



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

ANA CAROLINA ALVES DE OLIVEIRA

**REDUÇÃO DO VOLUME HIPOCAMPAL, PERDA NEURONAL E
ALTERAÇÕES GLIAIS EM RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE AO ETANOL
DA ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA**

BELÉM

2013

ANA CAROLINA ALVES DE OLIVEIRA

**REDUÇÃO DO VOLUME HIPOCAMPAL, PERDA NEURONAL E
ALTERAÇÕES GLIAIS EM RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE AO ETANOL
DA ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

BELÉM

2013

ANA CAROLINA ALVES DE OLIVEIRA

**REDUÇÃO DO VOLUME HIPOCAMPAL, PERDA NEURONAL E
ALTERAÇÕES GLIAIS EM RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE AO ETANOL
DA ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Belém, 04 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal – Orientador
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima – Co-orientador
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

Prof. Dr. Enio Maurício Nery dos Santos
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

Prof^a. Dr^a. Cristiane do Socorro Ferraz Maia
Instituto de Ciências da Saúde – ICS-UFPA

À minha avó, Francisca Oliveira (in memoriam)
Minha “mestre”, minha maior incentivadora, meu amor!

AGRADECIMENTOS

Ao Amado Jesus Eucarístico, minha fonte de amor e perseverança, sempre presente na minha vida, mesmo nos momentos mais tortuosos, e à Sagrada Intercessão de Nossa Senhora, a quem esse mestrado foi consagrado desde antes de começar.

À minha avó/mãe Francisca Oliveira (*in memoriam*), por seu abraço gostoso nos momentos de alegria (especialmente no momento da aprovação no processo seletivo) e em todos os momentos de dificuldade. Essa vitória é sua, sei que estás olhando por mim!

À minha mãe Mara Oliveira, meu padrasto José Roberto, minha irmã Ana Paula, por todo o apoio, caronas, e por entenderem minha ausência nos encontros de família.

À minha tia/mãe Mônica Oliveira, meu tio/pai Cláudio Velasco, primos/irmãos Diego e Manuelle, pelo apoio, puxões de orelha, palavras de incentivo quando tudo parecia estar dando errado e, especialmente, por entender minha constante ausência. Obrigada pela confiança e por sonharem este sonho junto comigo! Amo vocês!

À minha família da Associação Católica Adoremos o Senhor, pelos incontáveis momentos de oração, adoração, sorrisos e lágrimas de emoção. Sem vocês, essa jornada teria sido triste, sem luz, sem Amor!

Ao meu amado Grupo de Formação São João Bosco, especialmente à minha coordenadora Marcely Marques, Thays Araújo e Eder Nascimento, por todas as conversas, orações e confiança no meu trabalho: Obrigada por me levarem ao Céu junto com vocês!

Às minhas amigas e irmãs de caminhada Cibele Braga, Adrine Carvalho, Andreza Carvalho, Paula Moura e Heidy Mariane: meu Sexteto, amo vocês, obrigada por tudo!!!

À Larissa Castro, que tantas vezes segurou sozinha a responsabilidade do nosso Grupo Alfa, entendendo minha ausência e sempre me encorajando! Amo-te, dupla!

Ao Rafael Fernandes: sem você, eu não estaria aqui! Obrigada pela imensa ajuda no trabalho e por ser o meu melhor amigo em todos os momentos! Nunca vou conseguir expressar o quanto sou grata a ti! Te amo!

À Sra. Jane Fernandes e Sr. Oswaldo Fernandes, pelas conversas, apoio emocional e por me acolher em sua família, especialmente no momento mais complicado dessa caminhada!

Ao orientador e amigo Rafael Rodrigues Lima, pela confiança em meu trabalho, por incitar a busca de novos conhecimentos, pelos ensinamentos, por acreditar em uma universidade pública, gratuita e de qualidade para todos nós: és meu exemplo de docente, quando eu crescer, quero ser igual a você!

Ao professor e amigo Enio Santos, fonte inequívoca e otimismo e gargalhadas: muito, muito obrigada por tudo! Essa jornada seria mais difícil e sem graça sem seu apoio!

Aos melhores amigos de infância do mundo, Thiago Falcão e Thiago Broni, por chorarem e sorrirem comigo em todos os momentos da vida. Vocês não são só ombros amigos, são parte de mim! Amo vocês, desde sempre, para sempre!

Ao professor Wallace Gomes Leal, por sua confiança e suporte para a realização deste trabalho.

À professora Cristiane Maia, por confiar a mim a execução deste trabalho. Espero ter atendido às suas expectativas.

Ao professor Bruno Duarte Gomes, por sua solicitude desde o começo, e por suas palavras de incentivo quando eu menos esperava e mais precisava! Obrigada!

Às queridas parceiras de laboratório Luanna Fernandes e Luana Santana, obrigada, de coração, por colaborar e me ensinar tanto!

Aos estimados colegas de laboratório Marcelo Marques, Celice Cordeiro, Igor Negrão e Soanne Chyara: obrigada por me apresentarem às Neurociências, pelo apoio e ensinamento técnico, por todos os trabalhos e disciplinas juntos: vocês foram fundamentais na minha formação acadêmica!

Ao sempre prestativo Jean Coutinho, o anjo da secretaria da pós-graduação. Obrigada por tudo!

A todos que colaboraram com a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

Ao CNPQ, pelo suporte financeiro.

“...Vou persistir, continuar a esperar

E crer

E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora

Mas na alma a certeza da vitória”

(Tudo Posso – Celina Borges)

RESUMO

O consumo de etanol (EtOH) é considerado um problema de saúde pública do Brasil e no mundo, sendo alvo de pesquisas epidemiológicas e de seus efeitos no organismo durante as várias etapas do desenvolvimento humano. Neste contexto, torna-se necessário o entendimento dos efeitos do EtOH no Sistema Nervoso Central, mais especificamente sobre a formação hipocampal, pois embora seja conhecida como uma estrutura particularmente sensível aos seus efeitos deletérios do EtOH, os mecanismos subjacentes aos efeitos de exposição crônica são pouco estabelecidos. O presente estudo objetiva verificar quais as repercussões da exposição crônica ao EtOH em ratos, desde a adolescência até a idade adulta, sobre os padrões morfométricos e morfologia hipocampal. Ratos Wistar, fêmeas, receberam EtOH por gavagem (6,5 g/kg/dia, 22,5% V/v), do 35º ao 90º dia pós-natal, sendo comparado com grupo controle, o qual recebeu apenas água destilada. Foi realizada análise morfométrica e estereológica, bem como histoquímica e imunoistoquímica. Para a marcação imunoistoquímica, utilizou-se os anticorpos Anti-NeuN, Anti-GFAP e Anti-Iba1. Verificou-se perda neuronal significativa em CA1 e hilo, com CA3, apresentando diminuição não significativa no número de células NeuN+. Também foi encontrada redução significativa da população microglial em todas as áreas investigadas, com ativação destas células. Houve redução no número de astrócitos em animais expostos ao EtOH em todas as áreas, embora não de forma significativa em CA1. Análise estereológica evidenciou redução de volume na formação hipocampal de ratos expostos ao EtOH em relação ao grupo controle. Desta forma, conclui-se que animais expostos cronicamente ao EtOH, sofrem redução volumétrica e perdas neuronal e glial na formação hipocampal.

Palavras-chaves: Alteração Microglial, Etanol, Hipocampo, Perda Neuronal, Volume hipocampal.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 | |
| Imagem comparativa de hipocampo humano com o <i>hippocampus leiria</i> | 19 |
| FIGURA 2 | |
| Ilustração da posição anatômica das estruturas hipocampais..... | 20 |
| FIGURA 3 | |
| Imagem representativa das camadas da formação hipocampal..... | 22 |
| FIGURA 4 | |
| Imagem representativa das áreas de contagem..... | 34 |
| FIGURA 5 | |
| Prancha com representação quantitativa e qualitativa de avaliação estereológica..... | 35 |
| FIGURA 6 | |
| Prancha com representação quantitativa e qualitativa para NeuN | 36 |
| FIGURA 7 | |
| Prancha com representação quantitativa e qualitativa para Iba1..... | 38 |
| FIGURA 8 | |
| Prancha com representação quantitativa e qualitativa para GFAP | 40 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| EtOH | Etanol |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| EUA | Estados Unidos da América |
| SENAD | Secretaria Nacional Antidrogas |
| CEBRID | Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas |
| UNIFESP | Universidade Federal de São Paulo |
| ADH | Desidrogenase |
| HDL | <i>High Density Lipoprotein</i> |
| NOS | Óxido Nítrico Sintase |
| NO | Óxido Nítrico |
| NMDA | N-metil-D-Aspartato |
| GABA | Ácido gama-amino-butírico |
| LTP | <i>Long Term Potentiation</i> |
| LTD | <i>Long Term Depretion</i> |
| CA | <i>Cornu Ammonis</i> |
| TNF α | <i>Tumor Necrosis Factor α</i> |
| IL-1 β | Interleucina 1 β |
| TLR | <i>Toll Like Receptor</i> |
| MCP-1 | <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> |
| NMDA _R | Receptor de N-metil-D-aspartato |
| NIH | <i>Society for Neuroscience, National Institutes of Health</i> |
| CEPAE – UFPA | Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação – Universidade Federal do Pará |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| NeuN | Marcador de neurônios maduros |
| GFAP | Glial Fibrillary Acid Protein (Marcador astrocitário, identifica a proteína ácida fibrilar glial do citoesqueleto) |
| PB | Phosphate Buffered |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1 BREVE DESCRIÇÃO E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS NO MUNDO E NO BRASIL..... | 9 |
| 1.2 DANOS DO ETANOL AO ORGANISMO..... | 11 |
| 1.2.1 Metabolismo E Efeitos Fisiológicos Do Etanol..... | 11 |
| 1.2.2 Efeitos do Etanol no Sistema Cardiovascular..... | 12 |
| 1.2.3 Efeitos do Etanol na Musculatura Esquelética..... | 13 |
| 1.2.4 Efeitos do Etanol na Temperatura Corporal..... | 13 |
| 1.2.5 Efeitos do Etanol no Sistema Nervoso Central..... | 14 |
| 1.3 ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL..... | 18 |
| 1.4 FUNÇÕES RELACIONADAS À FORMAÇÃO HIPOCAMPAL..... | 23 |
| 1.5 CONSUMO DE ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA..... | 25 |
| 1.6 NEUROINFLAMAÇÃO E EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO EtOH..... | 27 |
| 1.7 HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL..... | 27 |
| 1.8 OBJETIVOS..... | 28 |
| 1.8.1 GERAL..... | 28 |
| 1.8.2 ESPECÍFICOS..... | 28 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 2.1. ANIMAIS E PROCEDÊNCIA..... | 29 |
| 2.2. EXPOSIÇÃO AO ETANOL..... | 29 |
| 2.3. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS E IMUNOISTOQUÍMICA..... | 29 |
| 2.3.1 Perfusão e processamento tecidual..... | 29 |
| 2.3.2 Avaliação morfométrica e estereológica..... | 30 |
| 2.3.3 Estudos Imunohistoquímicos..... | 31 |
| 2.3.3.1 Análise Qualitativa..... | 32 |
| 2.3.3.1 Análise Quantitativa..... | 33 |
| 2.3.6 Análise Estatística..... | 34 |
| 3. RESULTADOS..... | 35 |
| 3.1 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO EtOH INDUZ ALTERAÇÕES NAS CAMADAS HIPOCAMPAIS E REDUÇÃO DO VOLUME DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL..... | 35 |
| 3.2 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETOH INDUZ PERDA DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS..... | 36 |
| 3.3 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETOH REDUZ POPULAÇÃO MICROGLIAL..... | 37 |
| 3.4 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETOH REDUZ A POPULAÇÃO DE ASTRÓCITOS..... | 39 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 41 |
| 4.1 Considerações sobre o modelo experimental | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2 Cálculo de Volume | 41 |
| 4.3 Perda Neuronal após exposição crônica ao EtOH | 42 |
| 4.4 Redução da população de microglias IBA-1+ | 43 |
| 4.5 Expressão de GFAP | 44 |
| 5. CONCLUSÕES | 45 |
| REFERÊNCIAS | 46 |
| ANEXO 1 | 60 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 BREVE DESCRIÇÃO E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS NO MUNDO E NO BRASIL

O álcool etílico, ou etanol (EtOH) é um depressor do sistema nervoso central (SNC) amplamente disponível, sendo seu consumo considerado legal e aceito em muitas sociedades, embora cause problemas sociais quando usado de forma abusiva. A exemplo de outras drogas sedativo-hipnóticas, tanto em humanos quanto em modelos animais, tem-se observado que o etanol, mesmo em doses moderadas, causa letargia no tempo de reação, prejuízos na coordenação motora, comportamento desinibido, impulsivo ou agressivo e déficits na memória. Em baixas doses essa substância alivia a ansiedade e cria uma sensação de bem-estar ou até mesmo de euforia (DOUGHERTY et al, 2000; MAIER e POHORECKY, 2006; WHITE et al, 2002; ELIBOL-CAN et al, 2011).

O álcool, entretanto, é também considerado como a droga mais comumente consumida de modo abusivo no mundo, sendo responsável por consideráveis despesas médicas (MASTERS, 2006; FLEMING et al, 2007).

A dependência do álcool (descrita como "alcoolismo") e o seu abuso, constituem uns dos problemas de saúde mais dispendiosos do mundo sob um ponto de vista social e econômico (HARPER e MATSUMOTO, 2005). Os padrões de consumo parecem estar mudando em todo o mundo, com mais mulheres e jovens que bebem abusivamente (JONAS et al, 2000; SCHMID et al, 2003), sendo as adolescentes consideradas como o grupo que mais consome essa substância e apresenta consideráveis déficits neurológicos (SCAIFE e DUKA, 2009). Nos Estados Unidos da América (EUA), os gastos com o tratamento do alcoolismo está orçado em 184,6 bilhões de dólares por ano (GORDIS, 2000).

Pesquisas epidemiológicas apontam dados interessantes para a compreensão do cenário que envolve o consumo de álcool no mundo e, mais especificamente, no Brasil.

Relatórios de 2005 do Estudo e Pesquisa Nacional Sobre Abuso de Drogas do Texas, nos EUA apontam que 28,2% das pessoas entre 12 e 20 anos de idade relataram consumir álcool no mês anterior. Destes jovens, 19% relataram consumo excessivo de álcool (cinco ou mais drinques em uma ocasião) dentro de um mês antes da pesquisa. Além disso, 6% relataram consumo pesado (cinco ou mais

drinques na mesma ocasião, em pelo menos 5 dias antes da pesquisa) (CHIN et al., 2011).

Ressaltando pesquisas realizadas em âmbito nacional, até o ano de 2007 foram realizados cinco levantamentos mais amplos com estudantes de ensino fundamental e médio no Brasil. Os resultados do levantamento realizado no ano de 2004 mostraram que o uso de álcool (definido como qualquer consumo em qualquer momento da vida) de 65% para todos os estudantes, com 41% das crianças da faixa etária de 10-12 anos já tendo experimentado bebidas alcoólicas ao menos uma vez na vida. O consumo frequente de bebidas alcoólicas (definido como 6 ou mais vezes no último mês) aumentou nos quatro primeiros levantamentos e foi de cerca de 11% em 2004. Além disso, o uso pesado (definido como 20 vezes ou mais no último mês) foi de quase 7% (com um pico de quase 9% em Salvador). Entre todas as substâncias psicotrópicas avaliadas no levantamento, o álcool apresentou a menor média de início do consumo, pouco mais de 12 anos de idade (LARANJEIRA et al, 2007).

Ainda neste contexto, o 2º Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil, promovido pela Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD) em 2005, em parceria com o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas (CEBRID), da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), aponta que 12,3% das pessoas pesquisadas, com idades entre 12 e 65 anos, preenchem os critérios para a dependência do álcool e cerca de 75% já beberam pelo menos uma vez na vida. Os dados também indicam o consumo de álcool em faixas etárias cada vez mais precoces (LARANJEIRA et al, 2007).

Considerando o perfil dos consumidores, foi realizado o I Levantamento Nacional Sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira, segundo o qual 52% dos brasileiros acima de 18 anos bebem (pelo menos 1 vez ao ano). Entre os homens são 65% e entre as mulheres 41%. No outro lado estão os 48% de brasileiros abstinentes, que nunca bebem ou que bebem menos de 1 vez por ano. No grupo dos adultos que bebem, 60% dos homens e 33% das mulheres consumiram 5 doses ou mais na vez em que mais beberam no último ano. Do conjunto dos homens adultos, 11% bebem todos os dias (considerados como pessoas que bebem 'muito frequentemente') e 28% consomem bebida alcoólica de 1 a 4 vezes por semana (são os que bebem 'frequentemente').

Em comparação com outras drogas, segundo Fleming et al. (2005), é necessária a ingestão de quantidades relativamente elevadas de álcool para produzir efeitos fisiológicos, o que resulta no seu consumo mais como alimento do que como droga.

1.2 DANOS DO ETANOL AO ORGANISMO

1.2.1 Metabolismo e efeitos fisiológicos do EtOH

O EtOH, uma pequena molécula hidrossolúvel, após ser ingerido em jejum, é rapidamente absorvido no estômago e no intestino delgado para, então, ser distribuído à água corporal total. Concentrações sanguíneas máximas são alcançadas em 30 minutos. A presença de alimento no intestino retarda a absorção, pois diminui a velocidade de esvaziamento gástrico. O metabolismo gástrico do etanol é menor nas mulheres do que nos homens, o que pode contribuir para a maior sensibilidade das mulheres ao álcool (MASTERS, 2006). Entretanto, estudo experimental comparativo sobre o metabolismo do etanol em ratos revela que o metabolismo dessa substância é mais rápido na fêmea do que em machos, devido à maior atividade de enzimas hepáticas relacionadas ao metabolismo existente nas fêmeas, em comparação aos machos (KISHIMOTO et al, 2002).

Um adulto é capaz de metabolizar 7-10g (150-220 mmol) de álcool por hora, o equivalente a 300g de cerveja ou 105g de vinho. A principal via de metabolismo do álcool envolve a álcool-desidrogenase (ADH), uma enzima citosólica que catalisa a conversão do álcool em acetaldeído. Essa enzima é encontrada principalmente no fígado, mas também pode ser localizada no cérebro e no estômago (MASTERS, 2006).

Grande parte do acetaldeído formado a partir do álcool parece ser oxidada no fígado através de uma reação catalisada pela aldeído desidrogenase NAD-dependente mitocondrial. O produto dessa reação é o acetato, que pode ser subsequentemente metabolizado a CO₂ e água.

Os efeitos da ingestão frequente de EtOH nos diversos sistemas serão abordados posteriormente, ressaltando-se que a lesão nos tecidos também pode ser agravada por alterações no estado nutricional dos alcoólicos, tal como desnutrição e

carência das vitaminas A e D e supressão da função imunológica pelo EtOH (Fleming et al, 2006).

1.2.2 Efeitos do Etanol no Sistema Cardiovascular

Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de 20 a 30g de etanol por dia confere um efeito cardioprotetor, já que a ingestão de um a três drinques por dia acarreta redução de 10 a 40% no risco de desenvolver arteriosclerose, isquemias e tromboembolismo venoso, em comparação com os indivíduos que não ingerem bebidas alcoólicas (MUKAMAL et al, 2003, POMP et al, 2008, FLEMING et al, 2006).

De acordo com Fleming et al (2006), um provável mecanismo pelo qual o álcool poderia reduzir o risco dessa alteração patológica é atribuído aos seus efeitos nos lipídios sanguíneos. Alterações dos níveis de lipoproteínas plasmáticas, principalmente o aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) foram associadas aos efeitos protetores do EtOH. A HDL liga-se ao colesterol e retorna ao fígado para eliminação ou reprocessamento, reduzindo os níveis teciduais de colesterol. Desse modo, os aumentos do HDL induzidos pelo etanol poderiam antagonizar o acúmulo de colesterol nas paredes arteriais e reduzir os riscos de infarto.

Outra explicação pode estar no fato de que o etanol, em doses moderadas, aumenta a expressão da proteína Óxido Nítrico Sintase (NOS) na musculatura dos vasos e de metabólitos de Óxido Nítrico (NO) no sangue e nas paredes dos vasos (ABOU-AGAG et al, 2005; KLEINHENZ et al, 2008), sendo este composto um fator importante para a homeostase vascular, atuando no sistema cardiovascular como um vasodilatador, antiproliferativo, antioxidante e anti-inflamatório prevenindo principalmente a arteriosclerose (GKALIAGKOUSI et al, 2011).

Embora os efeitos cardioprotetores do etanol tenham sido detectados inicialmente em pessoas que bebiam vinho, todos os tipos de bebidas alcoólicas exercem essa cardioproteção (MUKAMAL et al., 2003). Outro mecanismo pelo qual o consumo de álcool poderia supostamente produzir efeito cardioprotetor seria a alteração dos fatores envolvidos na coagulação sanguínea (PAHOR et al, 1996). A formação de trombos é uma das etapas na patogenia dos infartos do miocárdio e alguns fatores mantêm o equilíbrio entre sangramento e dissolução dos trombos. O consumo de álcool aumenta os níveis do ativador do plasminogênio tecidual, uma

enzima envolvida na desintegração dos trombos (HANSEN-KRONE et al, 2011; FLEMING et al, 2006).

Em contrapartida, o consumo maciço de álcool pode causar um aumento das pressões sistólica e diastólica. Alguns estudos (FLEMING et al, 2006) sugeriram uma correlação não-linear positiva entre consumo de álcool e hipertensão, que não estava relacionada com idade, tabagismo e outros fatores clássicos. O consumo superior a 30g de álcool por dia (mais de dois drinques) está associado a elevações de 1,5 a 2,3 mmHg nas pressões sanguíneas sistólica e diastólica. Além disso, o consumo crônico, ao contrário da ingestão de doses moderadas, acarreta uma redução da expressão de NOS, diminuição da produção de NO e inibição da proliferação de células progenitoras endoteliais (MUKAMAL et al, 2005; TUNSTALL-PEDOE et al, 1999).

1.2.3 Efeitos do Etanol na Musculatura Esquelética

O consumo diário crônico de álcool está relacionado a uma condição conhecida como miopatia alcoólica, caracterizada por dor e redução da força muscular, simétrica ou focal, mesmo excluindo-se fatores como idade, tabagismo e doenças crônicas. A maioria dos pacientes com alcoolismo crônico apresenta alterações na eletromiografia, bem como indicadores de inflamação muscular visualizados em exames de imagem. Exames laboratoriais também podem apresentar aumentos moderados a graves de creatina-kinase e, em alguns casos, mioglobinúria (HAES et al, 2010).

1.2.4 Efeitos do Etanol na Temperatura Corporal

A ingestão de álcool gera uma sensação de calor porque o etanol eleva a irrigação sanguínea da pele e do estômago. Devido ao possível aumento de transpiração, o calor é dissipado mais rapidamente e a temperatura corporal interna diminui. Após consumo de grandes quantidades de etanol, o mecanismo central de regulação térmica fica deprimido e a diminuição da temperatura pode ser mais pronunciada. Quando a temperatura do ambiente é mais baixa, o efeito do etanol

pode ser perigoso. Relatos sugerem que adolescentes são mais sensíveis à hipotermia induzida por álcool do que adultos (RISTUCCIA e SPEAR, 2008).

1.2.5 Efeitos do Etanol no Sistema Nervoso Central

O consumo excessivo de álcool leva ao desenvolvimento de tolerância e dependência que, conseqüentemente, favorecem ainda mais a ingestão abusiva da substância.

Dependência é definida como uma doença crônica recidivante caracterizada pelo consumo compulsivo de determinada substância e o surgimento de uma síndrome de abstinência durante a cessação do uso da substância. Este processo de dependência desenvolve-se gradualmente, com três principais fases de transição, de acordo com Vilpoux e colaboradores (2009): a primeira é caracterizada pela administração ocasional (aguda) da droga em questão, seja qual for, seguida pelo uso compulsivo e descontrolado. A terceira fase consiste na abstinência, marcada pelo comportamento de procura intensa da droga, podendo ocasionar a recaída.

Estudos pré-clínicos sugerem os substratos neuronais mais relevantes no processo de dependência de EtOH, compreendendo pelo menos quatro circuitos interdependentes: o sistema de recompensa, regulado pelo núcleo acumbens, globo pálido ventral e hipotálamo; o circuito de motivação e/ou unidade, influenciado pelo córtex órbito-frontal; a memória e aprendizado, regulados pela amígdala e hipocampo; e o controle cognitivo, influenciado pelo córtex pré-frontal e córtex cingulado (VILPOUX et al, 2009).

Considerando, portanto, que o SNC é acentuadamente afetado pelo consumo de álcool, é possível perceber alterações estruturais, fisiológicas e funcionais no cérebro. Em geral, humanos alcoólatras mostram significativa diminuição de volume em estruturas cerebrais corticais e subcorticais, tanto em substância cinzenta quanto na substância branca (CREWS e NIXON, 2009; HARPER e BLUMBERGS, 2007). Estes déficits generalizados ocorrem mesmo na ausência de grandes deficiências nutricionais, embora essas deficiências possam causar neurodegeneração e contribuir para a degeneração alcoólica. Estudos pós-morte e *in vivo* a partir de imagem da morfologia cerebral encontraram uma anormal redução no volume do

cérebro em substância cinzenta e branca em várias regiões. Os lobos frontais são regiões bastante afetadas no cérebro alcoólico, com o córtex frontal superior mostrando perda neuronal significativa (KUBOTA et al, 2001; SULLIVAN e PFEFFERBAUM, 2005; CREWS e NIXON, 2009).

Os mecanismos de danos neuronais induzidos pelo etanol foram estudados *in vitro* e *in vivo*, sem que, entretanto, se tenha chegado a um consenso. A principal teoria aponta que o dano e a morte neuronal induzida por álcool ocorrem durante a intoxicação crônica e que este evento está relacionado com uma elevação do estresse oxidativo e indução de citocinas pró-inflamatórias (McCLAIN et al, 2011; MACIEL e KERR-CORREA, 2004).

Estudos *in vivo* relatam que o consumo crônico do EtOH promove mudanças estruturais em várias regiões do cérebro, como descrito por Harper e Blumbergs (1982), os quais verificaram que o peso e volume cerebral de indivíduos alcoólatras era menor em relação aos indivíduos que não consumiam essa substância. Posteriormente observou-se também que o grau de atrofia estava diretamente relacionado com a quantidade de álcool consumida e com o tempo de exposição (HARPER, 2007; HARDING et al, 2000).

Pesquisas utilizando ressonância magnética revelaram reduções volumétricas em regiões do córtex frontal em alcoólatras. Nestes estudos, houve correlações significativas entre o consumo de álcool nos últimos 90 dias e diminuições de volume do córtex cingulado anterior e da substância branca frontal (ENDE et al, 2006). Outros estudos sugerem que a substância branca pode se recuperar rapidamente em situação de abstinência (O'NEILL et al, 2001), ou ser mais vulneráveis a danos durante a recaída (PFEFFERBAUM et al, 1995; CREWS e NIXON, 2009).

Outras regiões do SNC afetadas pelos neurotóxicos são as pertencentes ao sistema límbico, envolvido com o comportamento emocional humano. Qualquer desequilíbrio neste sistema pode alterar tanto o seu estímulo quanto a sua resposta elétrica, levando ao desenvolvimento de doenças psicossomáticas (RÓNAI et al, 2002). Constituem esse sistema a área septal, amígdala, hipocampo, corpos mamilares, giro do cíngulo e o giro para-hipocampal, que possuem conexões com o hipotálamo, córtex pré-frontal e o tálamo que, por sua vez, possui conexões com os núcleos da base (SUYAMA et al, 2009; YELNIK, 2008).

Investigações caracterizando os mecanismos moleculares e celulares subjacentes aos danos da exposição ao EtOH durante a adolescência comumente focalizam a transmissão glutamatérgica, especialmente os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (PIAN et al, 2008). Semelhante aos receptores Ácido Gama aminobutírico (GABA_A), receptores NMDA demonstram padrões de expressão diferenciados com base na idade e região do cérebro (CHIN et al, 2010).

O EtOH é um forte inibidor seletivo dos receptores NMDA, afetando de forma considerável as estruturas que os expressam, assim como os efeitos fisiológicos dependentes deles, tais como atividades neurotróficas e plasticidade sináptica (MIKI et al, 2008; HARDINGHAM e BADING, 2003; ZHUO, 2009). O consumo crônico de EtOH, além de induzir mudanças nesses receptores, altera também os canais de cálcio sensíveis a voltagem, o que pode acarretar em alterações no padrão de liberação de neurotransmissores (WALTER e MESSING, 1999; CHEFER et al, 2011). Observa-se também que mesmo exposição aguda ao EtOH é capaz de diminuir as correntes iônicas ativadas por receptores NMDA, alterando a homeostase de cálcio em várias regiões cerebrais (KELM et al, 2007).

Dentre as demais estruturas cerebrais, outra das que mais se destacam pela sensibilidade ao EtOH é o hipocampo (CHIN et al, 2010; MIKI et al, 2008; SINGH et al, 2009), que expressa altos níveis de receptores NMDA. No hipocampo, bem como no estriado e no cerebelo, ocorrem fenômenos cruciais para o aprendizado e memória, chamados de potencial de longa duração (LTP, do inglês *long term potentiation*) e depressão de longa duração (LTD, do inglês *long term depreition*) (SUSSWEIN et al, 2004).

Considerando que o aumento na transmissão GABAérgica, principal responsável pelos impulsos inibitórios do SNC, pode interferir na despolarização necessária à ativação de receptores NMDA (NMDA_R), tanto a diminuição na atividade de NMDA_R e aumento na transmissão sináptica GABAérgica exercem importante papel na inibição de LTP induzida por EtOH em neurônios de CA1 (SCHUMMERS e BROWNING, 2001). Esse efeito, entretanto, é encontrado durante consumo agudo de EtOH, enquanto que o consumo crônico acarreta uma diminuição na atividade de receptores GABA_A (RANI e TICKU, 2006).

Os mecanismos de ação do EtOH estão sendo elucidados, mas já há hipóteses que sugerem que a intoxicação por esta droga aumenta a densidade dos

canais de cálcio dependentes de voltagem no cérebro, os quais contribuem para a excitabilidade excessiva durante a sua retirada. Corroborando com essa afirmação, Satriotomo e colaboradores (2000) apontam o distúrbio na homeostasia do Ca^{2+} como uma das etapas do desenvolvimento da excitotoxicidade e/ou disfunção no SNC, devido a um aumento permanente da concentração de Ca^{2+} citosólico, diferente do que ocorre sob condições fisiológicas, acarretando danos neuronais. Esse aumento está provavelmente implicado na mediação da toxicidade de vários agentes neurotóxicos, que induzem alterações na integridade física da membrana plasmática ou prejuízo mitocondrial. Isso sugere que o EtOH induz um ou mais mecanismos envolvidos na regulação intracelular de Ca^{2+} (SATRIOTOMO et al, 2000).

A função e expressão dos receptores GABA_A são modificadas após a administração a longo prazo de EtOH *in vivo* e *in vitro*, incluindo no hipocampo (KUMAR et al, 2009; SHEN et al, 2011). Neste contexto, o hipocampo tem sido associado com correlatos comportamentais de dependência e abstinência do EtOH, como hiperatividade, susceptibilidade, apreensão e ansiedade elevada (CAGETTI et al, 2003; LIANG et al, 2004).

Vários estudos têm caracterizado a expressão da subunidade GABA_A nos neurônios do hipocampo (MANGAN et al, 2005), bem como as subunidades 4α e δ , que são abundantemente expressas no hipocampo, com um nível mais elevado no giro dentado do que em CA1 (PENG et al, 2002). Exposição a longo prazo ao EtOH diminui os receptores GABA_A $\alpha 1$ e δ . (CAGETTI et al, 2003; MARUTHA RAVINDRAN et al, 2007; KUMAR et al, 2009).

Além de mudanças drásticas na expressão da subunidade do receptor GABA_A no hipocampo durante o desenvolvimento, há também alterações neuroanatômicas. Por exemplo, marcação autorradiográfica de células do hipocampo em ratos indica que a maioria das células piramidais são formadas no período pré-natal. No entanto, cerca de 85% das células granulares do giro dentado e muitos interneurônios amadurecem após o nascimento, com os primeiros oito dias pós-natal mostrando as maiores taxas de formação de células granulares. O volume hipocampal também aumenta linearmente a uma taxa de cerca de 0,10mL/ano em ratos fêmeas e 0,07mL/ano em machos durante a idade de 4 a 18 anos (ANDERSEN et al, 2007; CHIN et al, 2011).

Estudos apontam o EtOH como fator que aumenta a corrente inibitória tônica pela liberação de receptores GABA_A contendo $\alpha 4/\delta$, altamente expressos em locais extrasinápticos do giro denteado, onde mediam fortemente essa corrente inibitória, relacionada com modulação negativa de memória e processos de aprendizagem hipocampo-dependente (CUSHMAN et al, 2011). Concomitantemente, o EtOH tem sido implicado no rompimento da plasticidade sináptica no giro denteado do hipocampo e redução das células do CA1 (CUSHMAN, 2011).

1.3 ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

Localizado profundamente no lobo temporal, há um grupo de milhões de neurônios organizados em uma rede bem diferente daquela encontrada em qualquer outra parte do sistema nervoso. É uma estrutura cuja forma semelhante a um bulbo, saliente em direção aos ventrículos laterais, tem cativado anatomistas desde as primeiras dissecações realizadas no Egito. A formação hipocampal é um grupo de áreas do cérebro que consiste em giro denteado, hipocampo, complexo subicular, e córtex entorrinal. O esquema básico de células e as vias de fibra da formação hipocampal é a mesma em todos os mamíferos (ANDERSEN et al, 2007; SCORZA et al, 2005).

Esta estrutura ocupa a região medial do lobo temporal e projeta-se para o interior do corno temporal e ventrículo lateral. É coberto anteriormente pelo córtex entorrinal, atrás pelo córtex parahipocampal propriamente dito, em cima pela fímbria do fórnix e embaixo pela parte externa do giro denteado.

Estudado por anatomistas da Escola de Medicina de Alexandria, observou-se que, quando vista sua metade contra-lateral, assemelhava-se a um chifre de carneiro, espiralado, recebendo o nome de *cornu ammonis* (chifre de carneiro em latim). Este acrônimo permanece, usando-se sua sigla, como denominação para os subcampos do hipocampo, CA1, CA2 e CA3. O anatomista Giulio Cesare Aranzi (1564) foi o primeiro a usar o nome "hipocampo", em virtude de sua semelhança com os peixes tropicais (Figura 1) (ANDERSEN et al, 2007). Desta forma, encontra-se na literatura principalmente o uso do termo "hipocampo", baseado na classificação de Rafael Lorente de Nó (1934), que incluiria apenas os campos de CA.

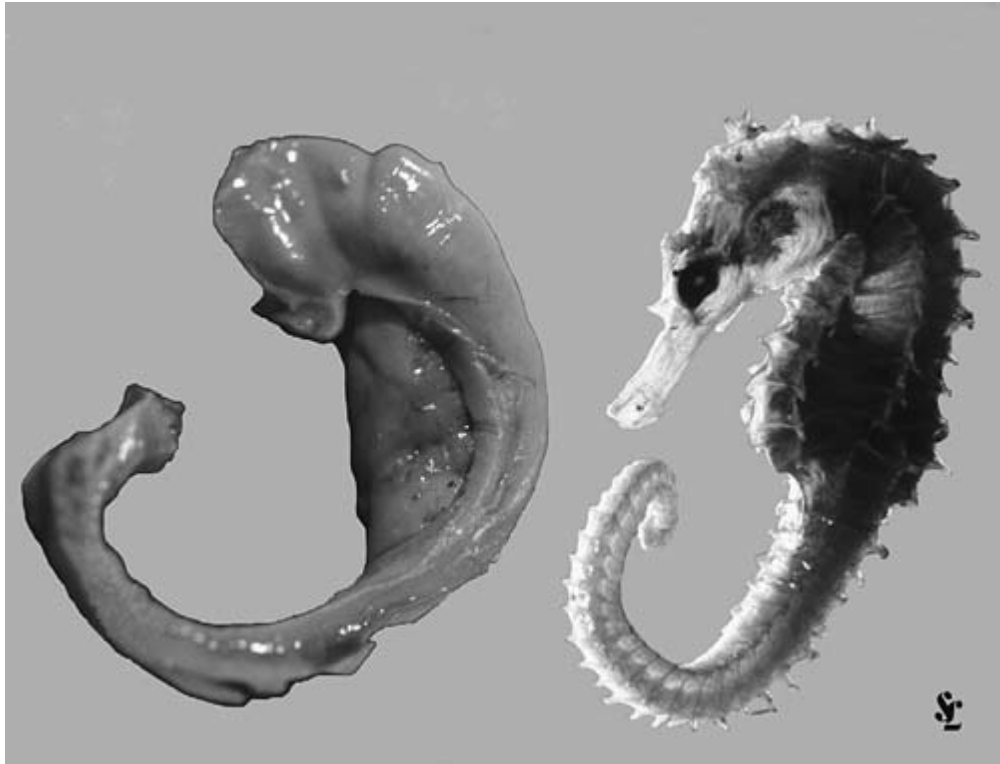


Fig. 1 Hipocampo humano dissecado (esquerda) comparado com a espécie *Hippocampus leria* (direita). Fonte: ANDERSEN, 2007, p13

Para entendermos a estrutura da formação hipocampal, inicialmente faz-se necessário citar as referências de posição anatômica, adotadas segundo a descrição de Andersen e colaboradores (2007), na qual o giro denteado é considerado o polo proximal, enquanto que o córtex entorrinal é considerado o polo distal. Uma porção de qualquer campo do hipocampo pode ser definida em relação a este eixo próximo-distal. Por exemplo, a porção proximal da CA3 está localizada mais perto do giro denteado, e a porção distal está localizada mais perto de CA2 (Figura 2).

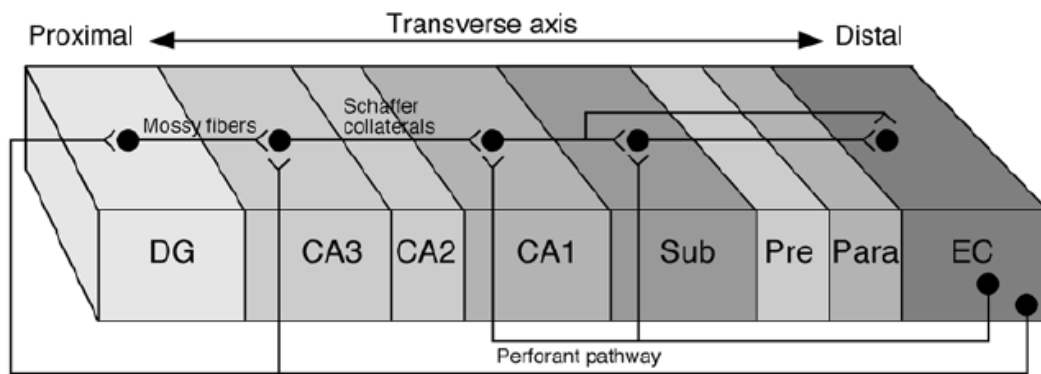


Fig.2 – Ilustração da posição anatômica das estruturas hipocâmpais. Adaptado de ANDERSEN et al, 2007

O giro dentado é uma região cortical trilaminar em forma de V ou U. Tem uma estrutura relativamente semelhante em todos os níveis do hipocampo sendo dividido em camada molecular, camada de células granulares e camada de células polimórficas (hilo). Essa região recebe fibras do córtex entorrinal, as quais constituem sua maior aferência, a via perfurante. Essa comunicação, entretanto, é unilateral, pois o giro dentado não projeta de volta para o córtex entorrinal.

O principal tipo de células do giro dentado, as células granulares, dão origem a axônios chamados fibras musgosas, que se conectam com as células piramidais de CA3. Essa região, entretanto, não projeta de volta para o giro dentado. A célula granular dentada é uma das raras células nervosas que se multiplicam durante toda a vida (ANDERSEN et al, 2007).

Na região do giro dentado estudada neste trabalho, a camada de células polimórficas ou hilo, numerosos tipos celulares podem ser encontrados, sendo o mais proeminente e bem estudado o grupo conhecido como células musgosas (MIKI et al, 2008; ANDERSEN et al, 2007). Elas recebem impulsos sinápticos excitatórios principalmente das células granulares, promovendo impulsos excitatórios de volta a essas células através de axônios de projeção dentro da camada molecular. Devido a essas projeções associativas, as células musgosas são propostas para contribuir com a formação da memória (BUCKMASTER, 2012).

O pesquisador Rafael Lorente de Nó (1934) dividiu o hipocampo em três regiões: CA3, CA2 e CA1. Além do maior tamanho das células piramidais em CA3 e CA2 em comparação com CA1, as aferências e eferências nessas áreas também são diferentes. As células piramidais de CA3, por exemplo, recebem aferências de

fibras musgosas do giro denteado, enquanto que CA1 não as recebe (BRANDÃO, 2005).

A principal camada celular do hipocampo é a camada de células piramidais, que se encontra bem acondicionada em CA1 e mais dispersa em CA2 e CA3. O corpo celular das células piramidais em CA3 é grande, alongado e fortemente embalado em uma camada de 4 a 5 células de profundidade. A transição para CA1 é definida por uma zona de transição estreita com uma camada de células piramidais similar em tamanho às células de CA1 e com núcleo menor que CA3 e mais frouxamente embaladas.

Os corpos e núcleos das células piramidais de CA1 são menores que os de CA3, sendo que nas proximidades com essa região, as células são 4 a 5 camadas mais profundas também. Conforme aproxima-se do subículo, a camada torna-se progressivamente menos embaladas (SATRIOTOMO et al, 2000).

A camada mais estreita de células relativamente livres, localizada mais profundamente à camada de células piramidais é chamada de estrato oriens, ou camada polimórfica, que contém dendritos basais das células piramidais e várias classes de interneurônios (ANDERSEN et al, 2007; BRANDÃO, 2005). Nesta região, localizam-se também as fibras colaterais de Schaffer, a maior eferência de CA3 para CA1.

Uma estreita zona acelular é encontrada em CA3, mas não em CA1 e CA2, chamada de estrato lúcido, situado acima da camada de células piramidais, ocupada pelas fibras musgosas. De forma geral, o hipocampo apresenta três camadas: a camada polimórfica (estrato oriens), a camada piramidal (estrato piramidal) e camada molecular (estrato radiado e estrato lacunoso molecular). Já o giro denteado é formado por uma camada de células polimórficas (hilo), camada granular (estrato granuloso) e camada molecular (estrato molecular), contínua com o hipocampo (Figura 3) (ANDERSEN et al, 2007; SCORZA et al, 2005; OLIVEIRA, 2009).

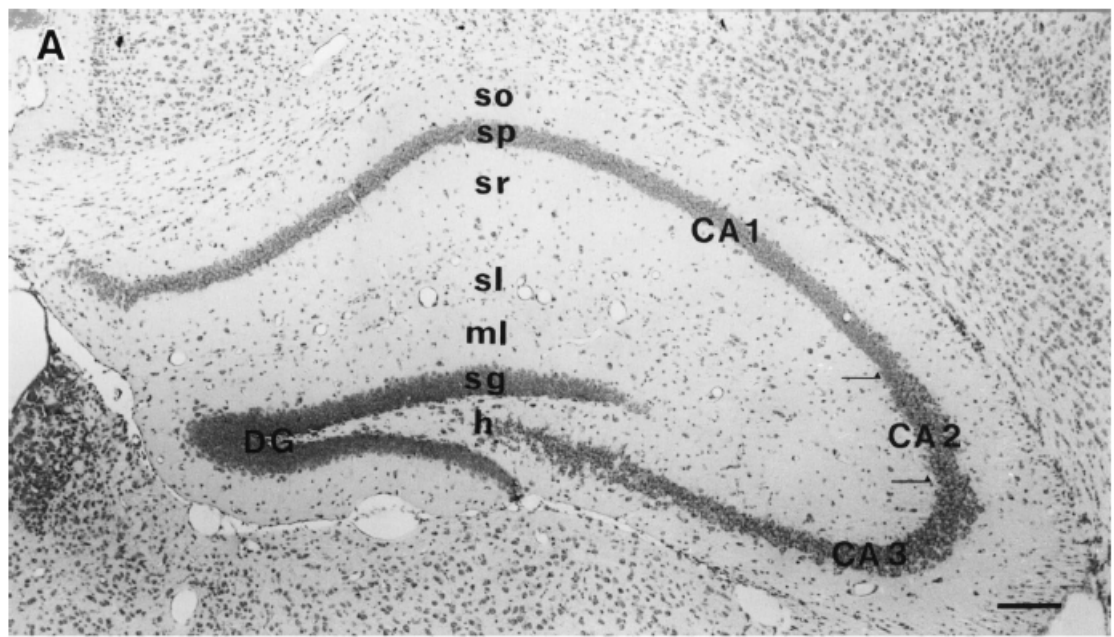


Fig. 3. Representação das camadas celulares da formação hipocampal. SO- Stratum Oriens; SP – Stratum Pyramidale; SR – Stratum Radiatum; SL – Stratum Lacunosum Moleculare; ML – Molecular Layer; SG – Stratum Granulosum; H – Hilus (SATRIOTOMO et al, 2000)

O subículo, presubículo e parasubículo podem ser agrupados sob o termo de complexo subicular. A principal característica dessa estrutura refere-se ao parasubículo, caracterizado por uma camada externa densa, com células piramidais relativamente pequenas e compactadas (ANDERSEN et al, 2007).

O córtex entorrinal é a única região da formação hipocampal com característica multilaminada, sendo dividido em duas ou mais subregiões dependendo da espécie.

Atualmente muito se sabe sobre o desenvolvimento, sinaptogênese, receptores de neurotransmissores e canais iônicos, micro-circuitos, e a maquinaria biológica das células hipocampais. Ao longo das extensas arborizações dendríticas das células piramidais, pode haver muitos milhares de espinhas dendrítica. Estes são os sítios onde a maior parte das sinapses excitatórias pode ocorrer. Uma descoberta importante é que a eficiência com a qual estas sinapses excitatórias transmitem mensagens pode variar com a função da atividade neural (ANDERSEN et al, 2007).

O principal transmissor excitatório do hipocampo, da mesma forma que nas demais regiões do SNC, é o glutamato, que ativa os três principais tipos de

receptores mediadores da transmissão excitatória ionotrópica: AMPA, cainato e NMDA.

Estudos comportamentais sobre os efeitos do EtOH (SATRIOTOMO et al, 2000) apontam o hipocampo como um dos principais alvos dos efeitos neurotóxicos dessa substância, sendo mais sensível do que outras regiões do SNC. O EtOH interage com os receptores NMDA e GABA_A, que existem em concentração elevada no hipocampo, potencializando os efeitos inibitórios do sistema gabaérgico no hipocampo, através dos receptores GABA_A, enquanto antagoniza a ativação de receptores NMDA hipocámpais (ALIJANPOUR et al, 2011). Esta ação do EtOH tem sido amplamente aceita, sugerindo-se que a sensibilidade varia de acordo com diferentes regiões cerebrais.

Inúmeras evidências sugerem que o hipocampo adolescente é particularmente vulnerável a danos induzidos por álcool (CREWS et al, 2000; WHITE e SWARTZWELDER, 2005). Relatórios mostram consistentemente que o consumo excessivo de álcool durante a adolescência reduz o volume do hipocampo e interfere na aprendizagem e memória dependente do hipocampo (DE BELLIS et al, 2000; NAGEL et al, 2005; SCHWEINSBURG et al., 2010; SIRCAR et al., 2009; WEITEMIER e RYABININ, 2003). Além disso, a neurogênese, um processo que continua ao longo da vida e contribui significativamente para aspectos estruturais e funcionais do hipocampo, é inibida por intoxicação alcoólica (CREWS et al, 2006; MORRIS et al, 2010; NIXON e CREWS, 2002).

A literatura atual apoia firmemente a crescente evidência de que o EtOH inibe a liberação de glutamato na região CA1 do hipocampo neonatal (BASAVARAJAPPA et al, 2008), causando repercussões consideráveis na estrutura e função hipocámpal.

1.4 FUNÇÕES RELACIONADAS À FORMAÇÃO HIPOCÁMPAL

O hipocampo pode estar envolvido nos efeitos neurocognitivos das drogas. Há indícios de que o hipocampo desempenha um papel crítico em muitos aspectos dos processos de dependência. Além disso, evidências mostram que disfunção cognitiva induzida por fármacos pode estar relacionada com as alterações na neurogênese em adultos (ALIJANPOUR et al., 2011).

Dentre as muitas tarefas comportamentais que envolvem o hipocampo, boa parte das pesquisas foi realizada abordando o processamento da informação espacial. Em sua publicação de referência, O'Keefe et al. (1979) afirmaram que o hipocampo suporta algo semelhante a um mapa cognitivo que usa informações espaciais para organizar e orientar comportamento (CHIN et al, 2010).

Além disso, o hipocampo está relacionado aos processos mnemônicos, justificando alterações em procedimentos referentes à memória e aprendizado em casos de lesão ou intoxicação.

A memória pode ser classificada conforme o tempo de retenção ou quanto à sua natureza. Considerando o tempo de retenção, temos (1) memória ultrarrápida ou imediata, cuja duração dura apenas alguns segundos; (2) memória de curta duração, que dura minutos ou horas e (3) memória de longa duração, que estabelece engramas duradouros, de dias, semanas ou anos (McGAUGH, 1996).

Quanto à sua natureza, a memória classifica-se em (1) memória explícita ou declarativa; (2) memória implícita ou não declarativa e (3) memória operacional ou memória de trabalho. A memória explícita consiste em tudo o que só se pode evocar por meio de palavras ou outros símbolos, pode ser facilmente formada ou perdida, sendo subdivida em episódica (eventos relacionados com o tempo) ou semântica, quando envolve conceitos atemporais (LENT, 2010).

A memória implícita é mais duradoura e relaciona-se a conceitos que não necessitam de descrição em palavras, podendo ser dividida em memória de representação perceptual (visualização de um evento antes da compreensão de seu significado), memória de procedimentos (hábitos, habilidades e regras), associativa e não associativa (IZQUIERDO et al, 2008).

Já a memória operacional possibilita o armazenamento temporário de informações úteis apenas para raciocínio imediato, resolução de problemas ou elaboração de comportamentos (LENT, 2010).

O hipocampo está relacionado à memória episódica (CLAYTON et al, 2001), memória operacional (EZZYAT e OLSON, 2008, NICHOLS et al, 2006), memória espacial (CORNWELL et al, 2008).

Amnésia resultante de danos hipocámpais nos seres humanos é classificada como temporária. Há, entretanto, evidências de déficits de memória não classificados como temporários em tarefas que requerem uso extensivo da memória

espacial em ratos, particularmente em teste do labirinto aquático de Morris (CLARK et al, 2005). Dessa forma, a questão não é mais se o hipocampo desempenha um papel na memória espacial, mas sim como contribui para o processamento espacial (REDISH, 2001).

Dentro do hipocampo, dois grupos distintos de células têm sido implicadas no processamento da memória espacial: células piramidais e interneurônios inibitórios (EGO-STENGEL e WILSON, 2007). Dado o desenvolvimento significativo do hipocampo na memória espacial, não é surpresa que os neurônios piramidais hipocampais, as células primárias de eferências do hipocampo demonstrem sensibilidade espacial, sendo especialmente implicadas em caso de exposição ao EtOH.

1.5 CONSUMO DE ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA

A relação entre o consumo excessivo de álcool durante a adolescência e o aumento da tendência a desenvolver desordens alcoólicas na maturidade tem intensificado o foco sobre o entendimento de como o EtOH interage com o cérebro durante essa etapa do desenvolvimento (McCLAIN et al, 2011).

Os efeitos do EtOH têm sido extensivamente estudados em modelos animais adultos. Entretanto, não se tem certeza se esses efeitos são os mesmos em adolescentes. De fato, os adolescentes mostram uma suscetibilidade peculiar ao EtOH em comparação com adultos (SPEAR, 2000; SPEAR e VARLINSKAYA, 2005). Por exemplo, eles são menos sensíveis aos déficits motores induzidos por EtOH (SILVERI e SPEAR, 2001; WHITE et al, 2002), e efeitos sedativos (LITTLE et al, 1996; PIAN et al, 2008), quando comparados com os adultos. No entanto, os adolescentes são mais sensíveis, por exemplo, à hipotermia induzida por etanol e prejuízos na memória do que os adultos (RISTUCCIA e SPEAR, 2008; DOREMUS-FITZWATER et al, 2010).

Ao longo da adolescência, profundas alterações neurobiológicas ocorrem e complicam a compreensão dos efeitos do EtOH durante o desenvolvimento. Embora o cérebro do ser humano atinja 90% de seu peso adulto por volta dos seis anos, as mudanças estruturais continuam ao longo da adolescência. Há, por exemplo, aumento no volume da substância branca, provavelmente devido à mielinização de

axônios e diminuição no volume da substância cinzenta, decorrente de morte celular e perda de neurônios e glia (CHIN et al, 2010).

Adolescentes com histórico de abuso ou dependência de EtOH apresentam déficits em função cognitiva e memória. Estudos em humanos mostram que o abuso na adolescência está associado com diminuição no volume hipocampal e redução nas atividades de córtex frontal e parietal durante tarefas de memória de trabalho (TAPERT e BROWN, 2000; TAPERT et al, 2001; DE BELLIS et al, 2000). Corroborando com esses achados, estudos em modelo animal têm mostrado que exposição ao EtOH na adolescência induz prejuízos mais severos à neurogênese hipocampal do que a exposição equivalente em adultos (CREWS et al, 2006).

Embora a literatura publicada não seja rica em número de estudos que indicam que os padrões de expressão de subunidades do receptor GABA_A mudam durante a adolescência, fica claro a partir desses estudos que este período do desenvolvimento é um tempo em que ocorrem alterações nos receptores da formação hipocampal. Além disso, sugere-se que o EtOH pode ter efeitos diferenciais durante a adolescência devido a estas alterações em composição de subunidades de receptores GABA_A (CHIN et al, 2010).

Consumo abusivo de EtOH durante a adolescência produz um padrão de danos cerebrais diferentes do consumo em adultos. Correntes tônicas inibitórias mediadas por receptores GABA_A no giro denteado do hipocampo são mais fortes em ratos adolescentes do que em adultos após administração moderada (30mM) de etanol (MASTERS, 2006).

Imagens de ressonância magnética revelam que adolescentes com desordem por uso de álcool tem déficits bilaterais no volume do hipocampo quando comparado com grupo controle. Adolescentes com desordem por uso de álcool, mas sem comorbidades psiquiátricas adicionais apresentam menor volume no hipocampo esquerdo do que os controles saudáveis, quando corrigido para o volume intracraniano total. No entanto, alterações de memória não foram encontradas neste grupo (DE BELLIS et al, 2000).

O uso crônico de álcool na adolescência tem sido associado com fracas competências verbais e não verbais, dificuldades de atenção, aprendizagem e retenção, bem como prejuízo no funcionamento visuoespacial, executivo e déficits de memória de trabalho (SULLIVAN e PFEFFERBAUM, 2005).

1.6 NEUROINFLAMAÇÃO E EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO EtOH

O alcoolismo é uma conhecida causa de neurodegeneração, de acordo com Qin et al. (2008) os quais observaram que administração crônica de EtOH em ratos aumentam citocinas e quimiocinas no cérebro, incluindo $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1). Alguns estudos sugeriram que exposição aguda ao EtOH inibe respostas de receptores do tipo Toll (TLR) (PRUET et al, 2003), enquanto outros afirmam que receptores TLR contribuem para a ativação de respostas cerebrais pro-inflamatórias e neurodegeneração (ALFONSO-LOECHES et al, 2010).

Corroborando com essa teoria, Block et al. (2007) identificam a micróglia, os macrófagos residentes do SNC, como uma importante fonte de citocinas e outros moduladores envolvidos na neuroinflamação. Embora os efeitos do EtOH sobre a microglia sejam pouco conhecidos, alguns estudos sugerem que uma exposição aguda de apenas 4 dias é o suficiente para que haja uma proliferação dessas células, acompanhada por mudanças em sua morfologia, indicando um estágio de ativação parcial, sem que a micróglia atinja o estágio fagocítico (McCLAIN et al, 2011).

Outro tipo de célula glial de fundamental relevância são os astrócitos, importantes para a sobrevivência neuronal e regulação de ambientes iônicos necessários para a função fisiológica de neurônios (BUFFO et al, 2010; DINIZ et al, 2012). Verificou-se, em estudos prévios, aumento de ativação astrocítica em consumo crônico de EtOH (FRANKE, 1995; VONGVATCHARANON et al, 2010; GONZÁLEZ et al; 2007).

1.7 HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL

O consumo de álcool é um dos fenômenos mais frequentes na população mundial, devido à facilidade em adquirir desta droga que, quando utilizada cronicamente, pode levar a um quadro conhecido como alcoolismo, sendo agravado quando iniciado na adolescência, por neste período ainda ocorrer a maturação do SNC (ELLIOTT e BOWER, 2008; KHALSA et al, 2008; SANCHIS e ARAGÓN, 2007;

UHART e WAND, 2009; CARVALHO et al, 1995; SCHUCKIT, 2009, MAIA et al, 2009).

A adolescência é um período de desenvolvimento marcado por acentuadas mudanças fisiológicas e psicossociais. Durante este período, os adolescentes podem envolver-se em busca de sensações e comportamentos imprudentes como a experimentação de drogas e álcool. De fato, justifica-se que a maior taxa de consumo de álcool ocorra durante a adolescência e uma alta percentagem, 48,7%, de indivíduos menores de idade (com idade entre 18 e 20 anos) relatam ter consumido álcool nos últimos 30 dias (SAMHSA, 2008).

Há, na literatura, diversas investigações com janelas de exposição de agudo a crônico, porém, em nossa pesquisa, buscamos verificar os efeitos de uma exposição crônica ao EtOH que compreenda um período correspondente à fase púbere, em que geralmente ocorre o início da ingestão desta substância, estendendo-se até a fase adulta, considerando o que ocorre em nossa sociedade. Neste contexto, investigaremos os efeitos do EtOH sobre as dimensões hipocâmpais, bem como sua influência sobre a densidade neuronal, e alterações gliais, acompanhando uma etapa abrangente do desenvolvimento.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 GERAL

Investigar os efeitos da exposição crônica ao EtOH em ratos, da adolescência até a fase adulta sobre os padrões morfométricos e morfologia do hipocampo

1.8.2 ESPECÍFICOS

- a) Investigar os efeitos do EtOH sobre os aspectos dimensionais do hipocampo (morfométricos e estereológicos);
- b) Verificar, por análise imunoistoquímica, os efeitos da exposição crônica ao EtOH sobre a densidade de neurônios maduros;
- c) Descrever, quantitativamente e qualitativamente, os padrões de ativação microglial em diferentes regiões do hipocampo.

d) Descrever, quantitativamente e qualitativamente a astrocitose no hipocampo após exposição crônica ao EtOH

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E PROCEDÊNCIA

Para este estudo, foram utilizados ratos com 35 dias, da raça Wistar, fêmeas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará. Todos os procedimentos experimentais e as manipulações com os animais foram realizados em obediência às normas sugeridas pela *Society for Neuroscience, National Institutes of Health* (NIH, USA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE - UFPA), Parecer BIO043-12.

2.2 EXPOSIÇÃO AO ETANOL

Inicialmente, 20 animais, com 30 dias pós-natal, foram mantidos em caixas próprias em grupos de 5 animais, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com comida e bebida a vontade. Após cinco dias de aclimação, os animais, então na puberdade, começaram a receber, por gavagem intra-gástrica, EtOH em dose baseada nos protocolos seguidos por (MAIER e WEST 2001), 6,5 g/kg/dia (22,5 %), até completar 90 dias (fase adulta). Os animais controle receberam a mesma quantidade de água destilada.

2.3 ESTUDOS MORFOMÉTRICOS E IMUNOISTOQUÍMICA

2.3.1 Perfusão e processamento tecidual

Após o tempo de sobrevivência já especificado, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (9 mg/Kg) e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com solução salina a 0.9% heparinizada, seguida de paraformaldeído a 4%.

Após a perfusão dos animais, os respectivos encéfalos foram removidos da caixa craniana, pós-fixados no mesmo fixador usado na perfusão por 12h. Em seguida, os cérebros foram crioprotetidos em soluções com concentrações crescentes de sacarose e glicerol. Posteriormente, os mesmos foram embebidos em

Tissue tek, congelados em câmara de criostato (Carl Zeiss, Mícron, Alemanha) com efeito Peltier (- 55 °C).

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

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

2.3.2 Avaliação morfométrica e estereológica

Para avaliar o volume total da formação hipocampal, foram identificados os elementos limítrofes em cada secção, em toda a região rostro-caudal da estrutura. Para calcular a quantidade de células, foram identificadas as seguintes áreas: CA1, CA3 e a camada de células polimórficas do giro denteado (hilo). A área de CA2 não foi avaliada em virtude da dificuldade em estabelecer seus limites, especialmente considerando as técnicas empregadas neste estudo.

Secções de 100µm foram coradas com violeta de cresila, desidratadas em bateria de concentração crescente de álcool e xilol e montadas utilizando-se Entellan®.

Em estereomicroscópio (Medilux, MDL-DS4-TRI) sob 2,8x de aumento, acoplada a uma câmera digital, foram obtidas imagens de todas as secções, focando a formação hipocampal, unilateralmente, representativamente a toda a extensão rostro-caudal. A partir da imagem digitalizada, posicionou-se um *grid* de contagem sobre a mesma, respeitando as medidas da imagem obtida, contendo

pontos e equidistância entre eles calculados proporcionalmente. Em cada imagem, contaram-se os pontos que tocavam a formação hipocampal em toda a sua dimensão.

Utilizou-se, para cálculo de volume, o Princípio de Cavalieri, uma ferramenta estereológica simples com viés reduzido, indicado para cálculo de volume de estruturas irregulares. O matemático italiano Cavalieri mostrou que o volume de qualquer objeto pode ser estimado a partir de secções paralelas com distância conhecida, somando-se as áreas de todos os cortes do objeto (GUNDERSEN et al, 1988).

Para cada secção, contaram-se os pontos que tocavam a estrutura de interesse, cuja área absoluta é dada por:

$$a(sec) = A_p \cdot \sum P \cdot x^2$$

Onde A_p corresponde à área referente à cada ponto, $\sum P$ corresponde ao número de pontos que tocam a estrutura. O resultado é expresso em uma unidade de medida conhecida x^2 .

Para obtermos o volume total da estrutura de interesse, usamos a fórmula:

$$V = A_p \cdot \sum P \cdot T$$

Sendo A_p a área correspondente ao ponto, $\sum P$ o número total de pontos que tocam a estrutura e T o intervalo entre as secções. O resultado encontrado foi expresso em mm^3 .

2.3.3 Estudos Imunohistoquímicos

Para a marcação imunohistoquímica seguiu-se o protocolo proposto por Gomes-Leal et al (2004), com as lâminas retiradas do freezer, mantidas em 37° durante 30 minutos e lavadas em PB 0,1M por 5 minutos. Para melhorar a intensidade de marcação, as secções foram tratadas com tampão borato (pH 9,0) previamente aquecido a 65°C , mantendo-se essa temperatura constante durante todo o tratamento nessa solução. Na sequência, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos e imersas em metanol com peróxido de hidrogênio a 1% durante 20 minutos, as secções foram demarcadas com caneta hidrofóbica e lavadas em PBS tween 3 vezes, por 3 minutos cada. Após esta etapa, foi realizado o bloqueio em

soro normal de cavalo a 10% para NeuN e soro normal de cabra a 10% para GFAP e Iba1. Em seguida, os cortes histológicos foram incubados em soro por uma hora e, após esse tempo, o soro foi substituído por incubação *overnight* em câmara úmida (4°C) com os anticorpos primários:

- **Anti-NeuN** (1:100, Chemicon Millipore): marcador para corpos neuronais maduros, se liga a uma proteína nuclear específica de neurônios, destinando-se a indicar as modificações de densidade/sobrevivência neuronal nas condições experimentais deste projeto (MULLEN et al, 1992; SILVA et al, 2012).

- **Anti-GFAP** (1:2000, Dako): marcador para astrócitos, o qual identifica a proteína ácida fibrilar glial, um componente do citoesqueleto dessa célula (GOMES-LEAL et al, 2004). A imunorreatividade para GFAP foi usada como critério para avaliar qualitativamente os efeitos da exposição ao EtOH em astrócitos, observando as características morfológicas da célula. A intensidade da imunomarcção e alterações na morfologia dos astrócitos foram consideradas nessa análise (SILVA et al, 2012).

- **Anti-Iba1** (1:1000, WAKO): anticorpo que reconhece uma proteína quelante de Ca^{+2} presente no citoplasma microglial (ITO et al, 1998). Trata-se de um marcador de microglia ativada e não ativada.

Na sequência, após lavagens em solução PBS Tween, as lâminas foram incubadas em apropriados anticorpos secundários biotinizados, sendo anti-camundongo feito em cavalo para anti-NeuN (1:100, Vector) e para GFAP e Iba-1, utilizou-se o anticorpo feito em cabra anti-coelho (5:1000, Vector) por duas horas, e lavadas, na sequência, 3 vezes (3 minutos cada). Após, o material foi incubado em complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC, Vector Laboratories) por duas horas. As secções foram lavadas quatro vezes (3 minutos em cada lavagem) e reveladas em reação com DAB, conforme protocolo previamente descrito (GOMES-LEAL et al, 2004). Após reação, lavou-se as secções em PBS Tween, desidratadas e montadas com lamínulas por Entellan® (MERCK, Alemanha.)

2.3.3.1 Análise Qualitativa

Todas as secções coradas pela violeta de cresila e marcadas pelos diferentes métodos imunistoquímicos foram inspecionadas em microscópio

binocular Nikon Eclipse E200. Imagens de secções com campos mais ilustrativos foram obtidas com um sistema de fotomicroscopia digital utilizando-se o programa de computador Moticam 2500[®] acoplado ao fotomicroscópio Nikon 50i.

2.3.3.2 Análise Quantitativa

Para a avaliação quantitativa dos padrões histopatológicos foram realizadas contagens de marcações imunohistoquímicas, usando microscópio binocular Nikon Eclipse E200, através de uma gradícula de contagem de 0,00625 mm² acoplada a uma das oculares, em objetiva 40x.

Contou-se 3 secções por animal, 10 animais de cada grupo, nas áreas CA1, CA3 e hilo hipocampal (Figura 4). Foram contados os números de neurônios NeuN+, astrócitos e células microgliais Iba1+ nos dois grupos. As médias das contagens e o erro padrão obtidos foram plotados em coordenadas cartesianas.

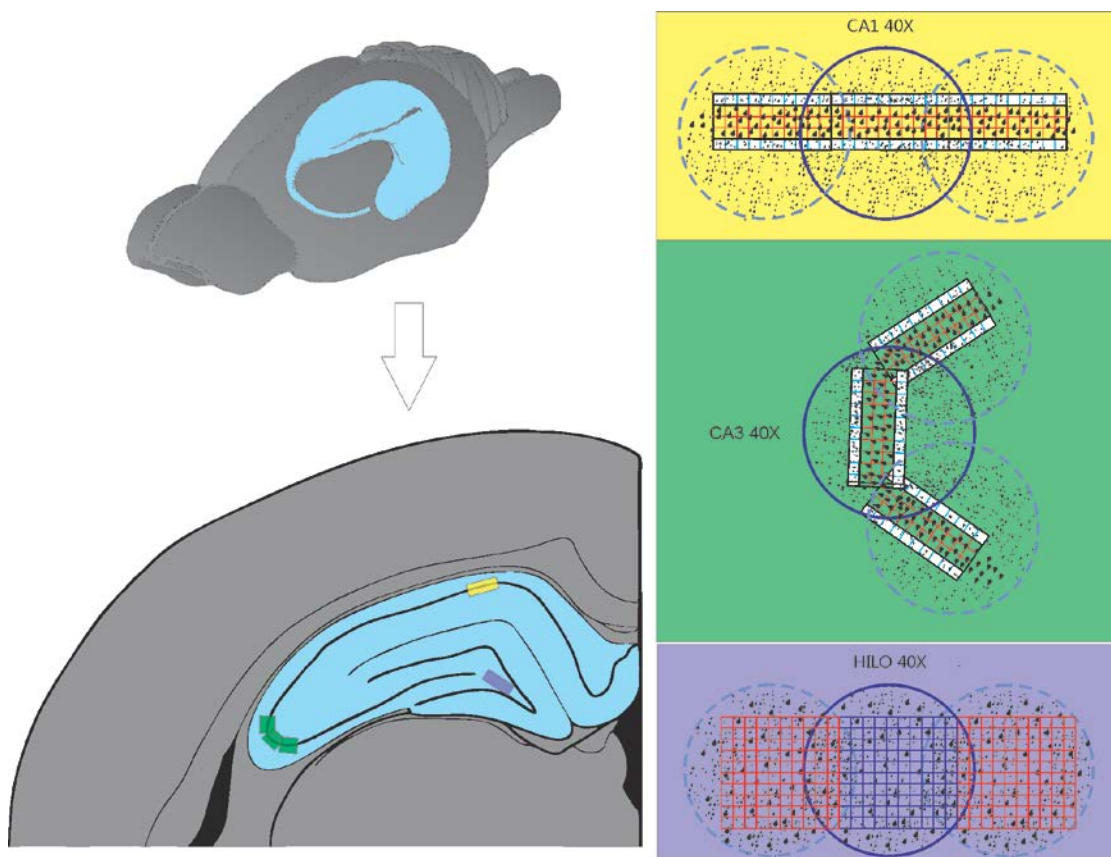


Fig. 4: Imagem representativa das áreas de contagem da formação hipocampal. Em amarelo, área de contagem em CA1. Em verde, área de contagem em CA3. Em lilás, área de contagem em hilo hipocampal.

Devido às dimensões reduzidas nas regiões de CA1 e CA3, foram contados apenas três campos de $0,01875\text{mm}^2$, que corresponde a trinta das cem divisões da gradícula de contagem para lâminas de NeuN, e cinco campos de $0,03125\text{mm}^2$, correspondendo a cinquenta divisões da gradícula para lâminas de Iba1 e GFAP.

2.3.6 Análise Estatística

Para análise estatística dos dados morfométricos e imunoistoquímicos utilizou-se o software GraphPad Prism 5.0. A normalidade (i.e. distribuição gaussiana) de cada grupo foi testada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Os dados obtidos pelas técnicas imunoistoquímicas e histoquímicas se mostraram homogêneos, sendo escolhido o teste *t*-Student com $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO EtOH INDUZ ALTERAÇÕES NAS CAMADAS HIPOCAMPAIS E REDUÇÃO DO VOLUME DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

A análise de secções coradas com violeta de cresila sugere uma diminuição da densidade celular e descompactação das camadas de células piramidais em CA1 e CA3, bem como diminuição de densidade de células polimórficas do hilo (Figura 5).

Cálculo de volume de toda a formação hipocampal, avaliada a partir do princípio de Cavalieri, aferiu uma diminuição significativa ($p= 0,0128$) em hipocampo de animais expostos ao EtOH ($16,64\pm 1,50$) em relação ao grupo controle ($22,75\pm 1,79$).

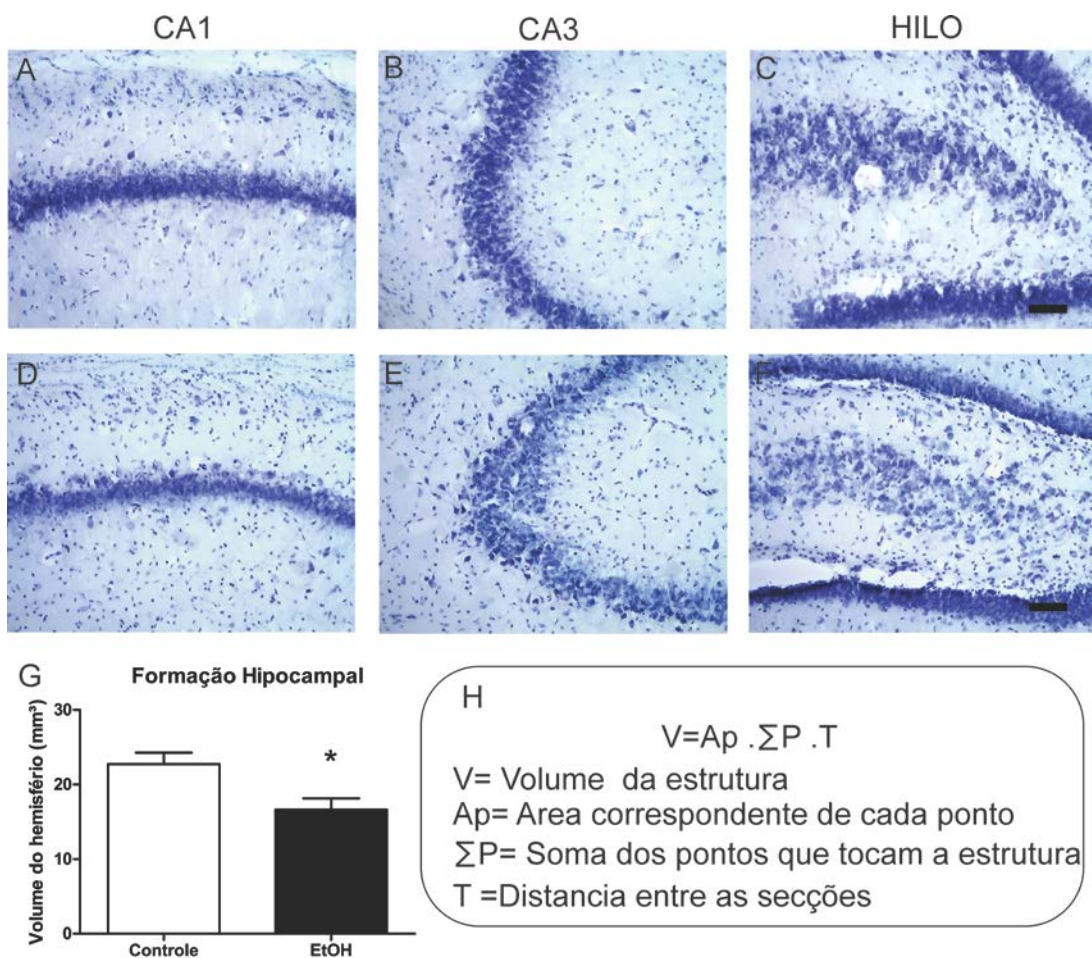


Fig. 5 – Análise histológica de formação hipocampal com coloração com violeta de cresila. CA1, CA3 e hilo de animais controle, que receberam solução salina (A-C), Animais expostos ao EtOH, regiões CA1, CA3 e hilo (D-F); Gráfico representativo de volume hipocampal (G); Fórmula do Princípio de Cavalieri (H). Escala de 200 μ m.

3.2 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETOH INDUZ PERDA DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS

Imunoistoquímica para corpos neuronais verificou que o EtOH induziu perda neuronal em todas as regiões da formação hipocampal, sendo estatisticamente significativa em CA1 (EtOH: $23,7 \pm 1,27$; Controle: $31,05 \pm 1,73$; $p= 0.0031$) e hilo hipocampal (EtOH: $23,72 \pm 2,08$; Controle: $33,11 \pm 1,82$; $p= 0.0033$), mas não em CA3 (EtOH: $26,08 \pm 1,02$; Controle: $28,5 \pm 1,87$) ($p=0.2735$) (Figura 6).

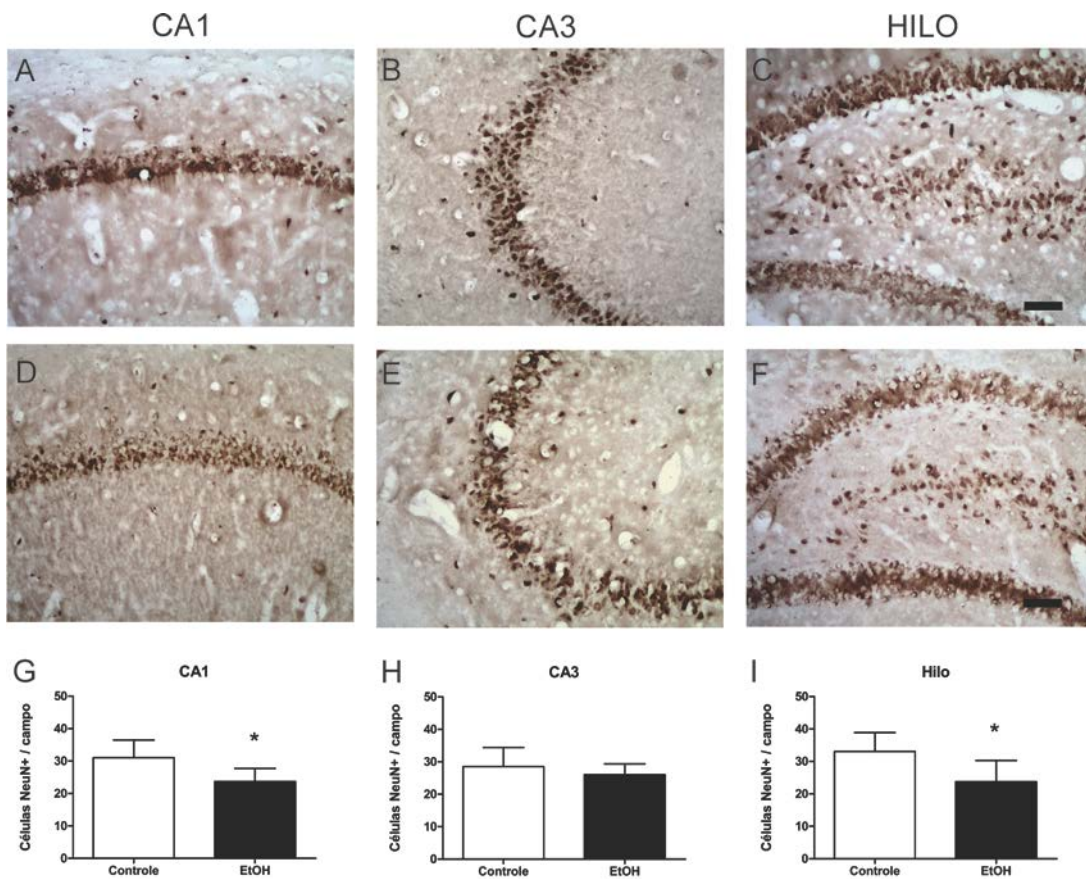


Fig. 6 – Análise imunohistoquímica para Neu-N na formação hipocampal. CA1, CA3 e hilo de animais controle, que receberam solução salina em aumento de 10x (A-F). Animais expostos ao EtOH, regiões CA1, CA3 e hilo em aumento de 10x (D-F); Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células Neu-N+ em CA1 (G); CA3 (H) E Hilo (I). Escala de 200 μ m.

3.3 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETOH INDUZ ATIVAÇÃO E REDUÇÃO DA POPULAÇÃO MICROGLIAL

A análise da ativação microglial, realizada através de imunistoquímica para Iba1, sugere aparente ativação destas células em animais tratados com EtOH entretanto, com sugestiva diminuição da população microglial em geral (Figura 7), conforme pode ser avaliado através da avaliação quantitativa, verificando que o grupo exposto ao EtOH apresentou diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo controle em CA1 (EtOH: $1,05 \pm 0,05$; Controle: $9,27 \pm 0,75$; $p=0.0001$), CA3 (EtOH: $1,00 \pm 0,0$; Controle: $6,9 \pm 0,71$; $p=0.0001$) e Hilo hipocampal (EtOH: $1,00 \pm 0,0$; Controle: $14,93 \pm 0,078$; $p=0.0001$). Tais dados podem ser visualizados no gráfico e nas imagens a seguir:

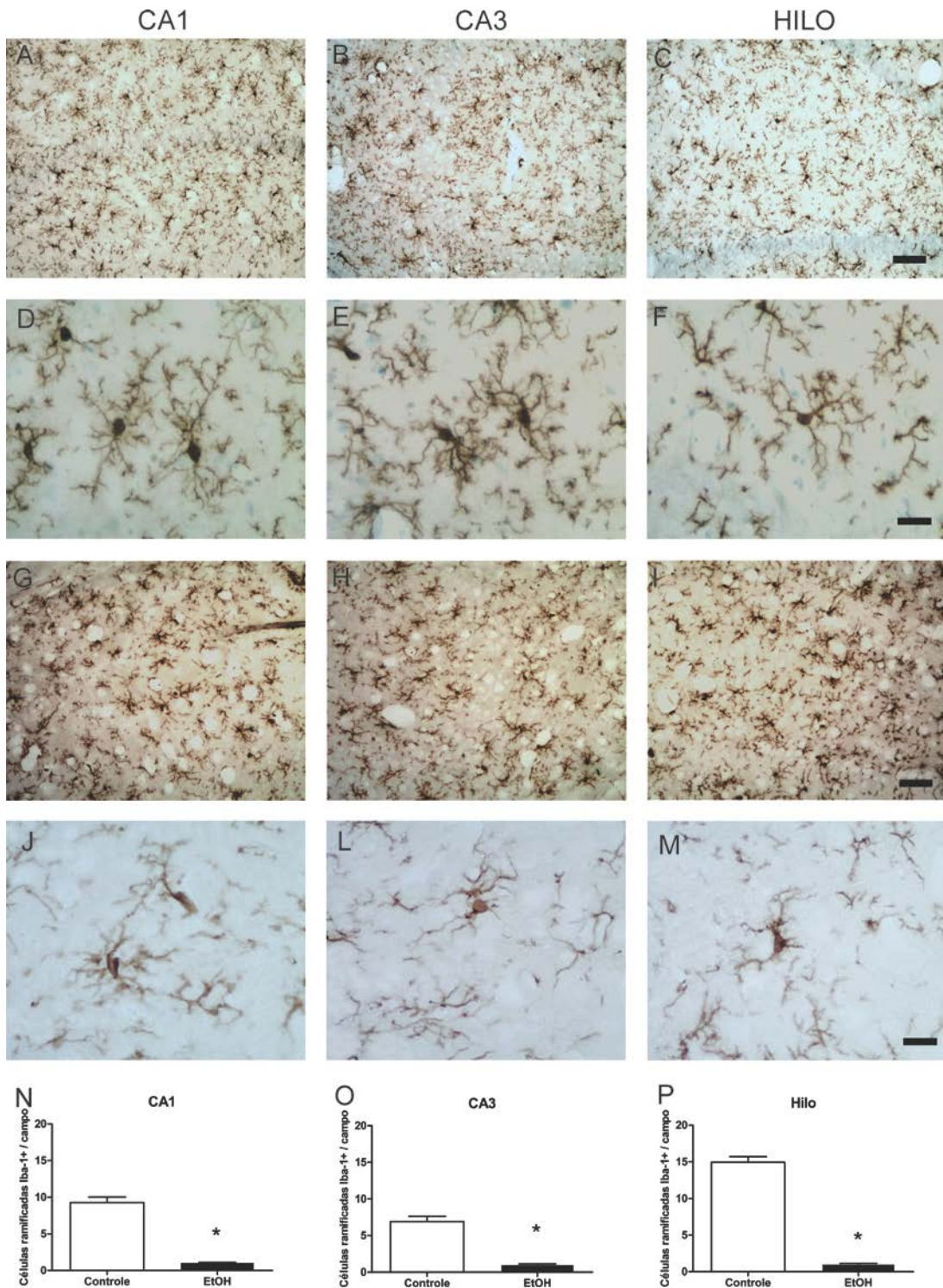


Fig. 7 – Análise imunohistoquímica para Iba1 na formação hipocampal. CA1, CA3 e hilo de animais controle, que receberam solução salina em aumento de 10x (A-C) e em aumento de 40x (D-F). Animais expostos ao EtOH, regiões CA1, CA3 e hilo em aumento de 10x (G-I) e em aumento de 40x (J-L); Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células Iba1+ em CA1 (M); CA3 (N) E Hilo (O). Escala de 200 μm em A, B, C, G, H, I. Escala de 100 μm em D, E, F, J, L, M.

3.4 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETOH REDUZ POPULAÇÃO DE ASTRÓCITOS

A ativação astrocitária, avaliada pela imunistoquímica para GFAP, identificou pequena astrocitose em animais expostos ao EtOH, em relação ao grupo controle (Figura 8). De acordo com a avaliação quantitativa, verificou-se diferença significativa em CA3 (EtOH: $17,27 \pm 0,82$; Controle: $20,73 \pm 1,27$; $p=0.0032$) e hilo hipocampal (EtOH: $30,60 \pm 2,58$; Cont.: $42,56 \pm 1,26$; $p=0.0053$). Em CA1, não houve redução (EtOH: $20,73 \pm 1,45$; Controle: $22,53 \pm 0,87$; $p= 0.3723$). As imagens a seguir expressam tais resultados.

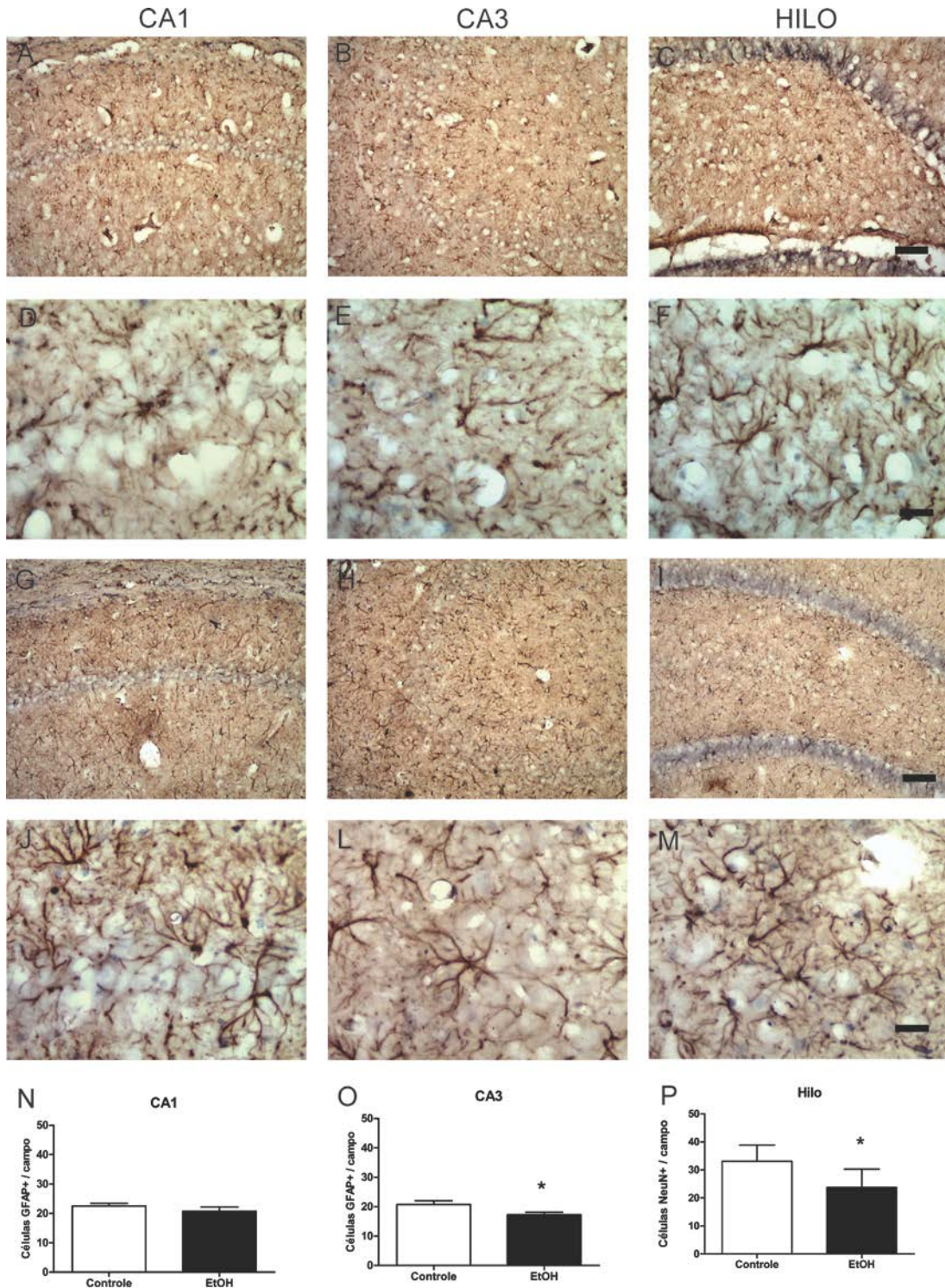


Fig. 8 – Análise imunohistoquímica para GFAP na formação hipocampal. CA1, CA3 e hilo de animais controle, que receberam solução salina em aumento de 10x (A-C) e em aumento de 40x (D-F). Animais expostos ao EtOH, regiões CA1, CA3 e hilo em aumento de 10x (G-I) e em aumento de 40x (J-L); Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células GFAP+ em CA1 (M); CA3 (N) E Hilo (O). Escala de 200 μ m em A, B, C, G, H, I. Escala de 100 μ m em D, E, F, J, L, M.

4. DISCUSSÃO

4.1 Considerações sobre o modelo experimental

Encontramos na literatura variadas abordagens de exposição ao EtOH, variando de doses simples e agudas até exposição crônica em fases específicas do desenvolvimento. McClain e colaboradores (2011), propuseram uma escala de exposição de apenas 5 dias, com 3 doses por dia, objetivando afirmar que um episódio simples de “bebedeira” durante a fase de adolescência é suficiente para promover alterações permanentes em células gliais. Pawlak e colaboradores (2002) adotaram uma escala de 14 dias de exposição, investigando se a perda neuronal induzida por EtOH é compensada pela ação neurogênica da zona subgranular. Além dessas, várias outras investigações focaram os efeitos do EtOH na adolescência ou na fase adulta isoladamente, com dosagens e concentrações diversas. Entretanto, são raras as pesquisas que estudam a exposição contínua, iniciando na fase púbere e permanecendo até a idade adulta, refletindo o comportamento humano em nossa sociedade, em que a ingestão do álcool inicia cada dia mais cedo, sem interrupção. Assim sendo, esta pesquisa inova ao avaliar o efeito do EtOH em uma ampla janela de exposição, com uma dosagem alta.

4.2 Cálculo de Volume

Para a avaliação do volume hipocampal, utilizamos secções coradas por violeta cresila, por suas características ideais que favorecem a identificação dos limites da formação hipocampal.

Esta metodologia, uma das mais simples dentro da gama de procedimentos estereológicos, envolve a medida de áreas em um conjunto sistemático de secções de determinado objeto (BONTHIUS et al, 2004).

No presente estudo, verificou-se redução no volume hipocampal em animais expostos a EtOH da adolescência à fase adulta, dado que encontra afirmação em diversos trabalhos realizados em modelos experimentais e clínicos.

Semelhante aos nossos achados, avaliação no volume hipocampal de pessoas com início de consumo precoce ou tardio foi realizada em 2013, por Ozsoy e colaboradores, que verificaram, através de ressonância magnética, uma redução significativa do hipocampo de pacientes alcoólatras em geral, em relação ao grupo

controle. Além disso, há redução de volume na formação hipocampal de pessoas que começaram a consumir EtOH mais precocemente (antes dos 20 anos), quando comparado com os pacientes com início tardio de ingestão (após os 20 anos de idade).

4.3 Perda Neuronal após exposição crônica ao EtOH

Nesta investigação, o anti-NEU-N revelou perda neuronal estatisticamente significativa em CA1 e hilo, mas não em CA3 nos animais expostos ao EtOH em relação ao grupo controle.

A população neuronal da formação hipocampal é composta principalmente por células piramidais. Em pesquisa com cultura organotípica de hipocampo, submetida a exposição crônica (10 dias) ao EtOH, foi possível observar perda neuronal consistente em todos os subcampos da formação hipocampal, provavelmente decorrente da associação de dois fatores: um discreto aumento da morte celular e uma notória redução da reposição dessas células em virtude da diminuição da neurogênese e gliogênese (CREWS et al, 2004).

Ratos expostos a EtOH durante os 3 primeiros semestres ou apenas no 3º trimestre (correspondente) de vida apresentam significativa redução no número total de células piramidais em CA1, quando comparados com o grupo controle. Em CA3, porém, não foi observada diferença significativa entre os grupos (TRAN et al, 2003), dados observados também no presente trabalho. Entretanto, a redução do número de células piramidais em CA1, mas não em CA3 apontam para a existência de algum outro fator determinante para a influência seletiva da morte celular, provavelmente envolvendo mudanças na neurotransmissão GABAérgica induzida pelo EtOH (BONTHIUS et al, 2001).

Os resultados do estudo de TRAN et al (2003) sugerem que neurônios em diferenciação são mais vulneráveis aos impactos do EtOH do que os neurônios em proliferação. Para fins de comparação, enquanto Tran e colaboradores não encontraram diminuição significativa em giro denteado, ressalta-se que, nesta pesquisa, foi avaliada apenas o hilo hipocampal, camada de células polimórficas do giro denteado, o que pode justificar tais dados, considerando a exclusão, durante a

contagem, das células recém-formadas que migram continuamente para a camada granular.

4.4 Redução da população de microglias Iba1+

Nesta investigação, foi encontrada uma diminuição estatisticamente significativa de micróglias ramificadas, indicando ativação, em todas as áreas investigadas.

A micróglia é a célula efetora primária do sistema imune do cérebro que, em resposta a danos ou lesões, torna-se ativada, sob mudanças fisiológicas bem como transformações funcionais (NIMMERJAHN et al, 2005). Sob condições fisiológicas, estas células são altamente ramificadas, movendo suas ramificações de forma dinâmica em várias direções, realizando uma “varredura” do microambiente em busca de alterações na integridade tecidual (DAVALOS et al, 2005; NIMMERJAHN et al, 2005; GOMES-LEAL, 2012).

Um vez que detectam lesões, estas células sofrem uma ativação e passam por uma mudança morfológica, produção de citocinas e auto-regulação de receptores de superfície (STREIT E XUE, 2009; McCLAIN et al, 2011). A ativação microglial envolve uma mudança de sua morfologia ramificada para um estado intermediário e forma amebóide, culminando com uma morfologia arredondada, semelhante a um fagócito (THORED et al, 2009).

Os efeitos exatos do EtOH sobre a micróglia ainda não estão totalmente estabelecidos, havendo evidências de aumento de expressão de marcadores microgliais específicos em cérebros post-mortem de alcoólicos crônicos, indicando reação microglial (HE e CREWS, 2008). Estudos indicam também expressão microglial em modelos de roedores *in vivo* (CREWS et al 2006, WARD et al, 2009).

Embora trate-se de uma intoxicação aguda, um interessante modelo de exposição breve em ratos na fase púbera, com doses diárias a cada 8 horas durante 4 dias, permitiu observar que o EtOH induz proliferação microglial em todas as regiões da formação hipocampal. Além disso, células microgliais Iba-1+ foram encontradas por toda a formação hipocampal, apresentando diferenças morfológicas entre o grupo EtOH e o grupo controle. Este trabalho avaliou também se tal padrão de ativação permaneceria durante a fase adulta, verificando-se que, embora a exposição ao EtOH ocorra durante a adolescência em um episódio único e breve, a

ativação microglial dela decorrente é mantida até a idade adulta (McCLAIN et al, 2011).

Nosso estudo constatou uma diminuição na proliferação microglial, bem como na ativação destas células, o que, sugere-se, decorre de uma possível adaptação destas células à exposição crônica. Entretanto, maiores explicações acerca dos mecanismos subjacentes à esta resposta necessitam ser explorados e definidos.

Ratificando nossa teoria, em dose de 2g/kg de EtOH, Ward e colaboradores (2009) observaram significativa ativação microglial, especialmente em giro denteado. Em dosagem maior (3g/Kg), entretanto, essa ativação, embora ocorra, é menor que na dosagem de 2g/Kg, o que sugere certo grau de adaptação a altas doses de EtOH.

4.5 EXPRESSÃO DE GFAP

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é um filamento de proteína intermediário expresso principalmente em astrócitos, para o qual constitui um marcador específico (GONZALEZ et al, 2007).

No cérebro, os astrócitos representam a maior população celular e exercem um papel fundamental no desenvolvimento e orientação da migração celular, na nutrição de neurônios (EYSSERIC et al, 2000), captação de neurotransmissores (KIMELBERG e KATZ, 1985) e síntese e secreção de fatores tróficos (FURUKAWA et al, 1986). Embora exerça esse papel positivo e neuroprotetor em lesões do SNC, indução anormal de GFAP (sinalizando ativação astrocitária e neurodegeneração durante gliose) é considerada nociva para a regeneração do SNC, pois constituem uma barreira mecânica aos contatos e circuitos neurais, inibindo o crescimento axonal (ANDERSON et al, 2003; GONZALEZ, 2007). Além disso, astrócitos reativos produzem várias substâncias neurotóxicas em patologias cerebrais.

Astrócitos tem sido indicados como a célula com maior localização de metabolismo de EtOH dentro do cérebro, sendo considerado um protetor neuronal em relação ao estresse oxidativo induzido pelo EtOH (WATTS et al, 2005).

Em cultura de astrócitos hipocâmpais na presença de EtOH, observou-se um aumento na secreção de glutamato de forma dose-dependente. O glutamato é implicado na comunicação celular entre neurônios e astrócitos, estando relacionado à excitotoxicidade causada pelo EtOH (SALAZAR et al, 2008).

Neste estudo, o grupo exposto ao EtOH apresentou diminuição estatisticamente significativa de astrócitos em CA3 e hilo, mas não em CA1. Essa discrepância de resultados não encontra precedentes na literatura.

5. CONCLUSÕES

Exposição crônica a EtOH, iniciando na adolescência e perdurando até a fase adulta promove alterações volumétricas e teciduais na formação hipocampal de ratos. Foi possível aferir uma alteração nas camadas do hipocampo e da camada de células polimórficas (hilo) do giro denteado, além de diminuição do volume hipocampal. Observou-se também perda neuronal em todas as regiões analisadas, especialmente em CA1 e hilo hipocampal. Diminuição da ativação e proliferação microglial também pode ser encontrada em ratos expostos ao EtOH. Ao contrário de neurônios, astrócitos, embora tenham reduzido em todas as áreas investigadas, não teve redução significativa em CA1. Estes resultados são relevantes para o esclarecimento dos efeitos da ingestão de longo prazo do álcool, considerando o grave problema de saúde pública constituído por essa ingestão, facilitando na elaboração de argumentos científicos que possam desestimular o consumo abusivo do EtOH, especialmente em relação à população de adolescentes, os quais envolvem-se cada dia mais precocemente nesta deletéria prática.

REFERÊNCIAS

ABOU-AGAG, L. H.; KHOO, N. K.; BINSACK, R.; WHITE, C. R.; DARLEY-USMAR, V.; GRENETT, H. E.; BOOYSE, F. M.; DIGERNESS, S. B.; ZHOU, F. e PARKS, D. A. Evidence of cardiovascular protection by moderate alcohol: role of nitric oxide. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 4, p. 540-548, 2005.

ALFONSO-LOECHES, S.; PASCUAL-LUCAS, M.; BLANCO, A. M.; SANCHEZ-VERA, I. e GUERRI, C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. **J Neurosci**, v. 30, n. 24, p. 8285-8295, 2010.

ALIJANPOUR, S.; REZAYOF, A. e ZARRINDAST, M. R. Dorsal hippocampal cannabinoid CB1 receptors mediate the interactive effects of nicotine and ethanol on passive avoidance learning in mice. **Addict Biol**, 2011.

ANDERSEN, P.; MORRIS, R.; AMARAL, D.; BLISS, T. e O'KEEFE, J. The Hippocampus Book. ed., **Oxford University Press**, USA, 2007.

ANDERSON, M. F.; BLOMSTRAND, F.; BLOMSTRAND, C.; ERIKSSON, P. S. e NILSSON, M. Astrocytes and stroke: networking for survival? **Neurochem Res**, v. 28, n. 2, p. 293-305, 2003.

BASAVARAJAPPA, B. S.; NINAN, I. e ARANCIO, O. Acute ethanol suppresses glutamatergic neurotransmission through endocannabinoids in hippocampal neurons. **J Neurochem**, v. 107, n. 4, p. 1001-1013, 2008.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L. e HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2007.

BONTHIUS, D. J.; MCKIM, R.; KOELE, L.; HARB, H.; KARACAY, B.; MAHONEY, J. e PANTAZIS, N. J. Use of frozen sections to determine neuronal number in the murine hippocampus and neocortex using the optical disector and optical fractionator. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 14, n. 1, p. 45-57, 2004.

BONTHIUS, D. J.; WOODHOUSE, J.; BONTHIUS, N. E.; TAGGARD, D. A. e LOTHMAN, E. W. Reduced seizure threshold and hippocampal cell loss in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 1, p. 70-82, 2001.

BRANDÃO, Eliana Maria Domingues. **Esclerose mesial temporal em crianças**. São Paulo, 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BUCKMASTER, P. S. Mossy cell dendritic structure quantified and compared with other hippocampal neurons labeled in rats in vivo. **Epilepsia**, v. 53 Suppl 1, n. p. 9-17, 2012.

BUFFO, A.; ROLANDO, C. e CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 2, p. 77-89, 2010.

CAGETTI, E.; LIANG, J.; SPIGELMAN, I. e OLSEN, R. W. Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors. **Mol Pharmacol**, v. 63, n. 1, p. 53-64, 2003.

CARVALHO, V.; PINSKY, I.; DE SOUZA E SILVA, R. e CARLINI-COTRIM, B. Drug and alcohol use and family characteristics: a study among Brazilian high-school students. **Addiction**, v. 90, n. 1, p. 65-72, 1995.

CHEFER, V.; MEIS, J.; WANG, G.; KUZMIN, A.; BAKALKIN, G. e SHIPPENBERG, T. Repeated exposure to moderate doses of ethanol augments hippocampal glutamate neurotransmission by increasing release. **Addict Biol**, v. 16, n. 2, p. 229-237, 2011.

CHIN, V. S.; VAN SKIKE, C. E. e MATTHEWS, D. B. Effects of ethanol on hippocampal function during adolescence: a look at the past and thoughts on the future. **Alcohol**, v. 44, n. 1, p. 3-14, 2010.

CHIN, V. S.; VAN SKIKE, C. E.; BERRY, R. B.; KIRK, R. E.; DIAZ-GRANADOS, J. e MATTHEWS, D. B. Effect of acute ethanol and acute allopregnanolone on spatial memory in adolescent and adult rats. **Alcohol**, v. 45, n. 5, p. 473-483, 2011.

CLARK, R. E.; BROADBENT, N. J. e SQUIRE, L. R. Hippocampus and remote spatial memory in rats. **Hippocampus**, v. 15, n. 2, p. 260-272, 2005.

CLAYTON, N. S.; GRIFFITHS, D. P.; EMERY, N. J. e DICKINSON, A. Elements of episodic-like memory in animals. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 356, n. 1413, p. 1483-1491, 2001.

CORNWELL, B. R.; JOHNSON, L. L.; HOLROYD, T.; CARVER, F. W. e GRILLON, C. Human hippocampal and parahippocampal theta during goal-directed spatial

navigation predicts performance on a virtual Morris water maze. **J Neurosci**, v. 28, n. 23, p. 5983-5990, 2008.

CREWS, F. T. e NIXON, K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. **Alcohol Alcohol**, v. 44, n. 2, p. 115-127, 2009.

CREWS, F. T.; BRAUN, C. J.; HOPLIGHT, B.; SWITZER, R. C., 3RD e KNAPP, D. J. Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 24, n. 11, p. 1712-1723, 2000.

CREWS, F. T.; COLLINS, M. A.; DLUGOS, C.; LITTLETON, J.; WILKINS, L.; NEAFSEY, E. J.; PENTNEY, R.; SNELL, L. D.; TABAKOFF, B.; ZOU, J. e NORONHA, A. Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? **Alcohol Clin Exp Res**, v. 28, n. 2, p. 350-364, 2004.

CREWS, F. T.; MDZINARISHVILI, A.; KIM, D.; HE, J. e NIXON, K. Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. **Neuroscience**, v. 137, n. 2, p. 437-445, 2006.

CUSHMAN, J. D.; MOORE, M. D.; JACOBS, N. S.; OLSEN, R. W. e FANSELOW, M. S. Behavioral pharmacogenetic analysis on the role of the alpha4 GABA(A) receptor subunit in the ethanol-mediated impairment of hippocampus-dependent contextual learning. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 11, p. 1948-1959, 2011.

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M. L. e GAN, W. B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 752-758, 2005.

DE BELLIS, M. D.; CLARK, D. B.; BEERS, S. R.; SOLOFF, P. H.; BORING, A. M.; HALL, J.; KERSH, A. e KESHAVAN, M. S. Hippocampal volume in adolescent-onset alcohol use disorders. **Am J Psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 737-744, 2000.

DINIZ, L. P.; ALMEIDA, J. C.; TORTELLI, V.; LOPES, C. V.; SETTI-PERDIGAO, P.; STIPURSKY, J.; KAHN, S. A.; ROMAO, L. F.; DE MIRANDA, J.; ALVES-LEON, S. V.; DE SOUZA, J. M.; CASTRO, N. G.; PANIZZUTTI, R. e GOMES, F. C. Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor beta signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. **J Biol Chem**, 2012.

DOREMUS-FITZWATER, T. L.; VARLINSKAYA, E. I. e SPEAR, L. P. Motivational systems in adolescence: possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. **Brain Cogn**, v. 72, n. 1, p. 114-123, 2010.

DOUGHERTY, D. M.; MARSH, D. M.; MOELLER, F. G.; CHOKSHI, R. V. e ROSEN, V. C. Effects of moderate and high doses of alcohol on attention, impulsivity, discriminability, and response bias in immediate and delayed memory task performance. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 24, n. 11, p. 1702-1711, 2000.

EGO-STENGEL, V. e WILSON, M. A. Spatial selectivity and theta phase precession in CA1 interneurons. **Hippocampus**, v. 17, n. 2, p. 161-174, 2007.

ELIBOL-CAN, B.; JAKUBOWSKA-DOGRU, E.; SEVERCAN, M. e SEVERCAN, F. The effects of short-term chronic ethanol intoxication and ethanol withdrawal on the molecular composition of the rat hippocampus by FT-IR spectroscopy. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 11, p. 2050-2062, 2011.

ELLIOTT, E. J. e BOWER, C. Alcohol and pregnancy: the pivotal role of the obstetrician. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 48, n. 3, p. 236-239, 2008.

ENDE, G.; WALTER, S.; WELZEL, H.; DEMIRAKCA, T.; WOKRINA, T.; RUF, M.; ULRICH, M.; DIEHL, A.; HENN, F. A. e MANN, K. Alcohol consumption significantly influences the MR signal of frontal choline-containing compounds. **Neuroimage**, v. 32, n. 2, p. 740-746, 2006.

EYSSERIC, H.; GONTHIER, B.; SOUBEYRAN, A.; RICHARD, M. J.; DAVELOOSE, D. e BARRET, L. Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. **Alcohol**, v. 21, n. 2, p. 117-125, 2000.

EZZYAT, Y. e OLSON, I. R. The medial temporal lobe and visual working memory: comparisons across tasks, delays, and visual similarity. **Cogn Affect Behav Neurosci**, v. 8, n. 1, p. 32-40, 2008.

FLEMING, M.; MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. Etanol. In: BRUNTOM, L.L. LAZO, J.S. PARKER K.L. **Goodman & Gilman**. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. Ed. Rio de Janeiro; McGraw-Hill, 2006.

FLEMING, R. L.; WILSON, W. A. e SWARTZWELDER, H. S. Magnitude and ethanol sensitivity of tonic GABAA receptor-mediated inhibition in dentate gyrus changes from adolescence to adulthood. **J Neurophysiol**, v. 97, n. 5, p. 3806-3811, 2007.

FRANKE, H. Influence of chronic alcohol treatment on the GFAP-immunoreactivity in astrocytes of the hippocampus in rats. **Acta Histochem**, v. 97, n. 3, p. 263-271, 1995.

FURUKAWA, S.; FURUKAWA, Y.; SATOYOSHI, E. e HAYASHI, K. Synthesis and secretion of nerve growth factor by mouse astroglial cells in culture. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 136, n. 1, p. 57-63, 1986.

GKALIAGKOUSI, E. e FERRO, A. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. **Front Biosci**, v. 16, 1873-1897, 2011.

GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? **Brain Behav**, v. 2, n. 3, p. 345-356, 2012.

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

GONZALEZ, A.; PARIENTE, J. A. e SALIDO, G. M. Ethanol stimulates ROS generation by mitochondria through Ca²⁺ mobilization and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes. **Brain Res**, v. 1178, 28-37, 2007.

GORDIS, E. Contributions of behavioral science to alcohol research: understanding who is at risk and why. **Exp Clin Psychopharmacol**, v. 8, n. 3, p. 264-270, 2000.

GUNDERSEN, H. J.; BAGGER, P.; BENDTSEN, T. F.; EVANS, S. M.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B. e ET AL. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, n. 10, p. 857-881, 1988.

HAES, T.M.; CLÉ, D.V.; NUNES, T.F.; RORIZ-FILHO, J.S.; MORIGUTI, J.C. Álcool e sistema nervoso central. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2010;43(2): 153-63.

HANSEN-KRONE, I. J.; BRAEKKAN, S. K.; ENGA, K. F.; WILSGAARD, T. e HANSEN, J. B. Alcohol consumption, types of alcoholic beverages and risk of venous thromboembolism - the Tromso Study. **Thromb Haemost**, v. 106, n. 2, p. 272-278, 2011.

HARDING, A.; HALLIDAY, G.; CAINE, D. e KRIL, J. Degeneration of anterior thalamic nuclei differentiates alcoholics with amnesia. **Brain**, v. 123 (Pt 1), p. 141-154, 2000.

HARDINGHAM, G. E. e BADING, H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 2, p. 81-89, 2003.

HARPER, C. e MATSUMOTO, I. Ethanol and brain damage. **Curr Opin Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 73-78, 2005.

HARPER, C. G. e BLUMBERGS, P. C. Brain weights in alcoholics. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 45, n. 9, p. 838-840, 1982.

HARPER, C. The neurotoxicity of alcohol. **Hum Exp Toxicol**, v. 26, n. 3, p. 251-257, 2007.

HE, J. e CREWS, F. T. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. **Exp Neurol**, v. 210, n. 2, p. 349-358, 2008.

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

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R.; ROSSATO, J. I.; DA SILVA, W. C.; BONINI, J.; MEDINA, J. H. e CAMMAROTA, M. The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. **Neurotox Res**, v. 14, n. 2-3, p. 273-294, 2008.

JONAS, H. A.; DOBSON, A. J. e BROWN, W. J. Patterns of alcohol consumption in young Australian women: socio-demographic factors, health-related behaviours and physical health. **Aust N Z J Public Health**, v. 24, n. 2, p. 185-191, 2000.

KELM, M. K.; CRISWELL, H. E. e BREESE, G. R. Calcium release from presynaptic internal stores is required for ethanol to increase spontaneous gamma-aminobutyric acid release onto cerebellum Purkinje neurons. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 323, n. 1, p. 356-364, 2007.

KHALSA, J. H.; TREISMAN, G.; MCCANCE-KATZ, E. e TEDALDI, E. Medical consequences of drug abuse and co-occurring infections: research at the National Institute on Drug Abuse. **Subst Abus**, v. 29, n. 3, p. 5-16, 2008.

KIMELBERG, H. K. e KATZ, D. M. High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. **Science**, v. 228, n. 4701, p. 889-891, 1985.

KISHIMOTO, R.; OGISHI, Y.; UEDA, M.; MATSUSAKI, M.; AMAKO, K.; GODA, K. e PARK, S. S. Gender-related differences in mouse hepatic ethanol metabolism. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 48, n. 3, p. 216-224, 2002.

KLEINHENZ, D. J.; SUTLIFF, R. L.; POLIKANDRIOTIS, J. A.; WALP, E. R.; DIKALOV, S. I.; GUIDOT, D. M. e HART, C. M. Chronic ethanol ingestion increases aortic endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in the rat. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 1, p. 148-154, 2008.

KUBOTA, M.; NAKAZAKI, S.; HIRAI, S.; SAEKI, N.; YAMAURA, A. e KUSAKA, T. Alcohol consumption and frontal lobe shrinkage: study of 1432 non-alcoholic subjects. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 71, n. 1, p. 104-106, 2001.

KUMAR, S.; PORCU, P.; WERNER, D. F.; MATTHEWS, D. B.; DIAZ-GRANADOS, J. L.; HELFAND, R. S. e MORROW, A. L. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 205, n. 4, p. 529-564, 2009.

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

LENT, R. **CEM BILHÕES DE NEURÔNIOS**. Conceitos fundamentais de Neurociência. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

LIANG, J.; CAGETTI, E.; OLSEN, R. W. e SPIGELMAN, I. Altered pharmacology of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors on CA1 hippocampal neurons is consistent with subunit changes in a model of alcohol withdrawal and dependence. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 310, n. 3, p. 1234-1245, 2004.

LITTLE, P. J.; KUHN, C. M.; WILSON, W. A. e SWARTZWELDER, H. S. Differential effects of ethanol in adolescent and adult rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20, n. 8, p. 1346-1351, 1996.

MACIEL, C. e KERR-CORREA, F. [Psychiatric complications of alcoholism: alcohol withdrawal syndrome and other psychiatric disorders]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26 Suppl 1, n. p. S47-50, 2004.

MAIER, D.M.; POHORECKY, L.A. [The effect of ethanol treatment on social behavior in male rats]. **Aggress Behav** 13:259–265. 2006.

MAIER, S. E. e WEST, J. R. Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. **Alcohol**, v. 23, n. 1, p. 49-57, 2001.

MANGAN, P. S.; SUN, C.; CARPENTER, M.; GOODKIN, H. P.; SIEGHART, W. e KAPUR, J. Cultured Hippocampal Pyramidal Neurons Express Two Kinds of GABAA Receptors. **Mol Pharmacol**, v. 67, n. 3, p. 775-788, 2005.

MARUTHA RAVINDRAN, C.R.; MEHTA, A.K.; TICKU, M.K. Effect of long-term administration of ethanol on the regulation of the α -subunit of GABAA receptors in the rat brain. **Brain Res** 1174:47–52. 2007.

MASTERS, Susan B. Os alcoóis. In.: KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia: básica & clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro; Guanabara-Koogan, 2006. P. 309-318.

McCLAIN, J. A.; HAYES, D. M.; MORRIS, S. A. e NIXON, K. Adolescent binge alcohol exposure alters hippocampal progenitor cell proliferation in rats: effects on cell cycle kinetics. **J Comp Neurol**, v. 519, n. 13, p. 2697-2710, 2011.

McGAUGH, J. L.; CAHILL, L. e ROOZENDAAL, B. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 24, p. 13508-13514, 1996.

MIKI, T.; KUMA, H.; YOKOYAMA, T.; SUMITANI, K.; MATSUMOTO, Y.; KUSAKA, T.; WARITA, K.; WANG, Z. Y.; HOSOMI, N.; IMAGAWA, T.; K, S. B.; ITOH, S.; NAKAMURA, Y. e TAKEUCHI, Y. Early postnatal ethanol exposure induces fluctuation in the expression of BDNF mRNA in the developing rat hippocampus. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 68, n. 4, p. 484-493, 2008.

MORRIS, S. A.; EAVES, D. W.; SMITH, A. R. e NIXON, K. Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. **Hippocampus**, v. 20, n. 5, p. 596-607, 2010.

MUKAMAL, K. J.; KULLER, L. H.; FITZPATRICK, A. L.; LONGSTRETH, W. T., JR.; MITTLEMAN, M. A. e SISCOVICK, D. S. Prospective study of alcohol consumption and risk of dementia in older adults. **JAMA**, v. 289, n. 11, p. 1405-1413, 2003.

MUKAMAL, K. J.; MACLURE, M.; MULLER, J. E. e MITTLEMAN, M. A. Binge drinking and mortality after acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 112, n. 25, p. 3839-3845, 2005.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R. e SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201-211, 1992.

NAGEL, B. J.; SCHWEINSBURG, A. D.; PHAN, V. e TAPERT, S. F. Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity. **Psychiatry Res**, v. 139, n. 3, p. 181-190, 2005.

NICHOLS, E. A.; KAO, Y. C.; VERFAELLIE, M. e GABRIELI, J. D. Working memory and long-term memory for faces: Evidence from fMRI and global amnesia for involvement of the medial temporal lobes. **Hippocampus**, v. 16, n. 7, p. 604-616, 2006.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F. e HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, 2005.

NIXON, K. e CREWS, F. T. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurochem**, v. 83, n. 5, p. 1087-1093, 2002.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. e WILLNER, J. Tuning out irrelevancy? Comments on Solomon's temporal mapping view of the hippocampus. **Psychol Bull**, v. 86, n. 6, p. 1280-1289, 1979.

OLIVEIRA, Roseane Borner. **NEURODEGENERAÇÃO CRÔNICA EM MODELO MURINO: ENSAIOS COMPORTAMENTAIS E NEUROPATOLÓGICOS NA DOENÇA PRION NA FÊMEA ADULTA DO CAMUNDONDO DA VARIEDADE SUÍÇA ALBINA**. Belém, 2009. 176f. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará, Pará, 2009.

O'NEILL, J.; CARDENAS, V. A. e MEYERHOFF, D. J. Effects of abstinence on the brain: quantitative magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopic imaging in chronic alcohol abuse. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 11, p. 1673-1682, 2001.

PAHOR, M.; GURALNIK, J. M.; HAVLIK, R. J.; CARBONIN, P.; SALIVE, M. E.; FERRUCCI, L.; CORTI, M. C. e HENNEKENS, C. H. Alcohol consumption and risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in older persons. **J Am Geriatr Soc**, v. 44, n. 9, p. 1030-1037, 1996.

PAWLAK, R.; SKRZYPIEC, A.; SULKOWSKI, S. e BUCZKO, W. Ethanol-induced neurotoxicity is counterbalanced by increased cell proliferation in mouse dentate gyrus. **Neurosci Lett**, v. 327, n. 2, p. 83-86, 2002.

PENG, G. S.; YIN, J. H.; WANG, M. F.; LEE, J. T.; HSU, Y. D. e YIN, S. J. Alcohol sensitivity in Taiwanese men with different alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes. **J Formos Med Assoc**, v. 101, n. 11, p. 769-774, 2002.

PFEFFERBAUM, A.; ROTH, W. T. e FORD, J. M. Event-related potentials in the study of psychiatric disorders. **Arch Gen Psychiatry**, v. 52, n. 7, p. 559-563, 1995.

PIAN, J. P.; CRIADO, J. R. e EHLERS, C. L. Differential effects of acute alcohol on prepulse inhibition and event-related potentials in adolescent and adult Wistar rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 12, p. 2062-2073, 2008.

POMP, E. R.; ROSENDAAL, F. R. e DOGGEN, C. J. Alcohol consumption is associated with a decreased risk of venous thrombosis. **Thromb Haemost**, v. 99, n. 1, p. 59-63, 2008.

PRUETT, S. B.; FAN, R. e ZHENG, Q. Acute ethanol administration profoundly alters poly I:C-induced cytokine expression in mice by a mechanism that is not dependent on corticosterone. **Life Sci**, v. 72, n. 16, p. 1825-1839, 2003.

QIN, L.; HE, J.; HANES, R. N.; PLUZAREV, O.; HONG, J. S. e CREWS, F. T. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. **J Neuroinflammation**, v. 5, n. p. 10, 2008.

RANI, C.S.S.; TICKU, M.K. Comparison of chronic ethanol and chronic intermittent ethanol treatments on the expression of GABAA and NMDA receptor subunits. **Alcohol** 38, 89–97. 2006.

REDISH, A. D. The hippocampal debate: are we asking the right questions? **Behav Brain Res**, v. 127, n. 1-2, p. 81-98, 2001.

RISTUCCIA, R. C. e SPEAR, L. P. Autonomic responses to ethanol in adolescent and adult rats: a dose-response analysis. **Alcohol**, v. 42, n. 8, p. 623-629, 2008.

RONAI, A. Z.; GYIRES, K.; BARNA, I.; MULLNER, K.; REICHART, A. e PALKOVITS, M. Gyrus cinguli transection abolishes delta-opioid receptor-induced gastroprotection and alters alpha 2 adrenoceptor activity in the lower brainstem in rats. **Brain Res**, v. 947, n. 1, p. 90-99, 2002.

SALAZAR, M.; PARIENTE, J. A.; SALIDO, G. M. e GONZALEZ, A. Ethanol induces glutamate secretion by Ca²⁺ mobilization and ROS generation in rat hippocampal astrocytes. **Neurochem Int**, v. 52, n. 6, p. 1061-1067, 2008.

SANCHIS, C. e ARAGON, C. M. [What we drink when we drink? The role of the acetaldehyde in the alcohol consumption]. **Adicciones**, v. 19, n. 1, p. 5-11, 2007.

SATRIOTOMO, I.; MIKI, T.; ITOH, M.; AMENO, K.; IJIRI, I. e TAKEUCHI, Y. Short-term ethanol exposure alters calbindin D28k and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in hippocampus of mice. **Brain Res**, v. 879, n. 1-2, p. 55-64, 2000.

SCAIFE, J. C. e DUKA, T. Behavioural measures of frontal lobe function in a population of young social drinkers with binge drinking pattern. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 93, n. 3, p. 354-362, 2009.

SCHMID, M. G.; GROBUSCHEK, N.; PESSENHOFER, V.; KLOSTIUS, A. e GUBITZ, G. Enantioseparation of dipeptides by capillary electrochromatography on a teicoplanin aglycone chiral stationary phase. **J Chromatogr A**, v. 990, n. 1-2, p. 83-90, 2003.

SCHUCKIT, M. A. Alcohol-use disorders. **Lancet**, v. 373, n. 9662, p. 492-501, 2009.

SCHUMMERS, J. e BROWNING, M. D. Evidence for a role for GABA(A) and NMDA receptors in ethanol inhibition of long-term potentiation. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 94, n. 1-2, p. 9-14, 2001.

SCHWEINSBURG, A. D.; MCQUEENY, T.; NAGEL, B. J.; EYLER, L. T. e TAPERT, S. F. A preliminary study of functional magnetic resonance imaging response during verbal encoding among adolescent binge drinkers. **Alcohol**, v. 44, n. 1, p. 111-117, 2010.

SCORZA, C. A.; ARIDA, R. M.; CAVALHEIRO, E. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. e SCORZA, F. A. Expression of nestin in the hippocampal formation of rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. **Neurosci Res**, v. 51, n. 3, p. 285-291, 2005.

SHEN, Y.; LINDEMEYER, A. K.; SPIGELMAN, I.; SIEGHART, W.; OLSEN, R. W. e LIANG, J. Plasticity of GABAA receptors after ethanol pre-exposure in cultured hippocampal neurons. **Mol Pharmacol**, v. 79, n. 3, p. 432-442, 2011.

SILVA, A. F. J.; AGUIAR, M. S.; CARVALHO, O. S. J.; SANTANA, L. D.; FRANCO, E. C.; LIMA, R. R.; DE SIQUEIRA, N. V.; AUGUSTO FEIO, R.; FARO, L. R. e GOMES-LEAL, W. Hippocampal neuronal loss, decreased GFAP immunoreactivity and cognitive impairment following experimental intoxication of rats with aluminum citrate. **Brain Res**, 2012.

SILVERI, M. M. e SPEAR, L. P. Acute, rapid, and chronic tolerance during ontogeny: observations when equating ethanol perturbation across age. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 9, p. 1301-1308, 2001.

SINGH, A. K.; GUPTA, S.; JIANG, Y.; YOUNUS, M. e RAMZAN, M. In vitro neurogenesis from neural progenitor cells isolated from the hippocampus region of

the brain of adult rats exposed to ethanol during early development through their alcohol-drinking mothers. **Alcohol Alcohol**, v. 44, n. 2, p. 185-198, 2009.

SIRCAR, R.; BASAK, A. K. e SIRCAR, D. Repeated ethanol exposure affects the acquisition of spatial memory in adolescent female rats. **Behav Brain Res**, v. 202, n. 2, p. 225-231, 2009.

SPEAR, L. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. **Alcohol Res Health**, v. 24, n. 2, p. 115-123, 2000.

SPEAR, L. P. e VARLINSKAYA, E. I. Adolescence. Alcohol sensitivity, tolerance, and intake. **Recent Dev Alcohol**, v. 17, n. p. 143-159, 2005.

STREIT, W. J. e XUE, Q. S. Life and death of microglia. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 4, n. 4, p. 371-379, 2009.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). **Results From the 2008 National Survey on Drug Use and Health: National Findings**. Rockville, 2008.

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

SUSSWEIN, A. J.; KATZOFF, A.; MILLER, N. e HURWITZ, I. Nitric oxide and memory. **Neuroscientist**, v. 10, n. 2, p. 153-162, 2004.

SUYAMA, S.; TAKANO, E.; IWASAKI, Y.; NAKATA, M. e YADA, T. Roles and functional interplay of the gut, brain stem, hypothalamus and limbic system in regulation of feeding. **Nihon Rinsho**, v. 67, n. 2, p. 277-286, 2009.

TAPERT, S. F. e BROWN, S. A. Substance dependence, family history of alcohol dependence and neuropsychological functioning in adolescence. **Addiction**, v. 95, n. 7, p. 1043-1053, 2000.

TAPERT, S. F.; AARONS, G. A.; SEDLAR, G. R. e BROWN, S. A. Adolescent substance use and sexual risk-taking behavior. **J Adolesc Health**, v. 28, n. 3, p. 181-189, 2001.

THORED, P.; HELDMANN, U.; GOMES-LEAL, W.; GISLER, R.; DARSALIA, V.; TANEERA, J.; NYGREN, J. M.; JACOBSEN, S. E.; EKDAHL, C. T.; KOKAIA, Z. e LINDVALL, O. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype

concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. **Glia**, v. 57, n. 8, p. 835-849, 2009.

TRAN, T. D. e KELLY, S. J. Critical periods for ethanol-induced cell loss in the hippocampal formation. **Neurotoxicol Teratol**, v. 25, n. 5, p. 519-528, 2003.

TUNSTALL-PEDOE, H.; KUULASMAA, K.; MAHONEN, M.; TOLONEN, H.; RUOKOKOSKI, E. e AMOUYEL, P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1547-1557, 1999.

UHART, M. e WAND, G. S. Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research. **Addict Biol**, v. 14, n. 1, p. 43-64, 2009.

VILPOUX, C.; WARNAULT, V.; PIERREFICHE, O.; DAOUST, M. e NAASSILA, M. Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 33, n. 6, p. 945-969, 2009.

VONGVATCHARANON, U.; MUKEM, S.; UDOMUKSORN, W.; KUMARSIT, E. e VONGVATCHARANON, S. Alcohol administration during adulthood induces alterations of parvalbumin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in rat hippocampus and cingulate cortex. **Acta Histochem**, v. 112, n. 4, p. 392-401, 2010.

WALTER, H. J. e MESSING, R. O. Regulation of neuronal voltage-gated calcium channels by ethanol. **Neurochem Int**, v. 35, n. 2, p. 95-101, 1999.

WARD, R. J.; COLIVICCHI, M. A.; ALLEN, R.; SCHOL, F.; LALLEMAND, F.; DE WITTE, P.; BALLINI, C.; CORTE, L. D. e DEXTER, D. Neuro-inflammation induced in the hippocampus of 'binge drinking' rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. **J Neurochem**, v. 111, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

WATTS, L. T.; RATHINAM, M. L.; SCHENKER, S. e HENDERSON, G. I. Astrocytes protect neurons from ethanol-induced oxidative stress and apoptotic death. **J Neurosci Res**, v. 80, n. 5, p. 655-666, 2005.

WEITEMIER, A. Z. e RYABININ, A. E. Alcohol-induced memory impairment in trace fear conditioning: a hippocampus-specific effect. **Hippocampus**, v. 13, n. 3, p. 305-315, 2003.

WHITE, A. M. e SWARTZWELDER, H. S. Age-related effects of alcohol on memory and memory-related brain function in adolescents and adults. **Recent Dev Alcohol**, v. 17, n. p. 161-176, 2005.

WHITE, A. M.; BAE, J. G.; TRUESDALE, M. C.; AHMAD, S.; WILSON, W. A. e SWARTZWELDER, H. S. Chronic-intermittent ethanol exposure during adolescence prevents normal developmental changes in sensitivity to ethanol-induced motor impairments. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26, n. 7, p. 960-968, 2002.

YELNIK, J. Modeling the organization of the basal ganglia. **Rev Neurol (Paris)**, v. 164, n. 12, p. 969-976, 2008.

ZHUO, M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. **Mol Brain**, v. 2, n. p. 4, 2009.

ANEXO 1

**PARECER BIO043-12**

Projeto: Alterações do Sistema Nervoso Central, Sistema Reprodutor e Aparelho Estomatognático em Ratos Tratados Cronicamente com Etanol da Adolescência à Fase Adulto”

Coordenador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

Área Temática: Biologia

Vigência: 11/2011 a 11/2013

Nº no CEPAE-UFPA: BIO043-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 10 outubro de 2011



Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente CEPAE-UFPA