utilizando-se o programa INSTAT versão 2.02. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

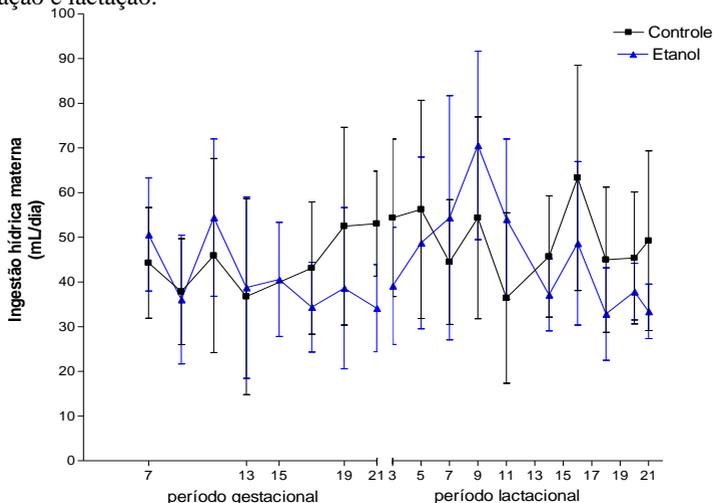
6. RESULTADOS

Neste trabalho, foi utilizado um modelo experimental de exposição materna ao álcool etílico durante os períodos gestacional e lactacional, com o intuito de avaliar as alterações bioquímicas induzidas no hipocampo da prole aos 21 dias de idade. Foram determinados o influxo de [^{14}C]-glutamato, o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, influxo de [^{14}C]-desoxiglicose, os conteúdos de GSH, marcadores de dano oxidativo TBARS e proteína carbonilada, assim como a atividade das enzimas GS, GGT, AST, ALT, LDH e a atividade das enzimas antioxidantes no hipocampo dos filhotes de ratas controles e expostas ao etanol.

6.1. CONSUMO DE ÁGUA OU ETANOL POR RATAS DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Para a caracterização do modelo experimental de exposição gestacional e lactacional ao etanol, determinou-se a ingestão hídrica diária das ratas. Os resultados mostraram que o etanol não afeta a ingestão hídrica durante os períodos de gestação e lactação (Figura 9).

Figura 9 - Consumo materno diário de água ou solução contendo etanol durante a gestação e lactação.



A ingestão hídrica foi monitorada diariamente. Os valores estão expressos como a média \pm E.P.M. de pelo menos 10 ratas por grupo.

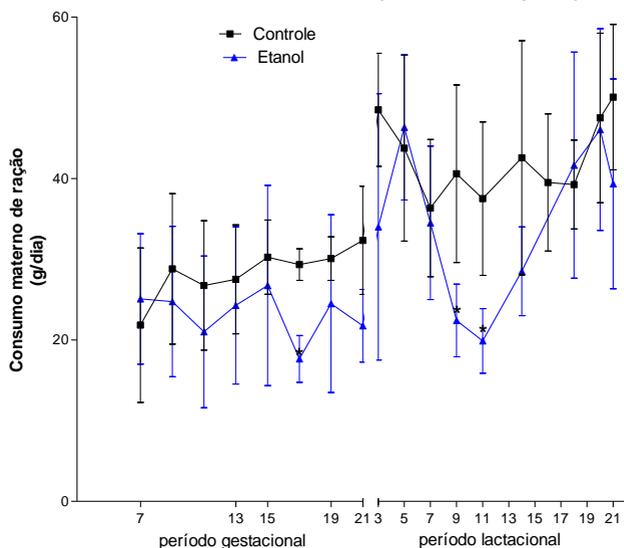
animais de cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

Fonte: do autor

6.2. CONSUMO DIÁRIO DE RAÇÃO POR RATAS DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

O consumo diário de ração pelas ratas durante a gestação e o aleitamento foi mensurado com o intuito de verificar os efeitos do etanol na ingestão de nutrientes. Os resultados mostraram que a exposição crônica ao etanol levou a menor ingestão materna de alimento no final do período gestacional bem como entre o 9º e 11º dias pós-parto (Figura 10), períodos críticos para os processos de sinaptogênese da prole.

Figura 10 - Consumo materno diário de ração durante a gestação e lactação.



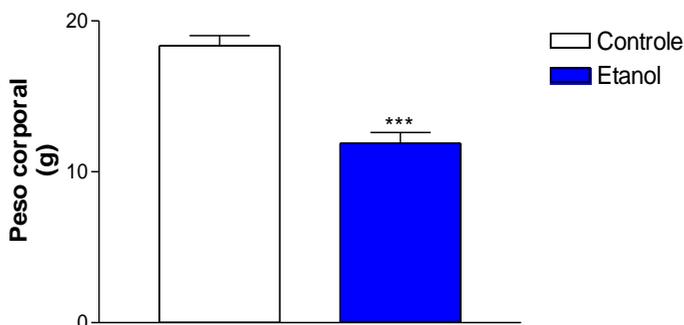
A ingestão materna de ração foi monitorada diariamente. Os valores estão expressos como a média \pm E.P.M. de pelo menos 10 animais de cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: $*p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

Fonte: do autor

6.3. PESO CORPORAL DOS FILHOTES EXPOSTOS OU NÃO AO ETANOL DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Para investigar os efeitos do etanol durante a gestação e aleitamento, os filhotes foram pesados no dia do experimento aos 21 dias de idade. A figura 11 mostra que a exposição materna ao etanol induz importante diminuição no peso corporal da prole.

Figura 11 - Peso corporal dos filhotes de 21 dias de idade expostos ou não ao etanol durante a gestação e lactação



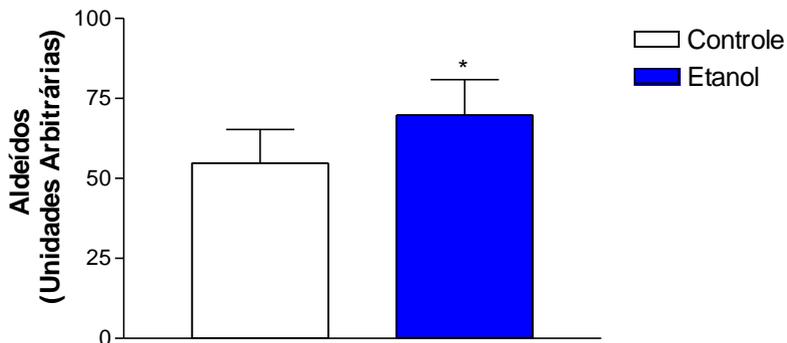
Os resultados são expressos como média \pm SEM. Análise estatística: Teste “t” de Student. *** $p < 0,001$, comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.4. FORMAÇÃO DE ALDEÍDOS

Os produtos fluorescentes da reação de aldeídos com grupamentos amina livres (provenientes de aminoácidos, ácidos nucleicos ou proteínas) foram determinados em hipocampo de ratos imaturos expostos ou não ao etanol durante a gestação e aleitamento. Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol induziu aumento no conteúdo de aldeídos no hipocampo dos filhotes de 21 dias (figura 12).

Figura 12 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre os produtos fluorescentes de reação com aldeídos presentes em hipocampus de ratos de 21 dias de idade



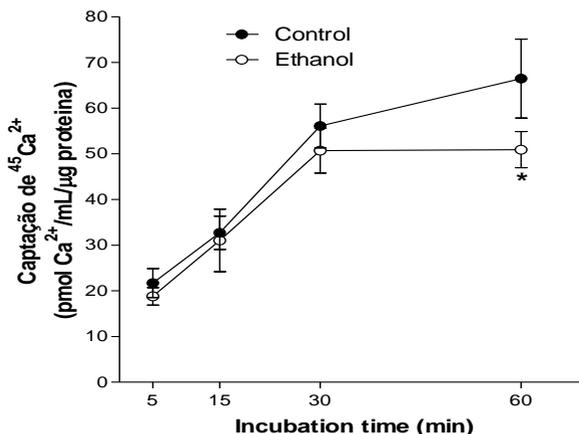
Fatias de hipocampo de animais controles e expostos ao etanol foram processadas para determinação do conteúdo de produtos fluorescentes da reação com aldeídos. Os resultados são expressos como média \pm SEM. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$, comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.5. INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Para investigar os efeitos da exposição materna ao etanol no influxo de Ca^{2+} , fatias de hipocampo foram incubadas com $0,1 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante 5, 15, 30 ou 60 min. Os resultados demonstraram que a exposição ao etanol induz a diminuição no influxo e acúmulo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ após 60 minutos de incubação com o radioisótopo, sem alterar este parâmetros nos demais tempos (Figura 13).

Figura 13- Efeito da exposição materna ao etanol sobre a influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampus de ratos de 21 dias de idade



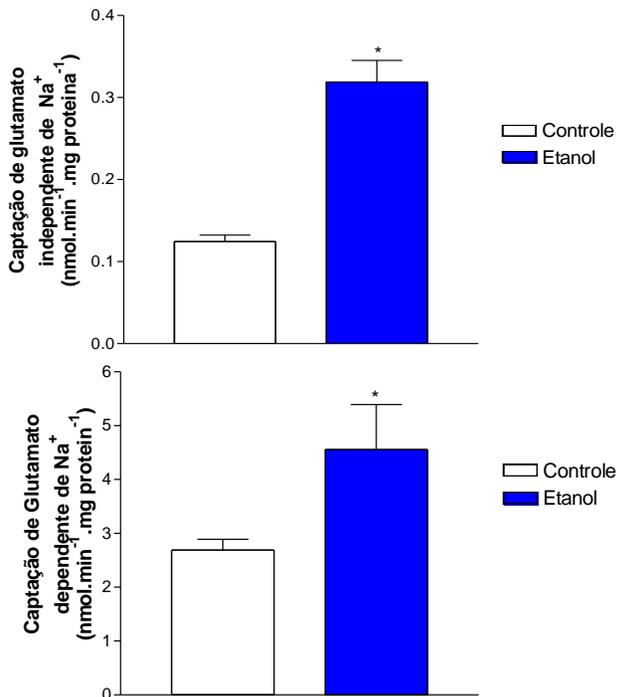
Fatias de hipocampo foram incubadas por 5, 15, 30 e 60 min com $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 10 animais e expressos em $\text{pmol } ^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{mg}$ de proteína. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: $*p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

Fonte: do autor

6.6. PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EM HIPOCAMPO DE FILHOTES EXPOSTOS AO ETANOL NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

No intuito de investigar o envolvimento do sistema glutamatérgico nos efeitos induzidos pelo etanol sobre o hipocampo de ratos imaturos, foram realizados ensaios de influxo de ^{14}C -glutamato e atividade da GS. Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol foi capaz de aumentar o influxo de ^{14}C -glutamato dependente e independente de Na^+ em fatias de hipocampo dos filhotes de 21 dias de idade (Figura 14), corroborando a diminuição no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ observada nos mesmos animais.

Figura 14 - Consequências da exposição materna ao etanol sobre a influxo [^{14}C]-Glutamato em hipocampus de ratos de 21 dias de idade

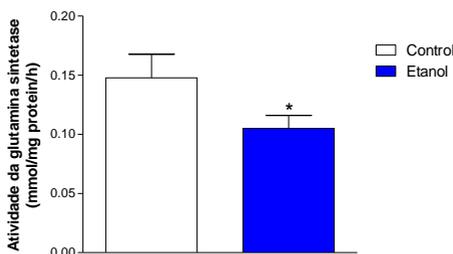


A captação foi iniciada com a adição de 0,33 μCi [^{14}C]-glutamato ao meio de incubação (10 min) e foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste "t" de Student: * $p < 0,05$.

Fonte: do autor

O aumento do influxo do neurotransmissor excitatório glutamato indica um aumento da quantidade deste nos astrócitos. Sendo assim, investigou-se a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do glutamato, como a GS que tem como função a amidação de glutamato a glutamina. Os resultados demonstraram uma diminuição significativa na atividade da glutamina sintetase (Figura 15).

Figura 15 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a atividade da GS no hipocampo da prole de 21 dias de idade

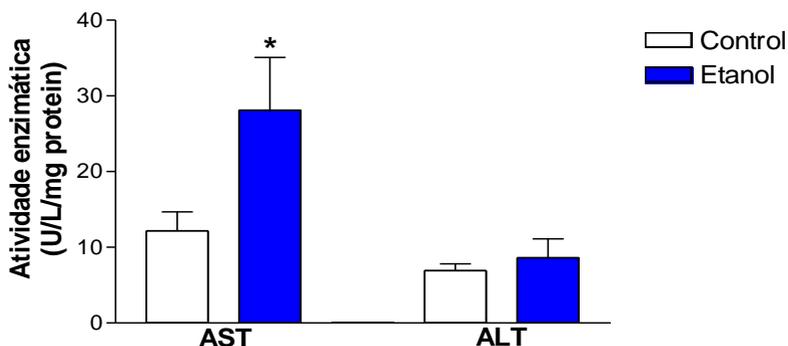


Fatias de hipocampo de animais controles e tratados foram homogeneizadas e a atividade da glutamina sintetase foi mensurada. Os resultados são expressos como média \pm SEM. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$, comparado com o controle.

Fonte: do autor

A atividade das aminotransferases ALT e AST foi determinada com o intuito de verificar as consequências da exposição crônica ao etanol sobre as reações de transaminação no hipocampo dos filhotes. Os resultados mostraram aumento na atividade da AST sem alterar a atividade da ALT em hipocampo de filhotes expostos ao etanol na gestação e lactação como demonstrado na figura 16.

Figura 16 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a atividade das aminotransferases AST e ALT em hipocampus de ratos de 21 dias de idade.



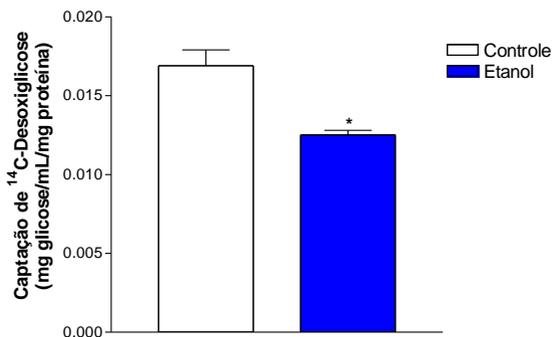
A atividade das aminotransferases foi mensurada no homogeneizado de hipocampo dos animais controle e tratado com 21 dias de idade. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. Diferenças estatisticamente

significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: $*p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

Fonte: do autor

A glicose já é bem estudada como substrato energético, atuando como precursora de moléculas como lactato, oxaloacetato, glicogênio e alanina, contribuindo para a função normal do cérebro. Assim, analisamos o envolvimento de possíveis alterações na captação de glicose no efeito causado pelo álcool em hipocampo de filhotes de 21 dias expostos durante a gestação e aleitamento. Os resultados mostraram que o álcool diminui a influxo de [^{14}C]-DG em hipocampo de ratos de 21 dias de idade após 30 minutos de incubação com a mesma (figura 17).

Figura 17 - Efeito do etanol sobre a atividade da influxo de [^{14}C]-desoxiglicose em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação.



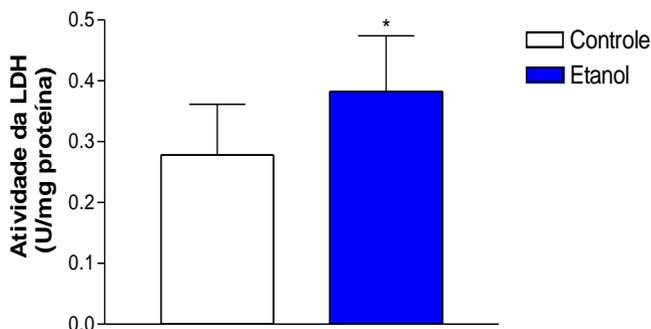
Fatias de hipocampo foram incubadas com $0,2 \mu\text{Ci/mL}$ de [^{14}C]-glutamato durante 30 min. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: $*p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

Fonte: do autor

O glutamato captado pela glia pode ser metabolizado a glutamina ou a $\alpha\text{-KG}$, o qual poderá ser metabolizado no ciclo do TCA. Em última instância, poderá ainda levar a formação de lactato, o qual também pode contribuir para o metabolismo energético cerebral. A atividade da LDH foi determinada com o intuito de avaliar o papel desta enzima na toxicidade induzida pelo etanol na prole de ratas expostas

durante a gestação e lactação, salientando-se que a função principal envolve a conversão de piruvato a lactato. Os resultados mostraram que a exposição crônica ao etanol induz o aumento na atividade da LDH, o que pode estar relacionado com alterações no metabolismo energético do hipocampo e com a diminuição no influxo de glicose (figura 18).

Figura 18 - Efeito do etanol sobre a atividade da LDH em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação.



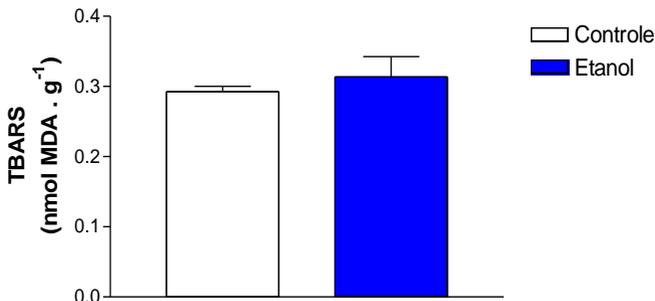
A atividade da LDH foi mensurada no homogeneizado de hipocampo dos animais controles e tratados com 21 dias de idade. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

Fonte: do autor

6.7. EFEITOS DO ETANOL EM HIPOCAMPO DE FILHOTES DE 21 DIAS EXPOSTOS NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO NA OXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS E PROTEÍNAS

Com o objetivo de investigar os efeitos do álcool em hipocampo de filhotes expostos a concentração elevadas de álcool na gestação e lactação sobre o estresse oxidativo, foram avaliados vários parâmetros bioquímicos tais como as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, a concentração de TBARS e o dano oxidativo a proteínas. Os resultados mostraram que a exposição ao etanol não altera as concentrações de TBARS no hipocampo de ratos expostos ao álcool (Figura 19).

Figura 19 - Efeito do etanol nas concentrações de TBARS em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol durante a gestação e lactação.

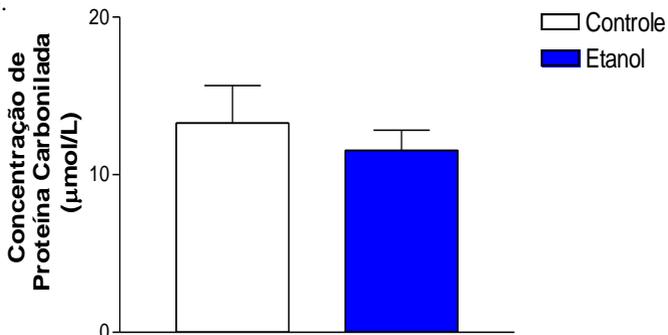


Fatias de hipocampo de animais controles e tratados foram homogeneizadas e incubadas com ácido tiobarbitúrico (TBA) durante 60 min. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. e determinadas através do teste “t” de Student.

Fonte: do autor

Corroborando os resultados observados na concentração de TBARS, a carbonilação de proteínas, um importante marcador de dano oxidativo nas proteínas e na oxidação dos grupos amino dos aminoácidos e grupos carbonilas, não foi alterada pela exposição materna ao etanol (Figura 20).

Figura 20 - Efeito do etanol na concentração de proteína carbonilada em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação.



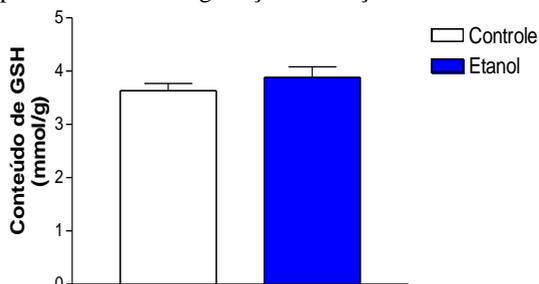
Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. em nmol. mg⁻¹ de proteína e determinadas através do teste “t” de Student.

Fonte: do autor

6.8. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL SOBRE AS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS E NÃO ENZIMÁTICAS EM HIPOCAMPO DE FILHOTES DE 21 DIAS DE IDADE

O conteúdo de GSH não foram alterados em hipocampo de animais com 21 dias de idade expostos ao álcool durante a gestação e lactação (Figura 21), enquanto a G6PD se mostrou diminuída, sendo que esta regenera o NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido), uma coenzima utilizada em reações anabólicas, favorecendo a criação de um ambiente redutor (Figura 22).

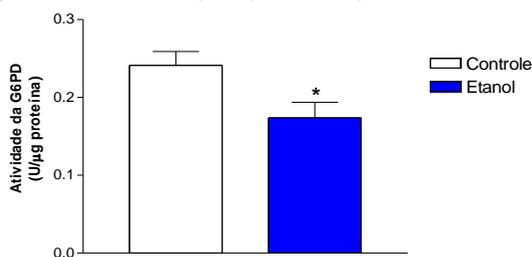
Figura 21 - Efeito do etanol no conteúdo de GSH em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação



Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Análise estatística: Teste “t” de Student.

Fonte: do autor

Figura 22 - Efeito do etanol na atividade da G6PD em hipocampos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação



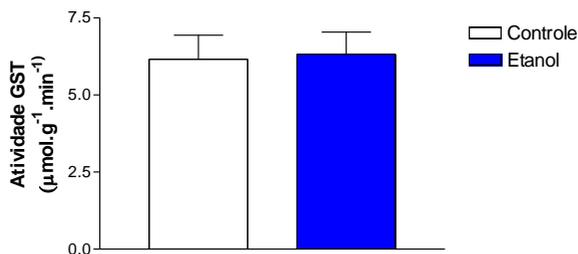
A atividade da G6PD foi determinada em modo cinético. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

Fonte: do autor

A atividade da GST, importante na detoxificação de xenobióticos através de sua conjugação com GSH, também não foi alterada pela exposição crônica ao etanol durante a gestação e lactação (Figura 23).

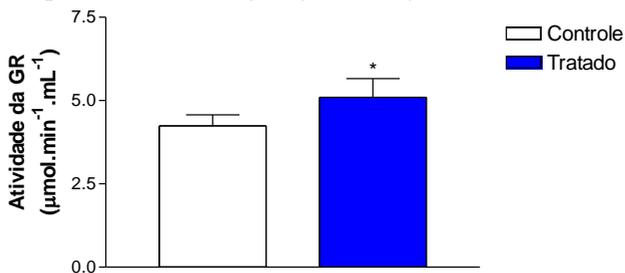
Considerando-se que o “turnover” da GSH é dependente da atividade da GPx e da GR, analisou-se o efeito da exposição ao etanol sobre a atividade destas enzimas. Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol induz aumento na atividade da GR no hipocampo dos filhotes de 21 dias de idade (Figura 24), corroborando a manutenção na concentração de GSH, como demonstrado na figura 21. Por outro lado, a exposição materna ao etanol não alterou a atividade da GPx em hipocampo de filhotes de 21 dias de idade (Figura 25).

Figura 23 - Efeito do etanol na atividade de GST em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação



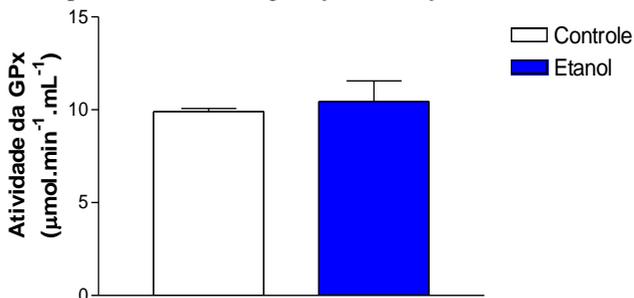
Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. Análise estatística: Teste “t” de Student. Fonte: do autor

Figura 24 - Efeito do etanol sobre na atividade de GR em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação



Fatias de hipocampus foram homogeneizadas e a atividade da GR foi avaliada através da reação que verifica a taxa de oxidação do NADPH. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. Análise estatística: Teste “t” de Student. *p<0,05 comparado com o grupo controle. Fonte: do autor

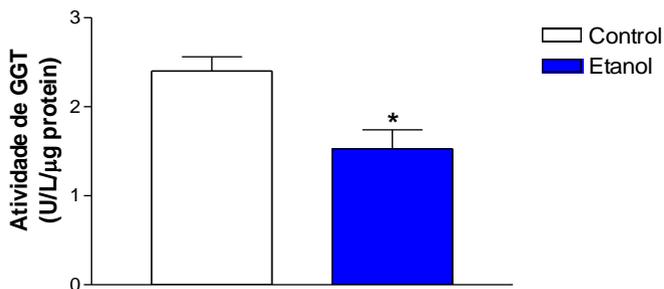
Figura 25 - Efeito do etanol na atividade de GPx em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação.



Fatias de hipocampus foram homogeneizadas e a atividade da GPx foi avaliada através da reação de velocidade de decomposição do NADPH, que é proporcional à velocidade da produção da GSSG. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Análise estatística: Teste “t” de Student. Fonte: do autor

Por fim, avaliou-se a atividade da GGT, que participa da reciclagem de aminoácidos da GSH no meio extracelular, e permitindo que esses aminoácidos sejam reintroduzidos para o meio intracelular participando da síntese de novo de GSH e regeneração da cisteína. A atividade desta enzima apresentou-se diminuída no hipocampo dos animais de 21 dias de idade expostos ao álcool durante a gestação e lactação (figura 26).

Figura 26 - Efeito do etanol na atividade de GGT em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação.

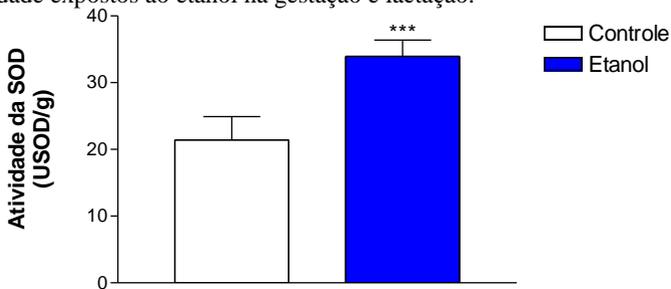


A atividade da GGT foi avaliada através da reação onde o substrato gama-glutamil-p-nitroanilida é transferido pela GGT para a molécula acceptora glicilglicina, com liberação de p-nitroanilina. Os resultados foram expressos

como média \pm E.P.M. Análise estatística foi realizada pelo Teste “t” de Student. * $p < 0,05$ considerado significativo comparado com o grupo controle
Fonte: do autor

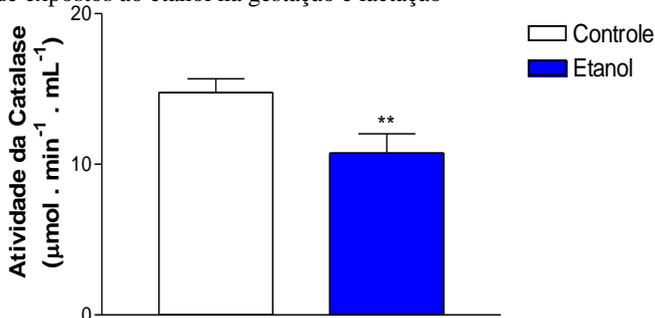
Corroborando as consequências do etanol sobre as defesas antioxidantes, os resultados também mostraram que a exposição materna ao álcool causa aumento na atividade da SOD (Figura 27) associado a diminuição na atividade da CAT (Figura 28).

Figura 27 - Efeito do etanol na atividade de SOD em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação.



Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle.
Fonte: do autor

Figura 28 - Efeito do etanol na atividade da CAT em hipocampus de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação



Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Análise estatística: Teste “t” de Student. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo controle.
Fonte: do autor

7. DISCUSSÃO

O etanol afeta severamente o cérebro durante o período de desenvolvimento da sinaptogênese, produzindo déficits neurocomportamentais, na aprendizagem e memória, resultados de lesões no hipocampo (BYRNES *et al.*, 2004). A exposição pré-natal ao etanol pode levar a SAF, que consistem em inúmeras perturbações no desenvolvimento do SNC caracterizadas por danos no crescimento e retardo mental (CARVAN *et al.*, 2004). Neste contexto, através deste estudo foram investigados os efeitos do etanol sobre o hipocampo de ratos imaturos, expostos durante a gestação e lactação, a este agente neurotóxico, o intuito foi investigar os mecanismos relacionados ao sistema glutamatérgico, ao metabolismo energético e ao estresse oxidativo. Mesmo o consumo leve de etanol (uma dose por semana) durante a gestação pode afetar negativamente o comportamento da criança. A exposição de ratas gestantes com uma dieta líquida contendo baixas concentrações de etanol (0,03 g/dl) já mostrou produzir déficits significativos de aprendizagem na prole (MAMELI E VALENZUELA, 2006).

No presente estudo não foram observadas alterações significativas na ingestão hídrica e de etanol durante a gestação e o aleitamento entre animais controles e tratados, demonstrando ser este um modelo eficaz de indução de SAF. Salienta-se ainda que o modelo utilizado não induz desidratação nos animais. Segundo Weinberg e Bezio (1984), a autoadministração do etanol em roedores em uma dieta líquida tem provado ser um modelo muito eficaz de indução de SAF. Alguns estudos mostraram que o álcool introduzido antes da gravidez, começando com uma dose baixa dissolvido numa solução de sacarose e ao longo dos dias aumentada gradualmente, mostra ser um método que ajuda os animais se adaptarem ao tratamento (ALLAN *et al.*, 2003; CHOI *et al.*, 2005). Esta técnica é vantajosa, pois reduz o estresse da manipulação potencial das técnicas mais invasivas, e é geralmente mais seguro, ou seja, resulta em menos mortes de animais. No entanto, esse método não permite o controle da dosagem precisa ou o tempo de consumo, apesar desta forma de administração ser usada durante a amamentação dos filhotes, a dose efetiva de etanol, que seria consumida pelos filhotes não podem ser devidamente controlada (GIL-MOHAPELA *et al.*, 2010).

A determinação da concentração de etanol nas soluções utilizadas em modelos animais teve por base o que ocorre com humanos,

considerando-se que a concentração de 10% ou menos está correlacionada com variadas cervejas, 15% mimetizaria bebidas fermentadas com alto teor alcoólico, e a de 20% assimilaria alguns vinhos e “caipirinhas” (SPANAGEL, 2000). Para o feto, o uso abusivo do álcool pode ocasionar a SAF completa que consiste de anormalidades em três áreas freqüentemente envolvidas: alterações da morfologia craniofacial; deficiências de crescimento intrauterino; e, disfunções do sistema nervoso central. Entretanto, outra forma de diagnosticar essa síndrome, já muito estudada, é a constatação de problemas no crescimento: pré-natal (afetam mais a estatura do que o peso) e deficiências no pós-natal (GENE, 1998).

O álcool contém aproximadamente 7,1 Kcal/g, não podendo ser visto como uma substância alimentícia já que não fornece nenhum nutriente necessário para o organismo. Em parte, como resultado deste fornecimento de calorías, os bebedores crônicos não sentem fome, o que pode facilmente conduzir a um déficit em proteínas, vitaminas, e microelementos. Por intermédio de modificações na estrutura e funcionamento do intestino, fígado e pâncreas, o álcool também perturba a digestão e absorção dos nutrientes, sendo que as maiores deficiências são em vitaminas e proteínas (DREOSTI, 1993). Já se sabe que a nutrição da mãe no período gestacional é fundamental para o bom desenvolvimento da prole (FERRARI *et al.*, 1992).

Lancaster e colaboradores (1987) afirmaram que freqüentemente mães alcoolistas não consomem uma dieta adequada de acordo com as demandas nutricionais do feto, complicando ainda mais os efeitos do etanol, que se somam aos déficits nutricionais. Neste sentido, foi demonstrado que ratos alimentados cronicamente com dieta líquida contendo etanol consumiram, não apenas menos calorías, mas também menos cálcio, cobre, ferro, manganês, fósforo e vitamina B6 do que o necessário para o desenvolvimento normal (RAO & LARKIN, 1985). Corroborando estes dados, no presente estudo observou-se uma diminuição na ingestão de nutrientes pelas ratas expostas ao etanol. Salienta-se que o modelo utilizado no presente estudo com a administração de etanol por via oral, já vem sendo descrito por reduzir o estresse sendo um meio menos invasivo do que os métodos de gavagem ou injeção intraperitoneal (LIEBER & DECARLI, 1989).

Em doses reduzidas e esporádicas, o álcool é considerado compatível com a amamentação, porém a Academia Americana de Pediatria (AAP) não fornece uma dose máxima segura. No entanto, a AAP considera o alcoolismo uma contra-indicação ao aleitamento

materno, uma vez que o álcool pode causar sonolência, sono profundo, atraso no crescimento e diminuição do ganho de peso (American Academy of Pediatrics -AAP, Committee on Drugs, 2001).

Neste trabalho foi demonstrada uma diminuição significativa no peso em filhotes de 21 dias de idade expostos ao etanol durante a gestação e aleitamento. Nas gestantes que consomem bebidas alcoólicas mais de duas vezes por semana o peso da criança ao nascer pode estar diminuído aproximadamente em 200 gramas. As alterações no padrão de crescimento podem ser variados e, em alguns indivíduos afetados estas só se manifestam na adolescência. As crianças podem ser pequenas para a idade gestacional e permanecerem abaixo da média ao longo da vida no que diz respeito ao peso, altura e perímetro cefálico (PALEY e O'CONNOR, 2009).

Com o intuito de verificar os danos do etanol ao cérebro da prole, mensuraram-se as concentrações de aldeídos no hipocampo dos animais controles e expostos ao etanol. Os resultados mostraram concentrações elevadas de aldeídos no hipocampo de ratos imaturos expostos ao etanol durante a gestação e amamentação. Pressupõe-se que o primeiro metabolito do etanol, o acetaldeído (AA) medeia diversos efeitos do etanol no cérebro, incluindo as ações comportamentais, neuroquímicas e neurotóxicas, e desempenha um papel crucial no desenvolvimento do alcoolismo (HUNT, 1996; SMITH *et al.*, 1997; DIETRICH, 2004; QUERTEMONT *et al.*, 2005).

Os AA provenientes do metabolismo periférico do etanol penetram com dificuldade a partir do sangue para o cérebro, por causa da barreira metabólica representada pela ALDH no endotélio capilar, e nos astrócitos (SIPPEL, 1974; WESTCOTT *et al.*, 1980; ZIMATKIN, 1991). Estudos mostram que sob condições normais do metabolismo do etanol, AA sistêmico não atravessa a barreira hemato-encefálica (ERIKSSON, 1977; LINDROS e HILLBOM, 1979; PETERSON e TABAKOFF, 1979; STOWELL *et al.*, 1980). Entretanto, quando as concentrações sistêmicas de AA excedem 100 mM, este penetra no SNC (TABAKOFF *et al.*, 1976). Neste contexto, para ocorrer a ação central do AA, este deve ser produzido dentro do cérebro. A enzima ADH não é expressa no cérebro (ZIMATKIN *et al.*, 2006; DIETRICH, 2011); no entanto, o AA pode ser gerado a partir de etanol por meio da ação da catalase, e em menor extensão pela CYP2E1, ambas presentes no cérebro (TAMPIER e MARDONES, 1979; ARAGON *et al.*, 1992.; ZIMATKIN *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* indicam que a catalase gera 60-70% de

acetaldéido no cérebro enquanto que CYP2E1 cerca de 20% (ZIMATKIN *et al.*, 2006).

Os níveis intracelulares de Ca^{2+} podem estar envolvidos em diversas funções celulares e serem regulados por vários mecanismos, incluindo a atividade de proteínas cinases, neurotransmissores, hormônios, nucleotídeos, fatores de crescimento e tóxicos. O influxo de íons cálcio para a célula desempenha importante função na liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica como também, na atividade de segundos mensageiros celulares. O etanol, em concentrações de 25 mM parece inibir a passagem de cálcio através dos canais iônicos, diminuindo a liberação de neurotransmissores (ZHANG *et al.*, 2000). Com deste estudo demonstrou-se que em filhotes expostos ao etanol durante a gestação e lactação ocorre uma diminuição do influxo de cálcio. Considerando-se a importância das correntes de Ca^{2+} para a neurotransmissão, o efeito do etanol sobre o influxo deste íon pode estar comprometendo a transmissão sináptica e, conseqüentemente, as funções neurais.

A diminuição no influxo de Ca^{2+} corrobora os resultados que demonstraram aumento na captação de glutamato no hipocampo dos filhotes expostos ao álcool, uma vez que este evento induz a diminuição na disponibilidade de glutamato na fenda sináptica, e conseqüentemente uma menor ativação de receptores glutamatérgicos. Os mecanismos precisos pelos quais o etanol altera os níveis de glutamato extracelular permanecem incertos, e podem envolver alterações induzidas por etanol tanto na captação quanto na liberação de glutamato, influenciando o ciclo glutamato-glutamina.

Os sistemas de captação rápida e eficiente de glutamato são realizados principalmente pelos astrócitos, através de transportadores de membrana de alta afinidade dependentes de Na^+ que contribuem para manter os níveis de glutamato extracelulares abaixo dos níveis tóxicos (TSUKADA *et al.*, 2005). Por outro lado, o transporte de cistina e glutamato, principalmente em neurônios, ocorre via trocadores cistina-glutamato independentes de Na^+ . Esses trocadores, representam um importante papel no transporte de cistina, com o intuito de fornecer concentrações adequadas de cisteína no interior das células para a síntese de glutatona. Neste sentido, os resultados do presente estudo demonstraram aumento no influxo de glutamato tanto dependente quanto independente de Na^+ . Salienta-se que o aumento na atividade do trocador glutamato-cistina pode representar uma maior disponibilidade

de aminoácidos para manter as concentrações do antioxidante GSH, que não foram alterados pelo modelo experimental (DANBOLT, 2001).

O efeito predominante do etanol é reduzir a neurotransmissão sináptica glutamatérgica (LOVINCER *et al.*, 1989; TSAI and COYLE, 1998). Dado o papel do glutamato como neurotransmissor excitatório dominante no cérebro, não é surpreendente que a inibição dos receptores NMDA mediada pelo etanol provoca diversos efeitos sobre outros sistemas de neurotransmissores (TSAI and COYLE, 1998). Estudos anteriores demonstram que a inibição crônica induzida por etanol conduz a uma regulação positiva de compensação de NMDAR em neurônios corticais (HOFFMAN, 1995). Além dos efeitos agudos do etanol sobre os neurônios fetais, outros estudos em animais indicam que os fetos expostos cronicamente ao etanol apresentam uma redução significativa dos receptores NMDA após o nascimento, mas não dos receptores AMPA/KA no hipocampo (BATTAGLIA, 1995; FARR, *et al.*, 1988; TSAI and COYLE, 1998).

Corroborando os achados do presente estudo, Smith (1997) mostrou que a exposição contínua ao etanol aumenta captação de glutamato em culturas de astrócitos e outros estudos de seu grupo mostraram que o aumento nas concentrações de glutamato extracelular no cérebro tem sido observado em alcoolistas e em ratos dependentes de álcool.

As alterações induzidas no sistema de glutamato podem ser parte de uma modificação geral da plasticidade sináptica levando a uma estabilização precoce das sinapses excitatórias e fortalecimento da neurotransmissão glutamatérgica (GALINDO *et al.*, 2005). Até o momento, os resultados referentes aos EAATs sugerem aumento da expressão de transportadores e da captação de glutamato induzidas por etanol (ZINK *et al.*, 2011).

Olney e colaboradores (2002) realizaram uma série de estudos que levaram à observação de que, durante o período da sinaptogênese, uma breve exposição ao etanol pode provocar neurodegeneração apoptótica generalizada no cérebro de mamíferos *in vivo*. Essa evidência indica que o etanol provoca a neurodegeneração apoptótica por um mecanismo duplo, o bloqueio dos receptores de glutamato e a ativação excessiva de receptores de GABA. Além disso, os astrócitos possuem a enzima específica GS que catalisa a reação de amidação do glutamato para formar glutamina. A captação de glutamato astroglial e a atividade de GS são respectivamente, responsáveis pela remoção do glutamato na

fenda sináptica e fornecimento de glutamina para os neurônios (HERTZ *et al.*, 1999).

Sickmann e colaboradores (2014), em suas pesquisas em animais adultos expostos ao etanol durante a gestação, mostraram uma diferença entre machos e fêmeas em relação à GS, mostrando aumento da expressão desta enzima em fêmeas, mas não em machos. Neste contexto, Thoma e colaboradores (2011) relataram aumento dos níveis de glutamina no cérebro de pacientes com transtorno no uso de álcool através de espectroscopia de ressonância magnética, o que se correlacionou positivamente com a gravidade do abuso de álcool.

O glutamato presente nos astrócitos é convertido em glutamina pela GS, antes de retornar para o neurônio pré-sináptico para ser convertido novamente em glutamato (THOMA *et al.*, 2011). Os resultados deste estudo mostraram diminuição na atividade da GS no hipocampo da prole exposta ao etanol durante a gestação e o aleitamento, indicando uma deficiência na conversão de glutamato a glutamina, conseqüentemente, aumentando os níveis do neurotransmissor. Salienta-se que a glutamina é considerada uma maneira não tóxica de transporte do glutamato.

O ciclo glutamato-glutamina não é estritamente estequiométrico, uma vez que há outras vias para geração de glutamato, tanto nos astrócitos quanto nos neurônios, que não estão diretamente envolvidas na neurotransmissão. Entre estas vias inclui-se a entrada do glutamato no ciclo de TCA, via reações de desaminação oxidativa ou transaminação, ocorrendo à formação de energia (MCKENNA, 2007). De acordo com Jiang e colaboradores (2013), observa-se um aumento da proporção do ciclo glutamato-glutamina em relação à taxa do ciclo TCA neuronal em bebedores de altas concentrações de álcool.

No presente estudo observou-se um aumento na atividade da AST, sem alterar a atividade da ALT no hipocampo de ratos expostos ao etanol durante a gestação e aleitamento. Segundo Zigmond e colaboradores (1999), mudanças na atividade de enzimas que convertem α -KG em glutamato ou succinil-CoA podem afetar a eficácia do ciclo de TCA ou os níveis de glutamato intracelulares. As enzimas ALT e AST estão presentes tanto no citosol quanto na mitocôndria, sendo que a ALT está envolvida na síntese do neurotransmissor glutamato em neurônios glutamatérgicos. Sendo assim, a modulação na atividade das aminotransferases após exposição ao etanol pode afetar a disponibilidade de glutamato nas células neurais. Contudo, as células

cerebrais derivam cerca 90% das suas necessidades de energia do metabolismo da glicose (HANDA *et al.*, 2000; MUNEEER *et al.*, 2011).

Uma vez dentro dos astrócitos a glicose pode seguir várias rotas metabólicas, inclusive entrar no ciclo de TCA como acetil-CoA via piruvato desidrogenase. Quando disponibilizado o α -KG como intermediário do ciclo de TCA, este pode dar origem ao glutamato por ação da glutamato desidrogenase, ou através de reações de transaminação. Singh e colaboradores (2006) relatam que a exposição aguda ao etanol reduz significativamente a absorção e utilização de glicose em cultura de astrócitos fetais de rato. Neste contexto, neste estudo também se observou inibição da captação de glicose, que pode estar relacionada com a redução da expressão dos transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT3) em astrócitos e neurônios. O efeito inibitório do álcool sobre a captação de glicose e o transporte pelas células endoteliais do cérebro provoca a disfunção da BHE e degeneração neuronal (MUNEEER *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que em fatias de cérebro de roedores, a inibição do transporte de lactato e da glicólise durante a exposição ao glutamato causou uma perda permanente da função neuronal, enquanto que a adição de lactato mantém a atividade sináptica na ausência de glicose prevenindo a neurotoxicidade (SCHURR *et al.*, 1997, CHIH e JUNIOR, 2003). O metabolismo do lactato é dependente da atividade da LDH, que converte piruvato reversivelmente em lactato com a oxidação de NADH a NAD^+ (TSACOPOULOS e MAGISTRETTI, 1996). O consumo de lactato é favorecido por LDH1 neuronal, que promove a conversão de lactato em piruvato. Em contraste, existe evidência de que os astrócitos favorecem a produção de lactato (CHIH e JUNIOR, 2003).

O lactato é transportado via transportadores de monocarboxilatos (MCT). Os MCT são transportadores que fazem o co-transporte de lactato com íons H^+ , o que sugere o transporte de lactato é impulsionado pelo pH (SCHNEIDER *et al.*, 1993; BARROS e DEITMER, 2010; STOBART e ANDERSON, 2013). No presente estudo observou-se aumento na atividade da LDH, podendo esta ser uma via compensatória do metabolismo energético devido ao baixo influxo de glicose. Neste sentido, sugere-se que a atividade aumentada desta enzima esteja favorecendo a formação de lactato nos astrócitos e de piruvato nos neurônios. Estudos demonstram que o cérebro pode utilizar o lactato durante a hipoglicemia ou em situações nas quais as concentrações plasmáticas de lactato estão elevadas (IDE *et al.*, 2000; CHIH e JUNIOR, 2003).

De acordo com Pellerin (1998a), o lactato é produzido de forma dependente da atividade glutamatérgica nos astrócitos e então transferido e utilizado pelos neurónios. Magistretti e colaboradores (1999) sugerem que a glicose é utilizada predominantemente, se não exclusivamente, por astrócitos e que os neurónios utilizam o lactato liberado pelos astrócitos como seu substrato primário durante a atividade sináptica. Em 2006, Magistretti revisou e propôs novamente que os astrócitos fornecem lactato como substrato energético para os neurónios, especialmente durante períodos de aumento da atividade sináptica. No entanto, o lactato é usado apenas quando a taxa de glicose permanece baixa (STOBART e ANDERSON, 2013).

Os danos causados pelo etanol podem resultar em efeitos diretos sobre diferentes tecidos, ou efeitos indiretos, mediados pela presença de metabólitos tóxicos, responsáveis pelo estímulo da produção de EROS e diminuição das defesas antioxidantes (TURCATEL *et al.*, 2012). Atualmente, sabe-se que os danos provocados pela ingestão excessiva de bebidas contendo etanol estão associados, ao menos em parte, com o estresse oxidativo decorrente da produção de espécies reativas durante o metabolismo do etanol, o que acaba alterando a homeostase redox e causando alterações nas estruturas e funções celulares (PUSHPAKIRAN *et al.*, 2004).

O cérebro é o órgão mais suscetível à geração de ROS durante a fosforilação oxidativa, devido a sua elevada taxa metabólica utilizando cerca de 20% de todo o oxigênio consumido pelo organismo (SOKOLOFF, 1999). O cérebro em desenvolvimento, que tem apenas uma fração da atividade de enzimas antioxidantes do cérebro adulto, é certamente mais vulnerável aos efeitos neurotóxicos de estresse oxidativo (BERGAMINI *et al.*, 2004).

No cérebro, a exposição ao etanol pode induzir estresse devido a um desequilíbrio entre a geração de EROS (radicais superóxido e hidroxil entre outros) e as defesas antioxidantes celulares (AKYOL *et al.*, 2004; HALLIWELL, 2006). Boveris e colaboradores (1983) demonstraram que o estresse oxidativo pode estar diretamente relacionado com a toxicidade induzida pelo etanol, em que se evidenciou uma relação significativa entre o consumo excessivo de etanol, a diminuição de defesas antioxidantes e, conseqüentemente, o aumento na peroxidação dos lipídeos hepáticos.

Além de interferir sobre sistemas neurotransmissores, estudos mostram que o álcool também promove alterações na função do neurônio após dano lipídico e proteico. Esse dano tem sido atribuído à

formação de EROS em tal proporção que supera as defesas antioxidantes (DAS e VASUDEVAN, 2007). O acetaldeído, intermediário do metabolismo do etanol, é capaz de produzir EROS (ABEL e HANNIGAN, 1995). Já foi demonstrado que o etanol induz a síntese de citocromo P450 (CYP2E1) no cérebro. CYP2E1 está presente em várias regiões do cérebro, e pode ser uma importante fonte de estresse oxidativo induzido pelo etanol (SOKOLOFF, 1999). Também foi visto um aumento da proporção NADH/NAD⁺, o que provoca a redução do ferro férrico para ferroso, um gerador potente do radical hidroxila, o qual pode fazer com que ocorra a peroxidação lipídica. (MONTOLIU *et al.*, 1994). Além disso, o cérebro contém relativamente altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados que podem ser prontamente peroxidados. A peroxidação lipídica causa lesão celular e de membranas e pode levar à destruição das células e, conseqüentemente, a morte celular (HALLIWELL, 2006).

Patten e colaboradores (2012) mostraram em seus estudos que as concentrações de peróxidos lipídicos e a carbonilação de proteínas foram aumentadas em ratos de 90 dias expostos ao etanol. Em outro estudo, foi evidenciado um aumento nos marcadores de peroxidação de lípidos no hipocampo, estriado, hipotálamo, cerebelo e córtex cerebral em ratos de 12 semanas que foram expostos ao etanol durante a gestação e a lactação, com uma dieta líquida contendo 6% de etanol (PETKOV *et al.*, 1992). Já Scolaro e colaboradores (2012) salientaram que o etanol, tanto com exposição aguda quanto crônica, provocou estresse oxidativo, demonstrado pelas concentrações elevadas de TBARS no hipocampo e no plasma de ratos.

No presente estudo foram obtidos resultados inesperados comparados com os da literatura. Filhotes de 21 dias de idade expostos ao etanol durante a gestação e lactação não apresentaram alterações nas concentrações de TBARS e na carbonilação de proteínas do tecido hipocampal, deduzindo-se que não houve dano lipídico e nem proteico, respectivamente. Por outro lado, Smith (2005) também mostrou em hipocampos de ratos imaturos que não houve alteração nas concentrações de MDA, bem como em outras regiões do cérebro. Os dados sugerem que a peroxidação lipídica pode estar envolvida na toxicidade do etanol dependendo da idade em que os animais são expostos e da região do cérebro estudada.

As EROS são produtos do metabolismo normal do oxigênio e os organismos aeróbios desenvolveram defesas para o controle do estresse oxidativo gerado por estas espécies reativas. Estas defesas são

constituídas por antioxidantes enzimáticos, como a SOD, CAT e a GPx e não enzimáticos, como a glutationa (GSH) e as vitaminas A, C e E (HALLIWELL, 2006). Os neurônios são especialmente vulneráveis aos efeitos nocivos das espécies reativas devido a alta taxa metabólica, estando associada à concentração elevada de ácidos graxos e metais de transição, vulneráveis à peroxidação e formação de radicais hidroxil (REYNOLDS *et al.*, 2007). O uso agudo de etanol já mostrou aumentar a produção de EROS no cérebro de ratos ou em células cultivadas do hipocampo de roedores (AGAR *et al.*, 2003). Alguns autores sugerem que o uso crônico de álcool também aumenta a produção de EROS, e que isso se deve em parte pela indução da enzima CYP2E1. Esta enzima, expressa tanto no fígado quanto no cérebro, é responsável pela metabolização do álcool e produção de metabólitos citotóxicos, como O_2^- e H_2O_2 nesses tecidos (NORDMANN *et al.*, 1990).

Além de promover a formação de EROS, a exposição ao álcool reduz em 25% a atividade antioxidante da SOD em homogeneizados de cérebro de ratos. A exposição, *in vitro*, ao etanol diminui também atividade da SOD em neurônios ou células gliais de roedores e aves (TURCATEL *et al.*, 2012). Em eritrócitos de ratos expostos ao etanol, observou-se um aumento na atividade da SOD, mas uma diminuição da atividade da CAT e da GPx (SCOLARO, *et al.*, 2012).

Patten e colaboradores (2012) mostraram que em ratos de 7 e 90 dias de idade, a exposição pré-natal ao etanol foi associada com diminuição da concentração de GSH e aumento da expressão de SOD no hipocampo. Corroborando estes dados, neste estudo demonstrou-se aumento na atividade da SOD, sendo eficaz na detoxificação de radicais superóxido, tendo como consequência uma maior produção de H_2O_2 .

Além da SOD, também já foi demonstrado em alguns estudos que a intoxicação pelo etanol está associada a mudanças na atividade da CAT, dependendo da região cerebral e do tipo de tratamento com o álcool. Segundo Somani e colaboradores (1996), enquanto o tratamento crônico com etanol reduz a expressão da CAT no cerebelo e córtex, o tratamento agudo aumenta a expressão desta enzima na medula espinhal e no estriado. Outro estudo mostrou que a administração aguda de etanol significativamente diminui a atividade da CAT no hipocampo. (SCOLARO, *et al.*, 2012). Curiosamente, a redução da atividade da CAT, nestes casos, parece não estar associada a uma diminuição na quantidade da enzima e sim a uma mudança estrutural (SHAFFER *et al.*, 1990). No presente estudo também demonstrou-se que a exposição crônica ao etanol durante a gestação e o aleitamento induz a diminuição

na atividade da CAT. Entretanto, os mecanismos envolvidos neste processo ainda não são conhecidos.

O estriado e hipotálamo são importantes regiões controladoras das funções motoras e o uso agudo de álcool provoca um aumento da atividade de GPx em ratos expostos a este agente. Esses estudos demonstram que pode haver uma relação entre comportamento e estresse oxidativo, embora essa relação ainda não seja compreendida (SOMANI *et al.*, 1996; HARKANY *et al.*, 1997). Compostos tiólicos, como a glutatona, têm demonstrado uma boa capacidade de neutralizar radicais livres gerados pelo metabolismo do etanol, fato que leva à sua oxidação (GONZALES *et al.*, 1988). O sistema de GSH é fundamental para a defesa celular. A GSH reage diretamente com radicais em reações não enzimáticas, além de ser um doador de elétrons para a redução de peróxidos, que é catalisada pela GPx (WINTERBOURN e METODIEWA, 1994). Exposição de roedores ao etanol durante os primeiros dias de vida pós-natal, que são equivalentes para o terceiro trimestre de gestação nos seres humanos, demonstraram alterar o concentração de GSH, aumentando a concentração de peróxidos lipídicos e na carbonilação de proteínas em várias regiões do cérebro (DEMBELE *et al.*, 2006).

Resultados similares ao presente estudo foram demonstrados por Sommavilla (2012), em que a exposição ao etanol não alterou as concentrações de GSH, bem como a atividade da GPx no hipocampo de ratos jovens. Por outro lado, foram observadas alterações nestes parâmetros em outras regiões do cérebro. Os dados sugerem que os efeitos tóxicos do etanol são dependentes da idade na qual o animal foi exposto e da região cerebral analisada.

As GPx consistem em um grupo de enzimas antioxidantes mais importantes do cérebro que metabolizam os peróxidos, tais como H_2O_2 , protegendo as membranas celulares da peroxidação lipídica. Estudos já indicaram que a atividade da GPx inibe a peroxidação lipídica, impedindo o ataque dos radicais livres sobre os lipídeos poliinsaturados da membrana. Neste sentido, parece que o etanol poderia diminuir a atividade GPx resultando na peroxidação lipídica. (MCCRAY *et al.*, 1976; RAMEZANI *et al.*, 2012) No entanto, isto pode ser devido ao aumento da degradação da GSH através do ciclo da γ -glutamil, em vez de aumentar a oxidação da glutatona (BONDY *et al.*, 1992). No presente estudo foi demonstrando que a exposição ao etanol durante a gestação e lactação não altera a atividade de GPx, mas diminui a atividade da GGT no hipocampo dos filhotes.

A GST, que catalisa a conjugação da GSH com compostos xenobióticos transformando-os em produtos menos tóxicos e mais hidrofílicos os quais podem ser parcialmente metabolizados, tem sido implicada na detoxificação de aldeídos endógenos (SIDEELL *et al.*, 2003). Patten e colaboradores (2012) demonstraram que as atividades da GPx, da GST e da GR não são alteradas pela exposição ao etanol. No entanto, no presente estudo demonstrou-se o aumento na atividade da GR em hipocampo de ratos imaturos expostos ao etanol durante a gestação e aleitamento. A GR é responsável pela redução da glutatona oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH) às custas de NADPH, o qual é disponibilizado pela G6PD, o que garante que a GSH esteja na maior parte em sua forma reduzida, que é essencial para sua ação redutora sobre outras moléculas biológicas. O aumento na atividade da GR pode ser um dos fatores responsáveis pela manutenção da concentração de GSH no hipocampo dos animais expostos ao etanol. No entanto, a diminuição na atividade da G6PD induz uma diminuída disponibilidade de NADPH, importante para a atividade da GR. Sugere-se que vias alternativas estejam gerando NADPH, com o intuito de manter a atividade da GR.

É importante destacar que a atividade embrionária da maioria das enzimas antioxidantes é menor do que 5% da atividade materna (WELLS *et al.*, 1997). A administração de etanol para ratas grávidas perturba a embriogênese e esse efeito adverso é mais pronunciado na prole, com baixa capacidade antioxidante (WENTZEL e ERIKSSON, 2006). A maioria das evidências para um papel do estresse oxidativo na SAF é indireta, já que apenas alguns poucos estudos analisaram a produção de EROS em animais expostos ao etanol durante o período perinatal (; HEATON *et al.*, 2002; KANE *et al.*, 2008; DONG *et al.*, 2010). Segundo Heaton e colaboradores (2003c), quando os ratos viveram até PND 21 (após serem expostos ao etanol no PND7), não ocorreram diferenças na produção de EROS entre animais controle e os que foram expostos ao etanol. Em apoio a estes resultados, demonstrou-se que a exposição aguda de etanol em filhotes de ratos no PND 4 aumenta a produção de EROS no cerebelo, que pode estar associada com uma perda de células de Purkinje e células granulares, o que é comumente observado em animais expostos ao etanol durante este período pós-natal precoce (HEATON *et al.*, 2002). Já o pico da vulnerabilidade dos neurônios do cerebelo aos efeitos teratogênicos do etanol foi demonstrado entre PND 3 e PND 7, tanto em camundongos e ratos (DIKRANIAN *et al.*, 2005).

Já tem sido estudado que a exposição neonatal ao álcool reduz o número de células do cerebelo. Enquanto o álcool induz a perda de células piramidais da região CA1 do hipocampo, este não parece afetar as células granulares do giro denteado ou as células piramidais da região hipocampal CA3, quando administrado ao neonato. Além disso, os neurônios da camada V e células gliais no córtex são menos suscetíveis à perda de células induzida pelo álcool após a exposição neonatal durante o período correspondente ao crescimento do cérebro. Estes resultados de contagem de células podem explicar, pelo menos parcialmente, porque o álcool altera significativamente as concentrações de GSH e de MDA no cerebelo, uma região com múltiplas populações de células que são sensíveis ao tratamento com o álcool. Por outro lado, as grandes populações de células do hipocampo e do córtex, tal como as células granulares do giro dentado e as células piramidais da região cortical da camada V, são menos sensíveis à exposição ao álcool. Esta sensibilidade reduzida a exposição ao álcool durante o surto de crescimento do cérebro pode ser explicada, pelo menos em parte, pela falta de efeito do tratamento álcool significativo nas concentrações de MDA ou GSH (SOMMAVILLA *et al.*, 2012).

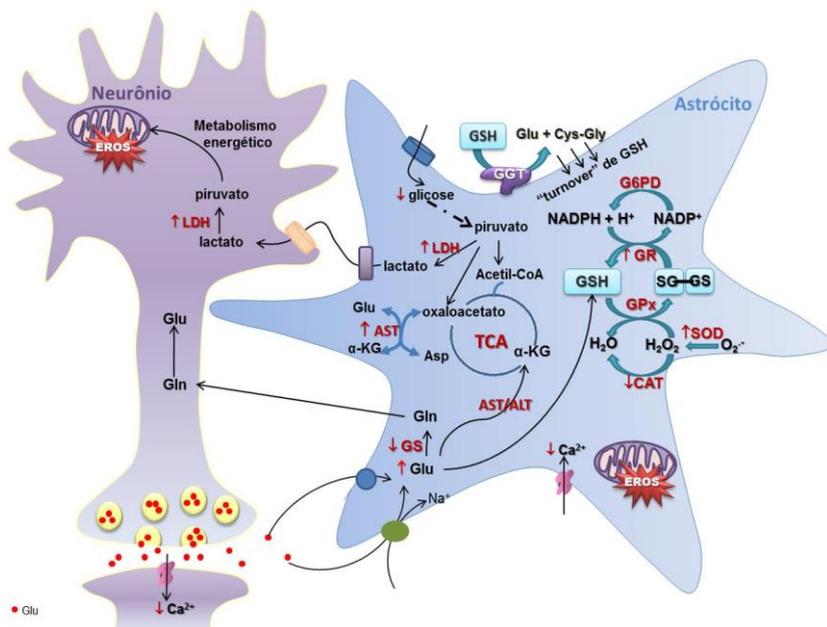
Adicionalmente o papel do estresse oxidativo induzido pelo álcool na neurotoxicidade é apoiado por estudos que mostram efeitos benéficos da terapia antioxidante durante a exposição ao álcool.

7.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição crônica ao etanol durante a gestação e o aleitamento induz a SAF, caracterizada por alterações morfológicas e neurológicas importantes. Neste estudo demonstrou-se que os efeitos do etanol sobre o hipocampo de ratos imaturos expostos a este neurotóxico durante a gestação e aleitamento, envolvem o aumento do influxo astrocitário de glutamato, com conseqüente diminuição no influxo de Ca^{2+} via receptores do tipo NMDA, o que pode resultar em comprometimentos nos processos de aprendizagem e memória, classicamente modulados via sistema glutamatérgico. Uma vez nos astrócitos, o glutamato pode seguir diversas rotas. Nos animais expostos ao etanol observa-se uma diminuição na atividade da GS, indicando um comprometimento do ciclo glutamato-glutamina, bem como aumento na atividade da AST, que pode estar convertendo glutamato em α -KG e conseqüentemente levando a uma maior utilização deste neurotransmissor no metabolismo energético celular. A exposição materna ao etanol também levou a

diminuição no influxo de glicose pelas células neurais, o que corrobora a maior necessidade energética e utilização do esqueleto carbonado do glutamato no ciclo dos TCA. Além disso, observa-se que a exposição ao etanol induz aumento compensatório na atividade da LDH para gerar lactato nos astrócitos, que será secretado e captado pelos neurônios, onde será utilizado no metabolismo energético. As alterações no sistema glutamatérgico e no metabolismo energético estão associadas à indução de estresse oxidativo com alteração na atividade das enzimas antioxidantes e consequente dano oxidativo, conforme representado esquematicamente na figura 29.

Figura 29 - Mecanismo de toxicidade do etanol no hipocampo da prole após exposição materna durante os períodos gestacional e lactacional.



Fonte: do autor

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo conclui-se que a exposição materna ao etanol durante os períodos de gestação e aleitamento induz diversas alterações neuroquímicas no hipocampo da prole, que estão associadas a diminuição da transmissão glutamatérgica, déficit energético e estresse oxidativo. Propõe-se que estas alterações neuroquímicas possam estar associadas à fisiopatologia da SAF. Novos experimentos são necessários para esclarecer o envolvimento dessas alterações no comprometimento neurológico característico da SAF.

A indução de modificações no metabolismo energético e na neurotransmissão no hipocampo pela exposição ao etanol, sugere que esta substância como uma importante neurotoxina que compromete os processos de aprendizado e memória.

9. PERSPECTIVAS

A SAF é a principal causa de retardo mental nos países desenvolvidos. Cerca de 1 em cada 100 nascidos vivos apresentam algum espectro da doença em diversos países. Salienta-se que esta é uma doença prevenível apenas com abstinência alcoólica durante a gestação. Considerando-se a alta incidência da SAF, que acarreta em comprometimento neurológico severo, é de fundamental importância o entendimento dos mecanismos neuroquímicos envolvidos na fisiopatologia desta doença que poderão servir, futuramente, como alvos para intervenções terapêuticas ou preventivas dos danos causados pelo etanol aos fetos e recém-nascidos.

Dando continuidade a este estudo pretende-se melhor entender as alterações induzidas pelo etanol sobre o SNC investigando-se os seguintes parâmetros:

- ✓ expressão da proteína Nrf2 em hipocampo de ratos imaturos, com o intuito de confirmar o envolvimento desta via na resposta ao estresse oxidativo gerado pelo etanol;
- ✓ expressão de transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT-1, bem como do trocador cistina-glutamato;
- ✓ expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da glutatona: gama-glutamilcisteína sintetase e glutatona sintetase;
- ✓ atividade de enzimas do ciclo de Krebs e da via glicolítica em células hipocampais de ratos, com o intuito de comprovar alterações no metabolismo energético;

Além disso, pretende-se implementar modelos de exposição *in vitro* ao etanol, com o intuito de caracterizar o mecanismo de toxicidade desta substância em canais iônicos, proteínas cinases e fosfatases.

10. REFERÊNCIAS

- ABEL, E.L. Fetal alcohol syndrome: fetal alcohol effects. **Plenum Press: New York**, 1989.
- ABEL, E.L.; HANNIGAN, J.H. Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: Provocative and permissive influences. **Neurotoxicol Teratol.**, v. 17, p. 445–462, 1995.
- ABEL, E. L.; KRUGER, M.L.; DRIEDL, J. How do physicians define “light,” “moderate,” and “heavy” drinking? **Alcohol Clin. Exp. Res.** 22:979-98, 1998.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 204, p. 234–254, 1984.
- AGAR, E.; DEMIR, S.; AMANVERMEZ, R.; BOSNAK, M.; AYYILDIZ, M.; CELIK, C. The effects of ethanol consumption on the lipid peroxidation and glutathione levels in the right and left brains of rats. **Int. J. Neurosci.**, v. 113, p. 1643-52, 2003.
- AKYOL, Z.; BARTOS, J.A.; MERRILL, M.A.; FAGA, L.A.; JAREN, O.R.; SHEA, M.A.; HELL, J.W. Apo-calmodulin binds with its C-terminal domain to the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 C0 region. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 2166–2175, 2004.
- ALLAN, A.M.; CHYNOWETH, J.; TYLER, L.A.; CALDWELL, K.K. A mouse model of prenatal ethanol exposure using a voluntary drinking paradigm. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 27, p. 2009–2016, 2003.
- ALLEBECK, P.; OLSEN, J. Alcohol and fetal damage. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 22, p. 329S–332S, 1998.
- AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience.**, v. 31, p. 571–591, 1989.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS (AAP), COMMITTEE ON DRUGS. The transfer of drugs and other chemicals into human milk. **Pediatrics.**, v. 108, p. 776-89, 2001.

ARAGON, C.M.; ROGAN, F.; AMIT, Z. Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H₂O₂ system. **Biochem. Pharmacol.**, v. 44, p. 93–98, 1992.

ARMANO, S.; COCO, S.; BACCI, A.; PRAVETTONI, E.; SCHENK, U.; VERDERIO, C.; VAROQUIS, H.; ERICKSON, J.D.; MATTEOLI, M. Localization and Functional Relevance of System A Neutral Amino Acid Transporters in Cultured Hippocampal Neurons. **J BiolChem.**, v. 277, p. 10467-10472, 2002.

ATTWELL, D.; LAUGHLIN, S. B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, p. 1133–1145, 2001.

BACHELARD, G. A psicanálise do fogo. **São Paulo: Martins Fontes.**, 1999.

BAK, L., SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry.*, v. 98, p. 641–653, 2006.

BARBER, A.D.; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Amer. Pharm.**, v. 34, n. 9, p. 26-35, 1994.

BARROS, L.F., DEITMER, J.W. Glucose and lactate supply to the synapse. **Brain Res. Rev.**, v. 63, p. 149–159, 2010.

BATTAGLIA, F.C. Fetal Alcohol Syndrome. **Washington, DC: Natl. Acad.**, p. 17- 213, 1995.

BEART, P.M.; O'SHEA, R.D. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. **Br. J. Pharmacol.**, v. 150, n. 1, p. 5–17, 2006.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v. 47, p. 233-261, 1996.

BERGAMINI, C.M.; GAMBETTI, S.; DONDI, A.; CERVELLATI, C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Curr. Pharm. Des.**, v. 10, p. 1611–1626, 2004

BERGLES, D.E.; DIAMOND, J.S.; JAHR, C.E. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 9, p. 293–298, 2000.

BERL, S.; CLARKE, D. D. The metabolic compartmentation concept. Glutamine, Glutamate and GABA in The Central Nervous System. **New York: Alan R. Liss, Inc.**, p. 205-217, 1983.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 61, p. 882-90, 1963.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 90, n. 1, p. 105–10, 1984.

BOFF, L. Saber cuidar: ética do humano – compaixão pela terra. **Petrópolis-RJ: Vozes.**, 11st ed, 2004.

BONDY, S.C. Ethanol toxicity and oxidative stress. **Toxicology Letters.**, v. 63, p. 231-241, 1992.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCK, L.; MASSARO, D. Oxygen, Gene Expression and Cellular. **Marcel Dekker: New York.**, v. 105, p. 1- 25, 1997

BOVERIS, A.; CADENAS, E. CLERCK, L.; MASSARO, D Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: **Oxygen, Gene Expression and Cellular.**, v. 105, p. 1-25, 1997.

BOVERIS, A.F.; FRAGA, C.G.; VARSARSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increases chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, v. 277, p. 534-541, 1983.

BRAITENBERG, V.; SCHÜZ, A. *Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity*. Berlin, Springer. 2nd ed, 1998.

BURD, L. Fetal alcohol spectrum disorders. **São Paulo: Conference at the 1st ABRA- MD Congress, 2008.**

BURD, L.; ROBERTS, D.; OLSON, M.; ODENDAAL, H. Ethanol and the placenta: a review. **J. Mat-Fetal Neon. Med.**, v. 20, n. 5, p. 361-7, 2007.

BYRNES, M.L.; RICHARDSON, D.P.; BRIEN, J.F.; REYNOLDS, J.N.; DRINGENBERG, H.C. Spatial acquisition in the Morris water maze and hippocampal long-term potentiation in the adult guinea pig following brain growth spurt prenatal ethanol exposure. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 26, p. 543–551, 2004.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, pro-oxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology.**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CARVAN, M.J.; LOUCKS, E.; WEBER, D.N.; WILLIAMS, F.E. Ethanol effects on the developing zebrafish: neuro behavior and skeletal morphogenesis. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 26, p. 757–768, 2004.

CHANG, G.; GOETZ, M.A.; WILKINS-HAUG, L.; BERMAN, S. A brief intervention for prenatal alcohol use: an in-depth look. **J. Subst. Abuse Treat.**, v. 18, p. 365–9, 2000.

CHAUDHURI, J. Alcohol and the developing foetus- a review. **Med. Sci. Monit.**, v. 6, p. 1031–41, 2000.

CHIH, C.; JUNIOR, E.L.R. Energy Substrates for Neurons During Neural Activity: A Critical Review of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Hypothesis. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.**, v. 23, p. 1263–1281, 2003.

CHIO, K.S.; TAPPEL, A.L. *Biochemistry* (Wash.), v. 8, p. 2821, 1969. In: SNEL, K.; MULLOCK, B. *Biochemical toxicology a practical approach*. **IRL Press Limited.**, 1987.

CHOI, I.Y.; ALLAN, A.M.; CUNNINGHAM, L.A. Moderate fetal alcohol exposure impairs the neurogenic response to an enriched environment in adult mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 29, p. 2053–2062, 2005.

CHUDLEY, A.E.; CONRY, J.; COOK, J.L.; LOOCK, C.; ROSALES, T.; LEBLANC, N. Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. **CMAJ.**, v. 172, n. 5, p. 1S-21, 2005.

CLARKE, M.E.; GIBBARD, W.B. Overview of Fetal Alcohol Spectrum Disorders for Mental Health Professionals. **The Canadian Child and Adolescent Psychiatry Review.**, v. 12, n. 3, p. 57-63, 2003.

CLOUD, S.J.; BAKER, K.M.; DEBERSIO, S.R.; DECOSTER, E.C.; LORENZ, R.R. Alcohol consumption among Oklahoma women: before and during pregnancy. The PRAMS working group. Pregnancy risk assessment monitoring system. **J. Okla State Med. Assoc.**, v. 90, p. 10–7, 1997.

COLES, C. Impact of prenatal alcohol exposure on the newborn and the child. **Clin. Obstet. Gynaecol.**, v. 36, p. 255–66, 1993.

CONN, P.J. Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1003, p. 12–21, 2003.

CONNOR, P.D.; SAMPSON, P.D. BOOKSTEIN, F.L. Direct and indirect effects of prenatal alcohol damage on executive function. **Dev. Neuropsychol.**, v. 18, p. 331-354, 2000.

COOK, J.D. Biochemical markers of alcohol use in pregnant women. **Clinical Biochemistry.**, v. 36, p. 9–19, 2003.

COSTA, A.P.; TRAMONTINA, A.C.; BIASIBETTI, R.; BATASSINI, C.; LOPES, M. W.; WARTCHOW, K.M.; BERNARDI, C. TORTORELLI, L.S.; LEAL, R.B.; GONÇALVES, C.A. Neuroglial

alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. **Behav. Brain Res.**, v. 226, p. 420-427, 2012

COULTER, D.A.; EID, T.A. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. **Glia.**, v. 60, n. 8, p. 1215-26, 2012.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology.**, v. 65, p. 1-105, 2001.

DAS, S.K.; VASUDEVAN, D.M. Alcohol-induced oxidative stress. **Life Sciences.**, v. 81, p. 177-87, 2007.

DEITRICH, R. Ethanol as a Prodrug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects – a commentary. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 35, p. 581-583, 2011.

DEMBELE, K.; YAO, X.H.; CHEN, L.; NYOMBA, B.L. Intrauterine ethanol exposure results in hypothalamic oxidative stress and neuroendocrine alterations in adult rat offspring. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 291, p. 796-802, 2006.

DIKRANIAN, K.; QIN, Y.Q.; LABRUYERE, J.; NEMMERS, B.; OLNEY, J.W. Ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 155, p. 1-13, 2005.

DONG, J.; SULIK, K.K.; CHEN, S.Y. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. **Toxicol. Lett.**, v. 193, p. 94-100, 2010.

DREOSTI, I. E. Nutritional factors underlying the expression of the fetal alcohol syndrome. **Annual New York Academy Science.**, v. 678, p. 93-204, 1993.

DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog. Neurobiol.**, v. 62, p. 649-671, 2000.

ECKART, M.J.; FILE, S.E.; GESSA, G.L.; GRANT, K.A.; GUERRI, C.; *et al.* Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 22, p. 998-1040, 1998.

ERIKSSON, C.J. Acetaldehyde metabolism in vivo during ethanol oxidation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 85A, p. 319–341, 1977.

ERNHART, C.B.; MORROW-TLUCAK, M.; SOKOL, R.J.; MARTIER, S. Under reporting of alcohol use in pregnancy. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 12, p. 506-511, 1988.

EUSTACE, L.W.; KANG, D.H.; COOMBS, D.J. Fetal alcohol syndrome: a growing concern for health care professionals. **Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.**, v. 32, n. 2, p. 215-21, 2003.

FARR, K.L.; MONTANO, C.Y.; PAXTON, L.L.; SAVAGE, D.D. Prenatal ethanol exposure decreases hippocampal [³H] glutamate binding in 45-day-old rats. **Alcohol.**, v. 5, p. 125–33, 1988.

FERRARI, F.; GABRIELLI, P.R.M.; MELLO, M. A. R. Restrição alimentar durante a gestação e suas implicações sobre o binômio mãe - feto. Um modelo experimental utilizando ratas jovens e adultas. **Alimentação e Nutrição.**, v. 4, p. 45- 56, 1992.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 105, n.1, p. 114–121, 1984.

FORTES, J.R.A. Conceito e definição de alcoolismo. **In: A. & Gatto, B.C.F. Alcoolismo, São Paulo, Sarvier.**, p. 11-27, 1975.

FREIRE, T.M.; MACHADO, J.C.; MELO, E.V.; MELO, D.G. Efeitos do consumo de bebidas alcoólicas sobre o feto. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.**, v. 27, n. 7, p. 376-381, 2005.

GAISLER-SALOMON, I.; MILLER, G.M.; CHUHMA, N.; LEE, S.; ZHANG, H.; GHODDOUSSI, F.; LEWANDOWSKI, N.; FAIRHURST, S.; WANG, Y.; CONJARD-DUPLANY, A.; MASSON, J.; BALSAM, P.; HEN, R.; ARANCIO, O.; GALLOWAY, M.P.; MOORE, H.M.; SMALL, S.A.; RAYPORT, S. Glutaminase-deficient mice display hippocampal hypoactivity, insensitivity to pro-psychotic drugs and potentiated latent inhibition: relevance to schizophrenia. **Neuropsychopharmacology.**, v. 34, p. 2305–2322, 2009.

GALINDO, R.; ZAMUNDIO, P.A.; VALENZUELA, C.F. Alcohol is a potent stimulant of immature neuronal networks: implications for fetal alcohol spectrum disorder. **J. Neurochem.**, v. 94, p. 1500–1511, 2005.

GEMMA, S.; VICHI, S.; TESTAI, E. Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. **Ann Ist. Super. Sanita.**, v. 42, p. 8–16, 2006.

GEMMA, S.; VICHI, S.; TESTAI, E. Metabolic and genetic factors contributing to alcohol induced effects and fetal alcohol syndrome. **Neurosci. Biobehav. Ver.**, v. 31, p. 221–9, 2007.

GILL, K.; MENEZ, J. F.; LUCAS, D.; DEITRICH R. A. Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. **Alcohol.Clin.Exp.Res.**, v. 16, p. 910–915, 1992.

GIL-MOHAPELA, J.; BOEHMEA, F.; KAINERA, L.; CHRISTIEA, B. R. Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure: Insights from different rodent models. **Brain Research Reviews.**, v. 64, p. 283–303, 2010.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G; LIMBIRD, L.E.: MOLINOFF, P.B.: RUDDON, R.W. **Goodman & Gilman: A bases Farmacológicas da Terapêutica.** 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 1436, 1996.

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Neurobiology of Alcohol Dependence: Focus on Motivational Mechanisms. **Alcohol Res. Health.**, v. 31, p. 185-95, 2008.

GONZALES, J.; MUNOZ, M.E.; COLLADO, P.S.; FERMOSE, J.; ESTELLER, A. Influence of acute ethanol administration on hepatic glutathione metabolism in the rat. **Alcohol.**, v. 5, p. 103-106, 1988.

GOODLETT, C.R., HORN, K.H. Mechanism of alcohol-induced damage to the developing nervous system. **Alcohol Res. Health.**, v. 25, p. 175–184, 2001.

GOODLETT, C.R.; HORN, K.H.; ZHOU, F.C. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. **Exp. Biol. Med.**, v. 230, p. 394-406, 2005.

GRINFELD, H. Consumo nocivo de álcool durante a gravidez. Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual. **Einstein.**, v. 7, p. 180-19, 2009.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, n.1, p.7130–7139, 1976.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry.**, v. 97, p. 1634–1658, 2006.

HANDA, R.K.; DEJOSEPH, M.R.; SINGH, L.D.; HAWKINS, R.A.; SINGH, S.P. Glucose transporters and glucose utilization in rat brain after acute ethanol administration. **Metab. Brain. Dis.**, v. 15, p. 211–222, 2000.

HANKIN, J.R.; SOKOL, R.J. Identification and care of problems associated with alcohol ingestion in pregnancy. **Semin. Perinatol.**, v. 19, p. 286-292, 1995.

HARKANY, T.; SASVARI, M.; NYAKAS, C. Chronic ethanol ingestion induced changes in open-field behavior and oxidative stress in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 58, p. 195-201, 1997.

HASSEL, B. AND DINGLEDINE, R. Glutamate. In “**Basic Neurochemistry**” (G. J. Siegel, R. W. Albers, S. Brady, and D. L. Price, eds.), 7th ed. Elsevier–Academic Press, San Diego, CA, p. 267–290, 2006.

HEATON, M.B.; PAIVA, M.; MADORSKY, I.; SHAW, G. Ethanol effects on neonatal rat cortex: comparative analyses of neurotrophic factors, apoptosis-related proteins, and oxidative processes during vulnerable and resistant periods. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 145, p. 249–262, 2003.

HEATON, M.B.; PAIVA, M.; MAYER, J.; MILLER, R. Ethanol-mediated generation of reactive oxygen species in developing rat cerebellum. **Neurosci. Lett.**, v. 334, p. 83–86, 2002.

HERTZ, L.; DRINGEN, R.; SCHOUSBOE, A.; ROBINSON, S. R. Astrocytes: glutamate producers for neurons. **J. Neurosci. Res.**, v. 57, p. 417-28, 1999.

HOU, G.; YANG, X.; YUAN, T. Hippocampal Asymmetry: Differences in Structures and Functions. **Neurochem Res.**, v. 38, p. 453-460, 2013.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova.**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUNT, W.A. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain-a review. **Alcohol.**, v. 13, p. 147-151, 1996.

IDE, K.; SCHMALRUCH, I.K.; QUISTORFF, B.; HORN, A.; SECHER, N.H. Lactate, glucose and O₂ uptake in human brain during recovery from maximal exercise. **J. Physiol.**, v. 522, p. 159-164, 2000.

JACOBSON, S.W.; JACOBSON, J.L.; SOKOL, R.J. Effects of fetal alcohol exposure in infant reaction time. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 18, p. 1125-1132, 1994.

JEROME, H.J. The concept of dependence: Historical Reflections. **Alcohol Health and Research World.**, v. 17, p. 188-190, 1993.

JIA, P.; WANG, L.; MELTZER, H.; ZHAO, Z. Common variants conferring risk of schizophrenia: a pathway analysis of GWAS data. **Schizophr. Res.**, v. 122, p.38-42, 2010.

JIANG, L.; GULANSKI, B.I.; DE FEYTER, M. D.; WEINZIMER, S.A.; PITTMAN, B.; GUIDONE, E.; KORETSKI, J.; HARMAN, S.; PETRAKIS, I.L.; KRYSTAL, J.H.; MASON, G. F. Increased brain uptake and oxidation of acetate in heavy drinkers. **J. Clin. Invest.**, v. 123, n. 41, p. 605-1614, 2013.

JONES, K.L.; SMITH, D.W.; ULLELAND, C.N.; STREISSGUTH, A. Pattern of malformations in offspring of chronic alcoholic mothers. **Lancet.**, v. 1, p. 267-71, 1973.

JONES, M.W.; BASS, W.T. Fetal alcohol syndrome. **Neonatal Nets.**, v. 22, n. 3, p. 63-70, 2003.

KALINA, E.; KOVADLOFF, S.; ROIG, P.M.; SERRAN, J.C., CESARAM, F. Drogadição hoje: indivíduo, família e sociedade. **Porto Alegre: Artmed.**, 1999.

KANE, C.J.; CHANG, J.Y.; ROBERSON, P.K.; GARG, T.K.; HAN, L. Ethanol exposure of neonatal rats does not increase biomarkers of oxidative stress in isolated cerebellar granule neurons. **Alcohol.**, v. 42, p. 29–36, 2008.

KOOP, D.P. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P4502E1. **FASEB J.**, v. 6, p. 724–730, 1992.

KOREN, G.; NULMAN, I.; CHUDLEY, A.E.; LOOCKE, C. Fetal alcohol spectrum disorder. **Canadian Medical Association Journal.**, v. 169, n. 11, p. 1181-1185, 2003.

KVAMME, E.; TORGNER, I.A.; ROBERG, B. Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. **J. Neurosci. Res.**, v. 66, p. 951–958, 2001.

LAJTHA, A.; OJA, S.S.; SCHOUSBOE, A.; SARANSAARI, P. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Amino Acids and Peptides in the Nervous System. **Springer EUA.** p. 1-21, 2007.

LANCASTER, F.; SPIEGEL, K.; SWINEFORD, L.; HART, W.; MOHUIDDIN, R.; COOPER, J. Maternal ethanol exposure with adequate protein in the diet: influence on offspring development. **Nutrition Research.**, v. 7, n. 4, p. 375-83, 1987.

LANDESMAN-DWYER, S.; RAGOZIN, A. Behavioral correlates of prenatal alcohol exposure. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.**, v. 3, p. 187-193, 1981.

LANOUE, K.F.; BERKICH, D.A.; CONWAY, M.; BARBER, A.J.; HU, L.Y.; TAYLOR, C.; HUTSON, S. Role of specific

aminotransferases in de novo glutamate synthesis and redox shuttling in the retina. **J Neurosci Res.**, v. 66, p. 914-922, 2001.

LAURI, S.E.; VESIKANSA, A.; SEGERSTRALE, M.; COLLINGRIDGE, G.L.; ISAAC, J.T.; TAIRA, T. Functional maturation of CA1 synapses involves activity- dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. **Neuron.**, v. 50, p. 415-29, 2006.

LAZO, D.M. *Alcoolismo: o que você precisa saber*. São Paulo: **Paulinas.**, 3rd ed., 1989.

LEE, A.J.; HUNTLEY, J.; VAN DEN BROEK, A.; COATES, D.; ISAAC, R.E. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. **Veterinary Parasitology.**, v. 105, p. 49-63, 2002.

LEMOINE, P.; HARROUSEAU, H.; BORTEYRU, J.P.; MENUET, J.C. Les enfants de parentes alcooliques: amonalties observées à propôs de 127 cas. **Quest. Méd.**, v. 25, p. 478-482, 1968.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v.186, p.464-478, 1990.

LI, Y.; WANG, H. In utero exposure to tobacco and alcohol modifies neurobehavioral development in mice offspring: consideration a role of oxidative stress. **Pharmacol Res.**, v. 49, n. 5, p. 467-73, 2004.

LIEBER, C.S.; DE CARLI, L.M. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. **Alcohol Alcoholism.**, v.24, p. 197-211, 1989.

LIEBER, C.S.; DE CARLI, L.M. Hepatotoxicity of ethanol. **J. Hepathol.**, v.12, p.394-401, 1991.

LIEBER, C. Metabolism and metabolix effects of alcohol. **Seminars in hetetologia.**, v. 17, n. 2, 1980.

LIEBER, C.S. Cytochrome P4502E1: its physiological and pathological role. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 517–544, 1997.

LINDROS, K.O.; HILLBOM, M.E. Acetaldehyde in cerebrospinal fluid: its near-absence in ethanol-intoxicated alcoholics. **Med. Biol.**, v. 57, p. 246–247, 1979.

LOMAKO, J.; LOMAKO, W.M.; WHELAN, W.J.; DOMBRO, R.S.; NEARY, J.T.; NOREMBERG, M.D. Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen. **FASEB J.**, v. 7, p. 1386–93, 1993.

LOVINCER, D.M.; WHITE, G.; WEIGHT, F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. **Science.**, v. 243, p. 1721–24, 1989.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265–267, 1951.

MAGISTRETTI, P.J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. **J. Exp. Biol.**, v. 209, p. 2304–2311, 2006.

MAGISTRETTI, P.J.; PELLERIN, L.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, R.G. Energy on demand. **Science.**, v. 283, p. 496–497, 1999.

MAHEW, V.M. Alcoholism in biblical prophecy. **Alcohol alcohol.**, v. 27, n. 1, p. 89–90, 1992.

MAMELI, M.; VALENZUELA, C.F. Alcohol increases efficacy of immature synapses in a neurosteroid-dependent manner. **European Journal of Neuroscience.**, v. 23, p. 835–839, 2006.

MANCINELLI, R.; BINETTI, R.; CECCANTI, M. Female drinking environmental biological markers. **Ann Ist. Super. Sanita.**, v. 42, p. 31–8, 2006.

MATES, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; DE CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.**, v. 32, p. 595–603, 1999.

MCCRAY, P.B.; GIBSON, D.D.; FONG, K.L.; HORNBROOK, K.R. Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 431, p. 459-468, 1976.

MCKENNA, M.C. Glutamate metabolism in primary cultures of rat brain astrocytes: rationale and initial efforts toward developing a compartmental model. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 537, p. 317-341, 2003.

MCKENNA, M.C. The Glutamate-Glutamine Cycle Is Not Stoichiometric: Fates of Glutamate in Brain. **Journal of Neuroscience Research.**, v. 85, p. 3347-3358, 2007.

MESQUITA, M.A. Frequência dos efeitos do álcool no feto e padrão de consumo de bebidas alcoólicas pelas gestantes de maternidade pública da cidade de São Paulo. **São Paulo: IAMSPE.** 2008.

MILLER, S.I. Significant determinants of susceptibility to alcohol teratogenicity. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 477, p. 87-102, 1996.

MILLER, M.W.; DOW-EDWARDS, D.L. Structural and metabolic alterations in rat cerebral cortex induced by prenatal exposure to ethanol. **Brain Res.** v. 474, n. 2, p. 316-26, 1988.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 188-92, 1972.

MONTOLIU, C.; VALLES, S.; RENAUI-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. **J Neurochem.**, v. 63, p.1855-1862, 1994.

MORIYAMA, Y.; YAMAMOTO, A. Glutamatergic chemical transmission: look! Here, there, and anywhere. **J Biochem.**, v. 135, n. 2, p. 155-163, 2004.

MORSE, B.A.; HUTCHINS, E. Reducing complications from alcohol use during pregnancy through screening. **J. Am. Med. Womens Assoc.**, v. 55, p. 225-7, 2000.

MÖYKKYNNEN, T.; KORPI, E.R. Acute Effects of Ethanol on Glutamate Receptors. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 111, p. 4–13, 2012.

MUNEER, P.M.A.; ALIKUNJU, S.; SZLACHETKA, A.M.; HAORAH, J. Inhibitory effects of alcohol on glucose transport across the blood–brain barrier leads to neurodegeneration: preventive role of acetyl-L-carnitine. **Psychopharmacology**, v. 214, n. 3, p. 707–718, 2011.

NORDMANN, R.; RIBIERE, C.; ROUACH, H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. **Alcohol Alcohol**, v.25, p. 231-237, 1990.

NORENBERG, M.D.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. **Brain Res.**, v. 161, p. 303-310, 1979.

O’CONNOR, M.J.; SHAH, B.; WHALEY, S.; CRONIN, P.; GUNDERSON, B.; GRAHAM, J. Psychiatric illness in a clinical sample of children with pre- natal alcohol exposure. **Am J. Drug Alcohol Abuse**, v. 28, p. 743-754, 2002.

OLNEY, J.W.; WOZNIAK, D.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V.; FARBER, N.B.; BITTIGAU, P.; IKONOMIDOU, K. Glutamate and GABA Receptor Dysfunction in the Fetal Alcohol Syndrome. **Neurotoxicity Research**, v. 4, n. 4, p. 315-325, 2002.

ORREGO, F.; VILLANUEVA, S. The chemical of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. **Neuroscience**, v. 56, n.3, p. 539-55, 1993.

PALEY, B.; O’CONNOR, M. J. Intervention for individuals with fetal alcohol spectrum disorders: treatment approaches and case management. **Dev. Disabil. Res. Rev.**, v. 15, n. 3, p. 258-67, 2009.

PASSINI, J. R. Consumo de álcool durante a gestação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 7, p. 373-375, 2005.

PATTENA A.R.; BROCARDO, P.S.; CHRISTIEA, B.R. Omega-3 supplementation can restore glutathione levels and prevent oxidative damage caused by prenatal ethanol exposure. **Journal of Nutritional Biochemistry.**, v. 24, n. 5, p. 760-9, 2012.

PELLERIN, L.; PELLEGGRI, G.; BITTAR, P.G.; CHARNAY, Y.; BOURAS, C.; MARTIN, J.L.; STELLA, N.; MAGISTRETTI, P.J. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. **Dev. Neurosci.**, v. 20, p. 291–299, 1998a.

PETERSON, D. R.; TABAKOFF, B. Characterization of brain acetaldehyde oxidizing systems in the mouse. **Drug Alcohol Depend.**, v. 4, p. 137–144, 1979.

PETKOV, V.V.; STOIANOVSKI, D.; PETKOV, V.D.; VYGLENOVA, I. Lipid peroxidation changes in the brain in fetal alcohol syndrome. **Biull. EKSP. Biol. Med.**, v. 113, p. 500–502, 1992.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling, **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1163–1182, 2004.

PUSHPAKIRAN, G.; MAHALAKSHMI, K.; ANURADHA, C.V. Protective effects of taurine on glutathione and glutathione-dependent enzymes in ethanol-fed rats. **Pharmazie.**, v. 59, n.11, p. 869-72, 2004.

QUERTEMONT, E.; ERIKSSON, C.J.; ZIMATKIN, S. M.; PRONKO, P.S.; DIANA, M.; PISANO, M.; RODD, Z.A.; BELL, R.R.; WARD, R.J. Is ethanol a pro-drug? Acetaldehyde contribution to brain ethanol effects. **Alcoholism-Clinical and Experimental Research.**, v. 29, p. 1514–1521, 2005.

RAAFAT, B.M.D. Maternal and obstetric effects of prenatal Drug exposure. **Clinics in Perinatology.**, p. 75- 85, 1999.

RAHMA, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging.**, v. 2, n. 2, p 219–236, 2007.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clin. Inverv. Aging.**, v. 2, p. 219–236, 2007.

RAMEZANI, A.; GOUDARZI, I.; LASHKARBOLUKI, T.; GHORBANIAN, M.T.; ABRARI, K.; SALMANI, M.E. Role of Oxidative Stress in Ethanol-induced Neurotoxicity in the Developing Cerebellum. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences.**, v. 15, n. 4, p. 965-974, 2012.

RAO, G.A.; LARKIN, E.C. Inadequate intake by growing rats of essential nutrients from liquid diets used for chronic alcohol consumption. **Nutrition Research.**, v. 5, n. 5, p. 789-796, 1985.

RAO, P.S.S.; SARI, Y. Glutamate Transporter 1: Target for the Treatment of Alcohol Dependence. **Curr.Med. Chem.**, v. 19, n. 30, p. 5148–5156, 2012.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, N.M.V.R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **J. Control Release.**, v. 113, p. 189–207, 2006.

REYNOLDS, A.; LAURIE, C.; MOSLEY, R.L.; GENDELMAN, H.E. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 82, p. 297-325, 2007.

ROSSET, H.L. A clinical perspective of the fetal alcohol syndrome. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, 4:119–22, 1980.

RUSSELL, M.; SKINNER, J.B. Early measures of maternal alcohol misuse as predictors of adverse pregnancy outcomes. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 12, p. 824–30, 1998.

SÁNCHEZ, G.M. Ambiente anti-oxidante/pro-oxidante su impacto medico. **Aracne.**, 1ª ed., 2012.

SCHNEIDER, U.; POOLE, R.C.; HALESTRAP, A.P.; GRAFE, P. Lactate- proton co-transport and its contribution to interstitial acidification during hypoxia in isolated rat spinal roots. **Neuroscience.**, v. 53, p. 1153–1162, 1993.

SCHOUSBOE, A.; SARUP, A.; BAK, L.K.; WAAGEPETERSEN, H.S.; LARSSON, O.M. Role of astrocytic transport processes in

glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **Neurochem. Int.**, v. 45, p. 521–527, 2004.

SCHOUSBOE, A.; WESTERGAARD, N.; HERTZ, L. Neuronal-astrocytic interactions in glutamate metabolism. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 21, p. 49–53, 1993a.

SCHURR, A.; PAYNE, R.S.; MILLER, J.J.; RIGOR, B.M. Brain lactate is an obligatory aerobic energy substrate for functional recovery after hypoxia: further in vitro validation. **J. Neurochem.**, v. 69, p. 423–426, 1997.

SCOLARO, B.; DELWING-DELIMA, D.; CRUZ, J.P.; HINDAWI, D. Mate tea prevents oxidative stress in the blood and hippocampus of rats with acute or chronic ethanol administration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.**, 2012.

SEGRE, C. A. Efeitos do álcool na gestante, no feto e no recém-nascido. **São Paulo: Sociedade de Pediatria de São Paulo.**, 2010.

SHAFFER, J.B.; PRESTON, K.E.; SHEPARD, B.A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of mouse catalase: molecular analysis of a low activity mutant. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 4941, 1990.

SHANK, R.P.; BALDY, W.J.; ASH, C.W. Glutamine and 2-oxo-glutarate as metabolic precursors of the transmitter pools of glutamate and GABA: Correlation of regional uptake by rat brain synaptosomes. **Neurochem. Res.**, v. 14, p. 371-37, 1989.

SHANK, R.P.; BENNETT, G.S.; FREYTAG, S.O.; CAMPBELL, G.L. Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. **Brain Res.**, v. 329, p.364–7, 1985.

SHAPIRO, B.M.; STADTMAN, E.R. The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 24, p. 501-524, 1970.

SICKMANN, H.M.; PATTEN, A.R.; MORCH, K.; SAWCHUK, S.; ZHANG, C.; PARTON, R.; SZLAVIK, L.; CHRISTIE, B.R. Prenatal

Ethanol Exposure has Sex-Specific Effects on Hippocampal Long-Term Potentiation. **Hippocampus.**, v. 24, p. 54–64, 2014.

SIDELL, K.R.; MONTINE, K.S.; PICKLO, M.J.S.R.; OLSEN, S.J.; AMARNATH, V.; MONTINE, T.J. Mercapturate metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal in rat and human cerebrum. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.**, v. 62, p. 146-153, 2003.

SIEGEL, G.J.; ALBERTS, R.W.; BRADY, S.T.; PRICE, D.L. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical. **Aspects Elsevier Academic Press.** 7th ed., 2006.

SILVA, A.C.C.; SILVA, R.B.C.; MELO, J.M.R.; PONTES-FILHO, N.T. Efeitos da exposição ao etanol e da desnutrição sobre o córtex visual durante o desenvolvimento perinatal. **Rev. Cienc. Med. Biol.**, v. 6, n. 2, p. 166-174, 2007.

SINGH, S.P, SNYDER, A. K.; EMAN, S. Effects of ethanol on hexose uptake by cultured rat brain cells. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 14, p. 741–745, 2006.

SIPPEL, H.W. The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. *Journal of Neurochemistry.*, v. 23, p. 451–452, 1974.

SLOVITER, R.S.; VALIQUETTE, G.; ABRAMS, G.M.; RONK, E.C.; SOLLAS, A.L.; PAUL L.A.; NEUBORT, S. Selective loss of hippocampal granule cells in the mature rat brain after adrenalectomy. **Science.**, v. 243, p. 535–538, 1989.

SMALL, S.A.; SCHOBEL, S.A.; BUXTON R.B.; WITTER, M.P.; BARNES, C.A. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 12, p. 585 – 601, 2011.

SMITH, A.M.; ZEVE, D.R.; GRISEL, J.J.; CHEN, W. J. Neonatal alcohol exposure increases malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels in the developing cerebellum. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 160, p. 231–238, 2007.

SMITH, B.R.; ARAGON, C.G.; AMIT, Z. Catalase and production of brain acetaldehyde: a possible mediator of the psychopharmacological effects of ethanol. **Addiction Biology**, v. 2, p. 277–289, 1997.

SMITH, T.L. Regulation of glutamate uptake in astrocytes continuously exposed to ethanol. **Life Sciences**, v. 61, n. 25, p. 245-2505, 1997.

SOKOL, R.J.; DELANEY-BLACK, V.; NORDSTROM, B. Fetal Alcohol Spectrum Disorder. **JAMA**, v. 290, n. 22, p. 2996-2999, 2003.

SOKOLOFF, L. Energetics of functional activation in neural tissues. **Neurochem. Res.**, v. 24, p. 321–329, 1999.

SOMANI, S.M.; HUSAIN, K.; DIAZ-PHILLIPS, L.; LANZOTTI, D.J.; KARETI, K.R.; TRAMMELL, G.L. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. **Alcohol**, v. 13, p. 603-1, 1996.

SOMMAVILLA, M.; SÁNCHEZ-VILLAREJO, M.V.; ALMANSA, I.; SÁNCHEZ-VALLEJO, V.; BARCIA, J.M.; ROMERO, F.J.; MIRANDA, M. The effects of acute ethanol exposure and ageing on rat brain glutathione metabolism. **Free Radical Research**, v. 46, n. 9, p. 1076–1081, 2012.

SONNEWALD, U.; WESTERGAARD, N.; HASSEL, B.; MULLER, T.B.; UNSGARD, G.; FONNUM, F.; HERTZ, L.; SCHOUSBOE, A.; PETERSEN, S.B. NMR spectroscopic studies of ¹³C acetate and ¹³C glucose metabolism in neocortical astrocytes: evidence for mitochondrial heterogeneity. **Dev. Neurosci.**, v. 15, p. 351–358, 1993.

SOOD, B.; DELANEY-BLACK, V.; COVINGTON, C.; NORDSTROM-KLEE, B.; AGER, J.; TEMPLIN, T.; JANISSE, J.; MARTIER, S.; SOKOL, R. J. Prenatal alcohol exposure and childhood behavior at age 6–7 years: I. dose–response effect. **Pediatrics**. v. 108, p. 34, 2001.

SPANAGEL, R. “Recent Animal Models of Alcoholism” **Alcohol Research & Health**, 2000.

SQUIRE, L.; BERG, D.; BLOOM, F.; SPITZER, N.C.; LAC, S.D.; GHOSH, A.; BERG, D.. Fundamental Neuroscience. **Academic Press**, 3rd ed., 2008.

STOBART, L.J.; ANDERSON, C.M. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. 38, 2013.

STOLER, J.M.; HOLMES, L.B. Under-recognition of pre-natal alcohol effects in infants of know alcohol abusing women. **J. Pediatr.**, v.135, p. 430-436, 1999.

STOWELL, A.; HILLBOM, M.; SALASPURO, M.; LINDROS, K. O. Low acetaldehyde levels in blood, breath and cerebrospinal fluid of intoxicated humans as assayed by improved methods. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 132, p. 635–645, 1980.

STRATTON, K.; HOWE, C.; BATTAGLIA, F. Fetal Alcohol Syndrome: Diagnosis, Epidemiology, Prevention, and Treatment. **Washington, DC: NationalAcademy Press**, 1996.

STREISSGUTH, A.P.; BOOKSTEIN, F.L.; SAMPSON, P.D.; BARR, H.M. Neurobehavioral effects of prenatal alcohol, III: PLS analyses of neuropsychologic tests. **Neurotoxicol Teratol.**, v. 11, p. 493-507, 1989.

.SWANSON, C.J.; BURES, M.; JOHNSON, M.P.; LINDEN, A.; MONN, J.M.; SCHOEPP, D.D. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Nature reviews, drug discovery**. v. 4, 2005.

TABAKOFF, B.; ANDERSON, R.A.; RITZMANN, R.F. Brain acetaldehyde after ethanol administration. **Biochem. Pharmacol.**, v. 25, p. 1305–1309, 1976.

TAMPIER, L.; MARDONES, J. Catalase mediated oxidation of ethanol by rat brain homogenates. **IRCS Med.Sci.**, v. 7, p. 389, 1979.

TAMPIER, L.; QUINTANILLA, M.E.; LETELIER, C.; MARDONES, J. Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on narcosis time and lethality of ethanol in UChA rats. **Alcohol.**, v. 5, p. 5–8, 1988.

TATEISHI, N.; HIGASHI, T.; NARUSE, A.; NAKASHIMA, K.; SHIOZAKI, H. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. **J. Nutr.**, v.107, p.51-60, 1977.

THAL, D.R.; RUB, U.; ORANTES, M.; BRAAK, H. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. **Neurology.**, v. 58, p. 1791–1800, 2002.

THOMA, R.; MULLINS, P.; RUHL, D.; MONNIG, M.; YO, R.A.; CAPRIHAN, A.; BOGENSCHUTZ, M.; LYSNE, P.; TONIGAN, S.; KALYANAM, R.; GASPAROVIC, C. Perturbation of the Glutamate–Glutamine System in Alcohol Dependence and Remission. **Neuropsychopharmacology.**, v.36, P. 1359–1365, 2011.

THOMPSON, C. L.; PATHAK, S.D.; JEROMIN, A. NG, L.L.; MACPHERSON, C.R.; MORTRUD M.T.; CUSICK, A.; RILEY, Z.L.; SUNKIN, S.M.; BERNARD, A.; PUCHALSKI, R.B.; GAGE, F.H.; JONES, A.R.; BAJIC, V.B.; HAWRYLYCZ, M.J.; LEIN, E.S. Genomic anatomy of the hippocampus. **Neuron.**, v. 60, p. 1010–1021, 2008.

TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P.J. Metabolic coupling between glia and neurons. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 877–885, 1996.

TSAI, G.; COYLE, J.T. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. **Annu. Rev. Med.**, v. 49, p. 173–84, 1998.

TSUKADA, S.; IINO, M.; TAKAYASU, Y.; SHIMAMOTO, K.; OZAWA, S. Effects of a novel glutamate transporter blocker, (2S,3S)-3-[3-[4-(trifluoromethyl) benzoylamino] benzyloxy]aspartate (TFB-TBOA), on activities of hippocampal neurons. **Neuropharmacology.**, v. 48, n. 4, p. 479-91, 2005.

TURCATEL, E.; FUNCHAL, C.S.; GOMEZ, R. Behavioral changes and oxidative stress parameters by alcohol and tobacco in the central nervous system. **Revista Neurociências.**, 2012.

VALKOA, M.; RHODESB, C.J.; MONCOLA, J.; IZAKOVICA, M.; MAZURA, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-

induced cancer. **Chemico-Biological Interactions.**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VERNADAKIS, A. Glia–neuron intercommunications and synaptic plasticity. **Prog. Neurobiol.**, v. 49, p. 185–214, 1996.

VIALA-ARTIGUES, J.; MECHETTI, C. Histoire de l'alcool archéologie partie 1. **Paris: Fédération des Acteurs de l'Alcoologie et de l'Addictologie.**, 2003.

WANG, J.; DU, H.; MA, X.; PITTMAN, B.; CASTRACANE, L.; LI, T.K.; BEHAR, K.L.; MASON G.F. Metabolic products of [2-¹³C] ethanol in the rat brain after chronic ethanol exposure. **J. Neurochem.** v. 127, n. 3, p.353:364, 2013.

WEINBERG, J.; BEZIO, S. Alcohol-induced changes in pituitary–adrenal activity during pregnancy. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 11, p. 274–280, 1987.

WELLS, P.G.; KIM, P.M.; LAPOSA, R.R.; NICOL, C.J.; PARMAN, T.; WINN, L.M. Oxidative damage in chemical teratogenesis. **Mutat. Res.**, v. 396, p. 65–78, 1997.

WENTZEL, P.; ERIKSSON, U.J. Ethanol-induced fetal dysmorphogenesis in the mouse is diminished by high antioxidative capacity of the mother. **Toxicol. Sci.**, v. 92, p. 416–422, 2006.

Westcott, J.Y.; Weiner, H.; Shultz, J. and Myers, R.D. In vivo acetaldehyde in the brain of the rat treated with ethanol. **Biochemical Pharmacology.**, v. 29, p. 411–417, 1980.

WHA 63.13 - Global strategy to reduce the harmful use of alcohol. Resolution of the sixty- **third World Health Assembly** (may 2010).

WILCE, M.C.J.; PARKER, M.W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et biophysica acta.**, v. 1205, p. 1-18, 1994.

WINTERBOURN, C.C.; METODIEWA, D.; The reaction of superoxide with reduced glutathione. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 314, n. 2, p. 284-90, 1994.

WONG, D.V.T.; FERREIRA, J.R.O.; FONTELE, M.M.F.F.; VIANA, G.S.B.; SOUZA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M. Álcool e Neurodesenvolvimento: aspectos genéticos e farmacológicos. **Revista Eletrônica de Farmácia.**, v. 1, p. 8-23, 2008.

ZAMONER, A.; FUNCHAL, C.; JACQUES-SILVA, M.C.; GOTTFRIED, C.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R. Thyroid Hormones Reorganize the Cytoskeleton of Glial Cells Through Gfap Phosphorylation. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 27, n. 7, p. 845-865, 2007b.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETO, K.P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neurosci Res.**, v. 57, p. 98-103, 2007a.

ZHANG, H.; DICKINSON, D.A.; LIU, R.M.; FORMAN, H.J. 4-Hydroxynonenal increases γ -glutamyl transpeptidase gene expression through mitogen-activated protein kinase pathways. **Free Radical Biology & Medicine.**, v. 38, p. 463-471, 2005.

ZHANG, X.; VELUMIAN, A.A.; JONES, O.T.; CARLEN, P.L. Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. **Epilepsia.**, v. 41, n. 1, p. S52-60, 2000.

ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIES, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. Brain Energy Metabolism. In: **Fundamental Neuroscience**. Ed. Academic Press. Chapter 14, p. 389-409, 1999.

ZIMATKIN, S. M. Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. **Journal of Neurochemistry.**, v. 56, p. 1-11, 1991.

ZIMATKIN, S. M.; DEITRICH, R. A. Ethanol metabolism in brain. **Addiction Biology.**, v. 2, p. 387-399, 1997.

ZIMATKIN, S.M.; BUBEN, A.L. Ethanol oxidation in the living brain. **Alcohol alcohol.**, v. 42, p. 529- 532, 2007.

ZIMATKIN, S.M.; PRONKO, S.P.; VASILIOU, V.; GONZALEZ, F.J.; DEITRICH, R.A. Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 30, p. 1500–1505, 2006.

ZINK, M.; FERBERT, T.; FRANK, S.T.; SEUFERT, P.; GEBICKE-HAERTER, P.J.; SPANAGEL, R. Perinatal exposure to alcohol disturbs spatial learning and glutamate transmission-related gene expression in the adult hippocampus. **European Journal of Neuroscience.**, v. 34, p. 457–468, 2011.