



UFSM

Dissertação de Mestrado

**EFEITO AGUDO E CRÔNICO DO ETANOL SOBRE AS
ENZIMAS NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE,
ACETILCOLINESTERASE, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E
COMPORTAMENTO EM RATOS**

Glaecir R. Mundstock Dias

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2004

**EFEITO AGUDO E CRÔNICO DO ETANOL SOBRE AS
ENZIMAS NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE,
ACETILCOLINESTERASE, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E
COMPORTAMENTO EM RATOS**

por

Glaecir R. Mundstock Dias

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2004

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO AGUDO E CRÔNICO DO ETANOL SOBRE AS
ENZIMAS NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE,
ACETILCOLINESTERASE, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E
COMPORTAMENTO EM RATOS**

elaborada por

Glaecir R. Mundstock Dias

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. Vera Maria Morsch
(Presidente/ Orientadora)

Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger
(Co-orientadora)

Dra. Ana Maria O. Battastini

Dra. Liliane Bauermann

Santa Maria, 15 de outubro de 2004.

***“Se você construir castelos no ar
não pense que seu trabalho está perdido,
eles estão aonde deveriam estar
agora só falta colocar as fundações
embaixo deles.”***

(Henry David Thoreau)

Dedico este trabalho a pessoas muito especiais em minha vida: ao meu amor, Haryan e ao nosso Haryan Júnior, como mais uma etapa que vencemos juntos...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, por fazer parte da minha vida e possibilitar meu crescimento pessoal e profissional;

Ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia/CCS, representado por todos Professores e Funcionários, onde encontrei apoio, amizade, carinho e compreensão para a realização deste trabalho;

À minha orientadora, Prof^a.Vera Maria Morsch, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, possibilitando e contribuindo em todos os momentos para o êxito deste trabalho;

À minha co-orientadora, Prof^a.Maria Rosa Chitolina Schetinger, por sua disposição em ajudar, sempre contribuindo para que o trabalho fosse realizado da melhor forma possível;

Aos Prof^o.Carlos Melo, Prof^o.João Rocha e a Prof^a.Maribel Rubin pela disponibilidade em ajudar;

À minha família, em especial à minha mãe Glaci, por me fazer acreditar desde cedo no estudo, no amor e na dedicação como formas de crescimento;

Aos meus sogros, Adevilda e Ari Dias, pelo apoio incondicional em tudo o que faço, amor, carinho e presença;

À Rosélia, Cíntia, Adriana e Simone, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos deste trabalho, apoio, amizade, carinho e longas conversas;

A todos amigos que conheci no Laboratório 2208, obrigado pela convivência, apoio, carinho e longas conversas, em especial ao apoio que recebi quando cheguei do Vinícius e ao apoio da Maria do Carmo na separação das plaquetas e doação de materiais;

A todos os integrantes dos Grupos do Prof^o.Carlos Melo, Prof^o. João Rocha, Prof^a.Maribel Rubin, Prof^a.Esther, Prof^a.Cristina, Prof^o.Gilson e Prof^a.Vânia que contribuíram para a realização dos experimentos deste trabalho, emprestando e dividindo reagentes e equipamentos;

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE ANEXOS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Objetivos.....	04
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1 Etanol.....	05
2.2 Farmacocinética do Etanol.....	06
2.2.1 Absorção.....	06
2.2.2 Distribuição.....	07
2.2.3 Biotransformação.....	07
2.2.4 Excreção.....	11
2.3 Plaquetas.....	11
2.4 Nucleotídeos.....	13
2.4.1 Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares.....	13
2.5 Enzimas NTDase e 5'-Nucleotidase.....	15

2.5.1 NTPDase (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD 39, E.C. 3.6.1.5).....	15
2.5.2 5'- Nucleotidase (CD 73, E.C. 3.1.3.5).....	17
2.6 Sistema Colinérgico.....	19
2.6.1 Acetilcolina.....	19
2.6.2 Acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7).....	20
2.7 Estresse Oxidativo.....	22
2.8 Análise Comportamental.....	24
2.8.1 Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus-Maze).....	24
2.8.2 Teste do Campo-Aberto (Open-Field Test).....	25
2.8.3 Análise Comportamental e o Etanol.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Reagentes.....	28
3.2 Equipamentos.....	30
3.3 Modelo Experimental.....	30
3.3.1 Animais.....	30
3.3.2 Tratamentos.....	31
3.3.2.1 Tratamento Agudo.....	31
3.3.2.2 Tratamento Crônico.....	31
3.3.3 Preparações teciduais.....	34
3.3.3.1 Obtenção dos constituintes sanguíneos.....	34
3.3.3.2 Obtenção de fígado e rins.....	34
3.3.3.3 Dissecção do tecido cerebral.....	35
3.3.4 Determinação de Proteína.....	35

3.3.5 Determinações Enzimáticas.....	36
3.3.5.1 NTPDase (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD39, E.C.3.6.1.5).....	36
3.3.5.2 5'- Nucleotidase (CD 73, E.C. 3.1.3.5).....	37
3.3.5.3 Acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7).....	37
3.3.6 Determinação da Peroxidação Lipídica.....	38
3.3.7 Avaliação Comportamental.....	39
3.3.7.1 Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus-Maze).....	39
3.3.7.2 Teste do Campo-Aberto (Open-Field Test).....	40
3.3.8 Análise Histológica.....	40
3.3.9 Análise Estatística.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Tratamento Agudo.....	42
4.1.1 Atividade das enzimas NTPDase e 5'-Nucleotidase.....	42
4.1.2 Atividade da enzima Acetilcolinesterase.....	46
4.1.3 Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus-Maze).....	48
4.1.4 Comportamento no Campo-Aberto (Open-Field Test).....	50
4.1.5 Peroxidação Lipídica.....	52
4.2 Tratamento Crônico.....	58
4.2.1 Modelo experimental.....	58
4.2.2 Atividade das enzimas NTPDase e 5'-Nucleotidase.....	66
4.2.3 Atividade da enzima Acetilcolinesterase.....	68
4.2.4 Comportamento no labirinto em cruz elevado (Elevated Plus-Maze).....	69
4.2.5 Comportamento no Campo-Aberto (Open-Field Test).....	69

4.2.6 Peroxidação Lipídica.....	70
5. DISCUSSÃO.....	72
5.1 Tratamento Agudo.....	72
5.1.1 Atividade das enzimas NTPDase e 5'-Nucleotidase.....	72
5.1.2 Atividade da enzima Acetilcolinesterase.....	75
5.1.3 Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus-Maze).....	77
5.1.4 Comportamento no Campo-Aberto (Open-Field Test).....	78
5.1.5 Peroxidação Lipídica.....	78
5.1.6 Considerações Gerais sobre o Tratamento Agudo.....	81
5.2 Tratamento Crônico.....	82
5.2.1 Modelo Experimental.....	82
5.2.2 Atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase.....	85
5.2.3 Atividade da enzima Acetilcolinesterase.....	86
5.2.4 Comportamento no labirinto em cruz elevado (Elevated Plus-Maze).....	88
5.2.5 Comportamento em campo-aberto (Open-Field Test).....	89
5.2.6 Peroxidação Lipídica.....	90
5.2.7 Considerações Gerais sobre o Tratamento Crônico.....	91
6. CONCLUSÕES.....	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
8. ANEXOS.....	126

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex, hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado dos ratos submetidos ao tratamento agudo com etanol.....	47
TABELA 2: Efeito do tratamento agudo com etanol em ratos nos diferentes parâmetros de comportamento avaliados no labirinto em cruz elevado.....	49
TABELA 3: Efeito do tratamento agudo com etanol em diferentes parâmetros de comportamento avaliados em ratos no Campo-Aberto.....	51
TABELA 4: Efeito do tratamento agudo com etanol na peroxidação lipídica em córtex, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e estriado de ratos.....	57
TABELA 5: Análise Morfométrica do fígado e rim de ratos dos grupos controle e tratado crônico com solução alcoólica 20%.....	63
TABELA 6: Atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex, hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado dos ratos submetidos ao tratamento crônico com etanol.....	68
TABELA 7: Efeito do tratamento crônico com etanol em diferentes parâmetros de comportamento no labirinto em cruz elevado.....	69
TABELA 8: Efeito do tratamento crônico com etanol em diferentes parâmetros de comportamento no campo-aberto.....	70
TABELA 9: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a peroxidação lipídica em fígado, rim e soro.....	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Metabolismo do etanol.....	8
FIGURA 2: Corte esquemático de uma plaqueta.....	12
FIGURA 3: Estrutura das ectonucleotidasas.....	17
FIGURA 4: Estrutura da 5'-nucleotidase ancorada a membrana via-GPI.....	18
FIGURA 5: Representação das formas moleculares da acetilcolinesterase.....	22
FIGURA 6: Punção cardíaca realizada nos ratos submetidos aos tratamentos agudo e crônico com etanol.....	33
FIGURA 7: Ratos submetidos ao tratamento crônico com etanol.....	33
FIGURA 8: Efeito da administração aguda de etanol nas doses de 0.8, 2.0, 4.0, 6.0 e 8.0g/kg sobre a atividade da enzima NTPDase de plaquetas de ratos com o substrato ATP.....	43
FIGURA 9: Efeito da administração aguda de etanol nas doses de 0.8, 2.0, 4.0, 6.0 e 8.0g/kg sobre a atividade da enzima NTPDase de plaquetas de ratos com o substrato ADP.....	44
FIGURA 10: Efeito da administração aguda de etanol nas doses de 0.8, 2.0, 4.0, 6.0 e 8.0g/kg sobre a atividade da enzima 5'-nucleotidase de plaquetas de ratos com o substrato AMP.....	45
FIGURA 11: Efeito do tratamento agudo com etanol sobre a peroxidação lipídica em fígado de ratos.....	54
FIGURA 12: Efeito do tratamento agudo com etanol sobre a peroxidação lipídica em rim de ratos.....	55

FIGURA 13: Efeito do tratamento agudo com etanol sobre a peroxidação lipídica em soro de ratos.....	56
FIGURA 14: Consumo sólido de ração em gramas do grupo controle e do grupo tratado com solução alcoólica 20% no decorrer das 31 semanas de tratamento.....	59
FIGURA 15: Consumo líquido de água do grupo controle e solução alcoólica 20% do grupo tratado no decorrer das 31 semanas de tratamento.....	60
FIGURA 16: Peso em gramas do grupo controle e do grupo tratado com solução alcoólica 20% no decorrer das 31 semanas de tratamento.....	61
FIGURA 17: Comparação entre o peso do rato que representa o grupo controle e o rato que representa o grupo tratado com etanol durante 31 semanas.....	62
FIGURA 18: Amostra de fígado de um rato do grupo controle. HE.Aum.400x.....	64
FIGURA 19: Amostra de fígado de um rato do grupo tratado. HE.Aum.400x.....	64
FIGURA 20: Amostra de fígado de um rato do grupo controle. HE.Aum.1000x.....	65
FIGURA 21: Amostra de fígado de um rato do grupo tratado. HE.Aum.1000x.....	65
FIGURA 22: Atividade da NTPDase em plaquetas de ratos dos grupos controle e tratado crônico com solução alcoólica.....	66
FIGURA 23: Atividade da 5'-nucleotidase em plaquetas de ratos dos grupos controle e tratado crônico com solução alcoólica.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh- acetilcolina

AChE- acetilcolinesterase

ADP- adenosina-5'-difosfato

AMP- adenosina-5'-monofosfato

ATP- adenosina-5'-trifosfato

BuChE- butirilcolinesterase

CaCl₂- cloreto de cálcio

CMP- monofosfato de citidina

DTNB- ácido 5-5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EDTA- ácido etilenodiamino tetracético

GMP- monofosfato de guanosina

GPI- glicosilfosfatidil-inositol

HEPES- ácido N-2-hidroxietilpiperazina

IMP- monofosfato de inosina

KCl- cloreto de potássio

MDA- malondialdeído

MgCl₂- cloreto de magnésio

NaCl- cloreto de sódio

NAD⁺- nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP⁺- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NTPDase- nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

Pi- fosfato inorgânico

PRP- plasma rico em plaquetas

SNA- Sistema Nervoso Autônomo

SNC- Sistema Nervoso Central

TBA- ácido tiobarbitúrico

TCA- ácido tricloroacético

UMP- monofosfato de uridina

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Laudo de necropsia de rato submetido ao tratamento crônico com etanol diagnosticado com osteossarcoma.....127

ANEXO 2: Laudo de necropsia de rato submetido ao tratamento crônico com etanol diagnosticado com carcinoma indiferenciado de pele.....128

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO AGUDO E CRÔNICO DO ETANOL SOBRE AS ENZIMAS NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE, ACETILCOLINESTERASE, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E COMPORTAMENTO EM RATOS

Autora: Glaecir R. Mundstock Dias

Orientadora: Vera Maria Morsch

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de outubro de 2004

O etanol é uma das substâncias mais utilizadas nas diferentes sociedades. Esse estudo foi realizado com a finalidade de se esclarecerem os efeitos agudos e crônicos do etanol sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos machos Wistar. O tratamento agudo consistiu na administração oral por gavagem de 0,8, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 gramas de etanol/kg de peso corporal. Todos os ratos foram sacrificados uma hora e meia pós-tratamento. Os resultados demonstraram que o tratamento agudo com etanol induziu um efeito bifásico ou hormético sobre a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase de plaquetas. A atividade da enzima acetilcolinesterase foi inibida em córtex cerebral, cerebelo, hipotálamo, hipocampo e estriado nos grupos tratados com 6,0 g/kg e 8,0 g/kg. Além disso, o tratamento agudo aumentou a peroxidação lipídica em soro, fígado, rim e estruturas cerebrais. O comportamento em campo-aberto e no labirinto em cruz elevado foi pouco alterado pelo tratamento agudo. O tratamento crônico consistiu na administração de uma solução alcoólica 20% durante 31 semanas de tratamento, como única fonte de líquido. Os ratos foram sacrificados após 48 horas de interrupção do tratamento. Os resultados demonstraram redução do peso do grupo tratado e ocorrência de injúria hepática inicial na avaliação histológica. Houve uma diminuição da atividade da NTPDase, com os substratos ATP e ADP, enquanto que a atividade da 5'-nucleotidase foi aumentada. A atividade da enzima acetilcolinesterase aumentou em cerebelo, hipotálamo, hipocampo e estriado. A peroxidação lipídica aumentou em soro, fígado e rim. Além disso, observou-se que a interrupção por 48 horas induziu uma resposta ansiogênica evidenciada no campo-aberto e no labirinto em cruz elevado.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO AGUDO E CRÔNICO DO ETANOL SOBRE AS ENZIMAS NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE, ACETILCOLINESTERASE, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E COMPORTAMENTO EM RATOS

(ACUTE AND CHRONIC EFFECTS OF ETHANOL ON ENZYMES NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE,
ACETYLCHOLINESTERASE, LIPID PEROXIDATION AND BEHAVIOR IN RATS)

Autora: Glaecir R. Mundstock Dias

Orientadora: Vera Maria Morsch

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de outubro de 2004

Ethanol is one of the most used substance in different societies. This study was performed in order to clarify the acute and chronic effects of ethanol on biochemical and behavioral parameters in male Wistar rats. The acute treatment consisted of oral administration by gavage of 0.8, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 g ethanol/kg. All rats were sacrificed one hour and thirty minutes post treatment. The results showed that acute treatment induced a biphasic or hormetic effect in platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities. The activity of the enzyme acetylcholinesterase was inhibited in cerebral cortex, cerebellum, hypothalamus, hippocampus and striatum in 6.0g/kg and 8.0g/kg treated-groups. Moreover the acute treatment increased lipid peroxidation in the blood serum, liver, kidney and brain structures. The open-field and elevated plus-maze behavior was few altered by acute treatment. The chronic treatment consisted of oral administration of 20% ethanol solution during 31 weeks as only source of fluid. Rats were sacrificed 48 hours after the end of the treatment. The results showed reduction of the weight of treated group and initial hepatic injury in histological evaluation. There was a reduction in platelet NTPDase activity with ATP or ADP as substrate, while the 5'-nucleotidase activity was increased. The activity of the enzyme acetylcholinesterase was increased in cerebellum, hypothalamus, hippocampus and striatum. Lipid peroxidation was increased in the blood serum, liver and kidney. Besides we observed that interruption of the treatment for 48 hours elicited an anxiogenic effect in open-field and elevated plus-maze.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas contendo o álcool etílico ou etanol na sua composição acompanha a História da humanidade. Inicialmente considerado “remédio”, posteriormente reconhecido como prejudicial à saúde e, mais tarde aparentando efeitos cardioprotetores, o etanol constitui-se em uma molécula extremamente simples de dois carbonos e uma função alcoólica.

Devido a essa simplicidade e aparente falta de especificidade seus efeitos farmacológicos foram explicados pelas suas ações sobre as membranas biológicas, ou seja, ao se interpor entre a bicamada de fosfolipídios o etanol provocaria mudanças no microambiente das proteínas aí inseridas, alterando suas funções. Além disso, as mudanças nas frações dos constituintes das membranas, aumentando o colesterol e os ácidos graxos saturados, observadas na exposição crônica ao etanol forneceram evidências para suportar a denominada “hipótese da membrana”. Com a descoberta de locais de ligação específicos para a molécula do etanol, uma nova dimensão de sua atuação pode ser evidenciada, demonstrando uma inesperada especificidade (Korpi et al., 1998; Harris & Mihic, 2004).

Pesquisas que buscam amplificar os conhecimentos acerca das propriedades farmacológicas do etanol são muito importantes, devido à ampla utilização dessa substância nas diferentes populações mundiais. Várias investigações epidemiológicas evidenciam efeitos benéficos do etanol em doses leves a moderadas (Fuchs et al., 1995; Goldberg et al., 1995; Kannel & Ellison, 1996; Gaziano et al., 2000; Meister et al., 2000;

Baer et al., 2002; Vliegthart et al., 2002), mas muitas outras demonstram e toda a sociedade evidencia a associação entre o abuso de etanol e criminalidade, acidentes de trânsito, abuso de outras drogas lícitas e ilícitas, Síndrome Alcoólica Fetal e vários outros problemas sociais, que conduzem a importante reflexão de que a utilização dessa substância deve ser extremamente criteriosa (Minayo & Deslandes, 1998; Bau, 2002; Lopes & Sichieri, 2002, Ministério da Saúde, 2003).

Os efeitos do etanol já foram evidenciados nos diferentes sistemas de neurotransmissão, embora muitas questões ainda necessitem de esclarecimentos adicionais, bem como as suas ações sobre diferentes enzimas com variada distribuição tecidual.

As nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases), juntamente com a 5'-nucleotidase, são enzimas que regulam as concentrações dos nucleotídeos extracelulares ATP, ADP e AMP, bem como da concentração do seu nucleosídeo correspondente, a adenosina. As funções dos nucleotídeos e da adenosina correspondem logicamente a sua localização tecidual, logo variações nas enzimas que regulam as suas concentrações alteram diferentes funções fisiológicas.

Dessa forma, o estudo das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas, células importantes nos processos hemostáticos do organismo, pode esclarecer a influência de substâncias ou condições fisiopatológicas sobre o processo de agregação plaquetária. O etanol possui ações antiagregantes já evidenciadas em estudos *in vitro* e *in vivo* baseadas na inibição da produção de tromboxano A₂ e a estimulação da produção de prostaciclina (Landolfi & Steiner, 1984; Mehta et al., 1987; Rubin, 1989; Duarte et al., 1995; Renaud & Ruf, 1996; Nguyen et al., 1999).

Embora o etanol possua efeitos relacionados a neurotransmissão colinérgica, estes geram algumas dúvidas devido à variabilidade de modelos experimentais empregados, logo pesquisas mais recentes podem acrescentar novas ferramentas na discussão. Para avaliar a neurotransmissão colinérgica pode-se estudar o neurotransmissor acetilcolina, os receptores que sofrem a sua modulação ou suas rotas biossintéticas e de degradação.

Assim, avaliar a enzima acetilcolinesterase, responsável pelo término da ação da acetilcolina, em diferentes áreas cerebrais de ratos expostos ao etanol contribui para mensurar seus efeitos sobre a neurotransmissão colinérgica e os parâmetros comportamentais avaliados nos animais. Desde que a avaliação de comportamento é bastante simples de ser realizada e possui baixo custo pode tornar-se um artifício eficaz no esclarecimento e busca de correlações entre comportamento, substância testada e sistema de neurotransmissão avaliado.

O etanol está envolvido na geração de radicais livres que, conseqüentemente contribuem para a geração de estresse oxidativo, intimamente relacionado a efeitos prejudiciais no organismo. Embora essa correlação seja aceita devido a uma ampla margem de evidências, deve-se avaliar se o modelo experimental empregado contempla essa explicação, a fim de certificar-se de sua validade e de se verificar a existência de influência da geração de radicais livres nos parâmetros enzimáticos avaliados.

Dessa forma os objetivos do presente trabalho serão descritos a seguir.

1.1 Objetivos

Avaliar nos modelos experimentais agudo e crônico de exposição ao etanol em ratos machos adultos Wistar:

- ◆ Atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas;
- ◆ Atividade da enzima acetilcolinesterase em hipocampo, hipotálamo, cerebelo, córtex e estriado;
- ◆ Peroxidação lipídica em soro, rim e fígado;
- ◆ Comportamento no labirinto em cruz elevado;
- ◆ Comportamento em campo- aberto.

Avaliar no modelo experimental de exposição aguda ao etanol em ratos machos adultos Wistar:

- ◆ Peroxidação lipídica em hipocampo, hipotálamo, cerebelo, córtex e estriado.

Avaliar no modelo experimental de exposição crônica ao etanol em ratos machos adultos Wistar:

- ◆ Histologia de amostras de tecido hepático.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etanol

O consumo de bebidas contendo o álcool etílico ou etanol advém desde o início da História, com os primeiros registros datados de, aproximadamente 6000 anos atrás, no antigo Egito e Babilônia. Inicialmente, eram bebidas fermentadas de baixo teor alcoólico, mas com a introdução das técnicas de destilação pelos árabes na Europa, as bebidas destiladas começaram a ser consumidas na Idade Média. O etanol foi considerado pelos alquimistas o elixir da vida, sendo utilizado como remédio para praticamente todas as doenças.

A partir da Idade Média, intensificou-se a produção das bebidas destiladas e os problemas relacionados ao seu consumo tornaram-se socialmente relevantes (Gilman et al., 1996; Bau, 2002).

O desejo irresistível e incontrolável de consumir bebidas alcoólicas foi descrito por Benjamin Rush em 1784, sendo que em 1813 Pearson e Sutton, independentemente, descreveram o delirium tremens. O conceito de alcoolismo como doença é bastante recente e desenvolveu-se nos últimos 100 anos juntamente com a pesquisa que envolve esse importante tema (Mann et al., 2000).

O etanol é encontrado nas diferentes bebidas alcoólicas em concentrações variáveis, sendo que cervejas e fermentados de baixo teor alcoólico tem entre 3 e 6 % de seu volume em etanol, vinho entre 11 e 15%

e as chamadas bebidas fortes ou destilados (cachaça, vodca e congêneres) entre 40 e 60% (Fuchs & Wannmacher, 1998).

2.2 Farmacocinética do Etanol

A farmacocinética do etanol determina a sua presença na corrente sangüínea após a ingestão de uma bebida alcoólica e o grau de exposição dos diferentes órgãos aos seus efeitos, influenciando na determinação da resposta farmacodinâmica. Vários fatores podem alterar as diferentes etapas da farmacocinética do etanol, incluindo a influência do gênero, composição corporal, administração e composição de alimentos e os polimorfismos genéticos (Niaura et al., 1987; Wang et al., 1992; Ramchandani et al., 2001).

2.2.1 Absorção

O etanol é rapidamente absorvido no estômago, intestino delgado e cólon, sendo também passível de absorção pulmonar quando vaporizado. As concentrações sangüíneas máximas são observadas entre 30 a 90 minutos após a ingestão, sendo influenciadas por diversos fatores, como a concentração alcoólica da bebida ingerida, presença e composição dos alimentos no estômago, taxa de ingestão e de esvaziamento gástrico (Gilman et al., 1996; Ramchandani et al., 2001).

2.2.2 Distribuição

A distribuição do etanol ocorre de forma razoavelmente uniforme por todos os tecidos do organismo, devido as suas características hidrofílicas e lipofílicas. Não ocorre ligação as proteínas plasmáticas. A passagem através das barreiras hematoencefálica e placentária se dá de forma completa, sendo que o uso e o abuso do etanol durante a gestação causam vários efeitos dose-dependentes sobre o feto (Gilman et al., 1996; Kaup et al., 2001).

2.2.3 Biotransformação

A biotransformação do etanol ocorre principalmente por oxidação hepática, sendo dependente das propriedades catalíticas das enzimas responsáveis álcool desidrogenase, localizada no citoplasma e aldeído desidrogenase, cuja localização é mitocondrial. Além dessas enzimas, o etanol também pode ser metabolizado pelo sistema oxidante microsossômico do etanol (MEOS, composto pelo CYP 450IIE, NADPH-citocromo-c-redutase e fosfolipídios) encontrado no retículo endoplasmático e nos peroxissomos pela ação da catalase. A figura 1 ilustra o metabolismo do etanol.

O metabolismo do etanol apresenta um considerável grau de variação interindividual e étnico, devido à variabilidade dos genes responsáveis pela codificação das enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, produzindo isoenzimas funcionalmente diferentes que originam os polimorfismos genéticos. Os genes que codificam a álcool desidrogenase e

a aldeído desidrogenase são expressos além do fígado em diferentes tecidos: na musculatura esquelética, estômago, intestino e tecido cerebral, promovendo efeitos específicos, de acordo com o metabolismo do etanol nesses locais (Ramchandani et al., 2001).

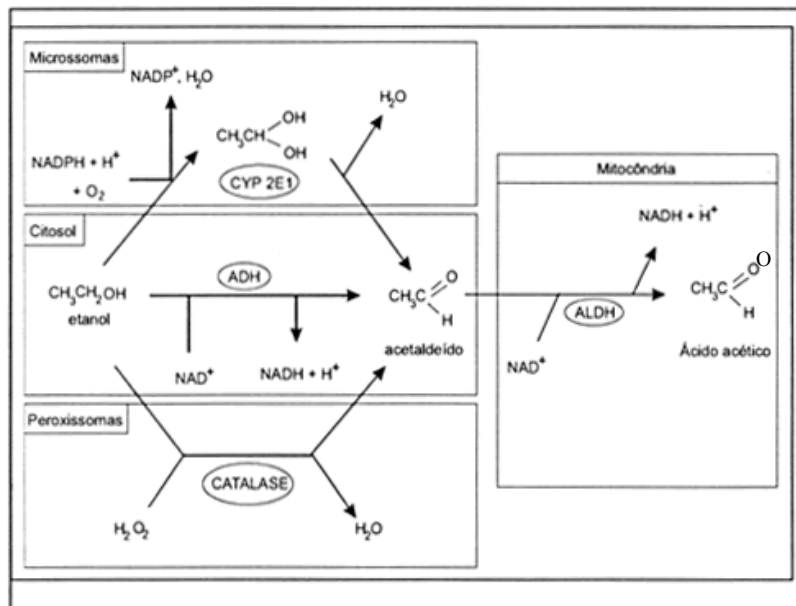


FIGURA 1: Metabolismo do etanol, demonstrando a participação do CYP 450 IIE1 (ou CYP 2E1) nos microsomas hepáticos, a ação da ADH (aldeído desidrogenase) citoplasmática e da catalase nos peroxissomas, todas as reações formando o acetaldeído que será oxidado na mitocôndria pela ALDH (aldeído desidrogenase). Adaptado de Bermond II & Tose (2000).

Como demonstrado na figura 1, a oxidação de etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase e CYP 450 IIE1, utiliza o NAD^+ e o NADP^+ como cofatores, respectivamente, gerando um excesso de equivalentes reduzidos que promovem alteração do potencial redox citoplasmático

levando a várias alterações metabólicas. A concentração de lactato eleva-se em relação à de piruvato, originando hipoglicemia e hiperlactacidemia, que pode evoluir para acidose láctica e reduzir a capacidade do rim de excretar ácido úrico. Além disso, parte dos equivalentes reduzidos podem passar para a mitocôndria através de processos como o ciclo do ácido málico, ciclo de alongamento dos ácidos graxos e ciclo do alfa-glicerolfosfato. O consumo de etanol também favorece o acúmulo de triglicérides no fígado e diminui o consumo de ácidos graxos, pois o hepatócito passa a utilizar o etanol como fonte de energia, reduzindo a atividade do ciclo do ácido cítrico. Dessa forma, a diminuição da oxidação dos ácidos graxos resulta em deposição hepática de gordura, denominada esteatose e que se constitui na primeira fase de lesão hepática alcoólica (Bertelli & Conci, 1997).

O acetaldeído, produto da oxidação do etanol, é oxidado a acetato pela enzima aldeído desidrogenase, reação que também necessita de NAD^+ , sendo que o acetato é oxidado até CO_2 e H_2O ou é utilizado no Ciclo de Krebs, explicando o poder energético de 7 calorias por grama de etanol. O acetaldeído também é responsável pelos efeitos tóxicos agudos e crônicos do etanol, pois é um metabólito extremamente reativo e tóxico, capaz de se combinar com fosfolipídios, aminoácidos e grupos sulfidrílicos (Bertelli & Conci, 1997).

A alteração do potencial redox celular relaciona-se também com a geração de radicais livres, pois o excesso de NADH mantém o CYP 450 IIE1 na sua forma reduzida e, este ao se oxidar forma o ânion superóxido. O aumento do NADH libera o ferro da ferritina e contribui para a formação de radicais livres através da Reação de Fenton (Khan & O'Brien, 1999).

O excesso de NADH pode inibir a atividade da xantina desidrogenase dependente de NAD^+ , favorecendo a xantina desidrogenase dependente de oxigênio, que realiza o metabolismo de purinas e também a oxidação do acetaldeído, gerando o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Fridovich, 1989; Shaw, 1989, Nordmann et al., 1992; Sies, 1997).

O sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) contribui pouco para o metabolismo do etanol nos indivíduos normais, mas adquire importância na medida em que o consumo de etanol aumenta e torna-se regular, ou seja o etanol pode induzir o aumento dos constituintes do MEOS e, conseqüentemente aumentar o metabolismo de outras drogas que também sofrem a ação desse sistema (Gilman et al., 1996), contribuindo para o fenômeno de tolerância (Bertelli & Conci, 1997). O MEOS participa da geração de radicais livres gerando ânions superóxido (Shaw, 1989) e pode também ativar xenobióticos aos seus metabólitos tóxicos, incluindo pró-carcinógenos (nitrosaminas, cloreto de vinil, aflatoxinas, hidrocarbonetos policíclicos e hidrazinas), contribuindo para o desenvolvimento de processos carcinogênicos (Pöschl & Seitz, 2004).

A contribuição da enzima catalase na oxidação do etanol no hepatócito não é tão pronunciada em situações fisiológicas, mas pode ser aumentada quando quantidades significativas de peróxido de hidrogênio tornam-se disponíveis (Sies, 1997), embora a geração de acetaldeído no SNC pareça ser devido a sua ação (Hunt, 1996; Sanchis-Segura et al., 1999).

2.2.4 Excreção

A eliminação do etanol segue a cinética de ordem zero, ou seja a taxa de oxidação é relativamente constante com o tempo e é pouco aumentada pela elevação da concentração sangüínea, sendo de aproximadamente 10 ml/hora. A maior parte do etanol ingerido (90-98%) é completamente oxidada, sendo que a fração não oxidada é excretada através dos rins e pulmões. A concentração na urina é discretamente superior à concentração sangüínea e a concentração no ar alveolar é de apenas 0.05% da concentração sangüínea (Gilman et al., 1996; Fuchs & Wannmacher, 1998).

2.3 Plaquetas

As plaquetas são células anucleadas formadas a partir da fragmentação dos megacariócitos. Possuem formato discóide, mas são bastante heterogêneas quanto às características de tamanho, densidade e coloração (Guyton & Hall, 1997; Lee et al., 1998). Sua estrutura pode ser visualizada na figura 2.

A membrana celular da plaqueta possui uma cobertura glicoproteíca que impede a adesão ao endotélio normal, mas não nas áreas lesadas das paredes dos vasos, especialmente onde ocorre exposição do colágeno (Bakker et al., 1994). Sua estrutura trilaminar é formada pela zona periférica, bicamada de fosfolipídios, proteínas, glicoproteínas, receptores, enzimas, submembrana e microtúbulos (Guyton & Hall, 1997; Lorenzi, 1999).

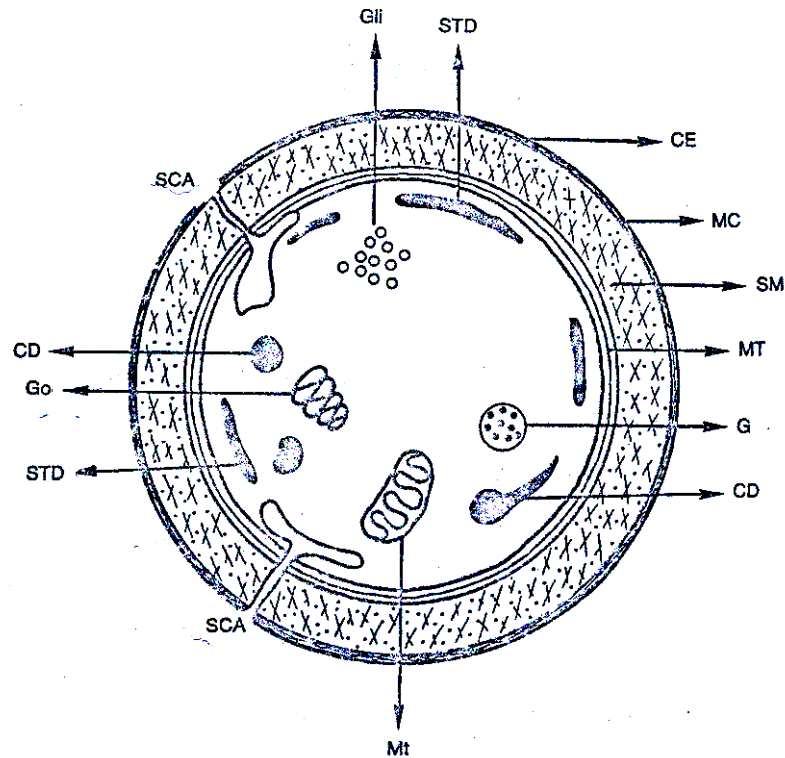


FIGURA 2: Corte esquemático de uma plaqueta. (CE= camada externa; MC= membrana celular; SM= submembrana; MT= microtúbulos; G= grânulos; CD= corpos densos; MT= mitocôndria; Go= aparelho de Golgi; SCA= sistema de canalículos abertos; STD= sistema tubular denso). Adaptado de Lorenzi (1999).

De acordo com Marcus et al. (2001), as plaquetas participam da tromboregulação, ou seja, do processo ou grupo de processos pelos quais as células sangüíneas interagem com as células das paredes dos vasos para regular ou inibir a formação de trombos. As plaquetas liberadas a partir da fragmentação do megacariócito permanecem na circulação sangüínea por

8-12 dias, atuando na manutenção da integridade vascular. O reparo de lesões vasculares pelas plaquetas está baseado em várias funções importantes das mesmas: a adesão, agregação e secreção de substâncias contidas nos grânulos citoplasmáticos, constituindo-se no processo hemostático inicial (Bakker et al., 1994; Guyton & Hall, 1997; Lorenzi, 1999). As plaquetas de ratos são bastante similares as de humanos e desempenham as mesmas funções, com o mesmo grau de importância na regulação da hemostasia (Takahashi, 2000).

2.4 Nucleotídeos

2.4.1 Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares

Os nucleotídeos da adenina constituem 90% dos nucleotídeos plaquetários e encontram-se distribuídos em dois pools distintos: o pool metabólico, constituído principalmente de ATP, é utilizado na manutenção das funções celulares; e o pool de armazenamento, que contém aproximadamente dois terços dos nucleotídeos plaquetários totais na forma de ADP e ATP, cuja finalidade é a liberação durante a secreção plaquetária (Lee et al., 1998). As concentrações liberadas de ATP e ADP são aproximadamente as mesmas (Soslau et al., 1997).

Os nucleotídeos da adenina extracelulares ATP, ADP e o nucleosídeo correspondente adenosina são reconhecidamente responsáveis pela modulação do tônus vascular e das funções plaquetárias (Coade & Pearson, 1989, Birk et al., 2002a).

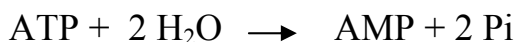
O ADP pode ser considerado um dos agonistas principais envolvidos na agregação plaquetária. A liberação do ADP por plaquetas, hemólise de eritrócitos ou ação de outras células para a circulação sanguínea recruta outras plaquetas para aderirem-se ao vaso lesado, amplificando o processo de agregação (Bakker et al., 1994; Nguyen et al., 1999; Pinsky et al., 2002). Com a ativação de plaquetas pelo ADP ocorre aumento nas concentrações citoplasmáticas de cálcio e simultaneamente, inibição da adenil ciclase, efeitos responsáveis pela estimulação da agregação plaquetária. Esses efeitos são mediados através da interação dos nucleotídeos extracelulares em receptores específicos encontrados nas plaquetas (Boarder & Hourani, 1998; Di Virgilio et al., 2001).

O ATP é considerado um inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP (Coade & Pearson, 1989, Soslau et al., 1995; Leon et al., 1997), embora evidências indiquem a existência de mecanismos não-competitivos e demonstram que o ATP em altas ou baixas concentrações modula diferentemente a agregação plaquetária. Em altas concentrações os efeitos inibitórios prevalecem, mas em concentrações menores observou-se estimulação da agregação induzida por colágeno, trombina e tromboxano A₂ (Soslau et al., 1997, 2000). Esse efeito duplo do ATP sugere a complexidade de suas ações sobre a agregação plaquetária (Birk et al., 2002b). Além disso, como o ATP atua como um co-transmissor simpático, é liberado com a noradrenalina e causa vasoconstrição via receptores P₂X (Boarder & Hourani, 1998, Burnstock, 1997; Burnstock, 1999). A adenosina, produto desfosforilado do ATP, inibe a estimulação da agregação plaquetária induzida por qualquer agonista (Coade & Pearson, 1989).

2.5 Enzimas NTDase e 5'-Nucleotidase

2.5.1 NTPDase (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD 39, E.C. 3.6.1.5)

O termo apirase foi usado por Meyerhof em 1945 para designar enzimas que hidrolisam ATP, ADP e outros nucleotídeos di e trifosfatados aos seus monofosfatocucleotídeos correspondentes e fosfato inorgânico, conforme as seguintes reações:



Essas enzimas foram previamente classificadas como ATPases tipo-E, ATPDases, ecto-ATPases ou ecto-apirases (Sévigny et al., 2002) e sua presença já foi relatada em plantas, insetos, parasitas e em vários tecidos obtidos de mamíferos (Valenzuela et al., 1989; Côté et al., 1991; Battastini et al., 1991; Kettlun et al., 1992; Frasseto et al., 1993; Pilla et al., 1996).

As nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) são uma família de ectonucleotidases, responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP (Sévigny et al., 2002), formando AMP, que será metabolizado pela enzima 5'- nucleotidase. Já foram identificados 8 membros dessa família, denominados NTPDase 1-8, que diferem na especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular (Zimmermann, 1999).

A estrutura das NTPDases (Figura 3) possui duas regiões transmembrana próximas aos grupamentos amino e carbóxi terminal, responsáveis por ancorar a enzima na membrana celular. Além disso, as

NTPDases demonstram um alto grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos, particularmente dentro de cinco regiões, denominadas “regiões conservadas de apirase” (apyrase conserved regions ou ACR), situadas no domínio extracelular da enzima. As ACRs estão presentes nas NTPDases de plantas, insetos, parasitas e mamíferos, sugerindo que são essenciais para sua atividade biológica (Marcus et al., 2001; Drosopoulos, 2002). Além disso, formas solúveis de NTPDases também já foram identificadas (Oses et al., 2004).

Pode-se prever a importância dessas enzimas na trombo-regulação, já que os nucleotídeos ATP, ADP e o nucleosídeo adenosina são responsáveis pela regulação do tônus vascular e da função plaquetária. Desse modo, as NTPDases atuam regulando as concentrações dos nucleotídeos e, conseqüentemente a agregação plaquetária (Côté et al., 1991; Frasseto et al., 1993; Pilla et al., 1996; Gangadharan et al., 2001; Marcus et al., 2001; Sévigny et al., 2002; Drosopoulos, 2002, Pinsky et al., 2002).

A liberação do óxido nítrico (FRDF= fator relaxante derivado do endotélio), produção de prostaciclina e a presença das NTPDases se constituem nos três principais mecanismos trombo-regulatórios associados ao endotélio vascular (Ramamurthi et al., 2001).

A atividade enzimática da NTPDase 1 foi descrita em plaquetas intactas de humanos (Pilla et al., 1996) e de ratos (Frasseto et al., 1993; Frasseto et al., 1995), contribuindo para os processos hemostáticos.

O conhecimento das propriedades das NTPDases contribui para o desenvolvimento de novas terapias antitrombóticas, sendo que através da técnica de DNA recombinante, obteve-se uma forma solúvel de CD 39 humana, que demonstrou inibir a agregação plaquetária induzida por

colágeno e trombina (Marcus et al., 2001) e exerceu um efeito benéfico em modelos de isquemia cerebral (Pinsky et al., 2002).

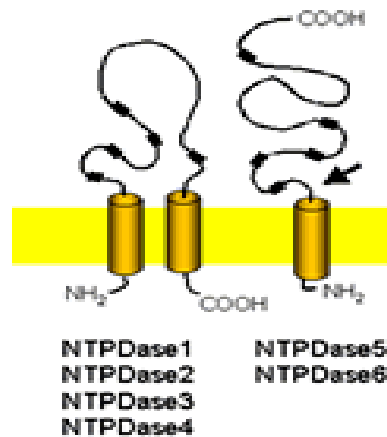
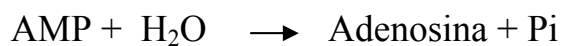


FIGURA 3: Estrutura das ectonucleotidasas: NTPDase 1 a 3 são ectonucleotidasas típicas e NTPDase 4 a 6 tem distribuição intracelular. Adaptado de Zimmermann (2001).

2.5.2 Ecto- 5'- Nucleotidase (CD 73, E.C. 3.1.3.5)

A 5'-nucleotidase catalisa a desfosforilação de vários 5'-monofosfatos, tais como CMP, UMP, IMP, GMP e, mais eficientemente do AMP, conforme a seguinte reação:



Essa enzima é uma glicoproteína ancorada a membrana via GPI (glicosilfosfatidil-inositol) amplamente distribuída em tecidos neuronais e não-neuronais, como nas células endoteliais (Kawashima et al., 2000) e nas plaquetas (Bergamini & Grazi, 1980), além de ser encontrada em bactérias,

plantas e parasitas (Zimmermann et al., 1998; Tasca et al., 2003). A 5'-nucleotidase pode ser liberada das membranas por clivagem da âncora GPI pela Fosfolipase C, originando formas solúveis (Zimmermann et al., 1998). A estrutura da 5'-nucleotidase está representada na figura 4.

Suas funções relacionam-se a hidrólise do AMP extracelular derivado do ATP liberado pela diferentes células do organismo, formando a adenosina. A adenosina por sua vez, atua através da interação com receptores específicos, desempenhando as funções de neurotransmissão, neuromodulação, neuroproteção e controle do tônus vascular e da função plaquetária (Zimmermann et al., 1998).

Assim, a 5'-nucleotidase atua com a NTPDase na trombo-regulação, pois a adenosina formada interage com receptores A_{2a} , presentes nas plaquetas sangüíneas, estimulando a adenil ciclase e inibindo a agregação plaquetária (Cristalli et al., 1994), de forma que a degradação ATP- ADP para AMP e, posteriormente para adenosina controla as funções plaquetárias (Kawashima et al., 2000).

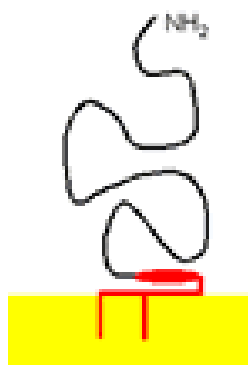


FIGURA 4: Estrutura da 5'-nucleotidase ancorada a membrana via-GPI. Adaptado de Zimmermann (2001).

2.6 Sistema Colinérgico

2.6.1 Acetilcolina

A acetilcolina (ACh) é um importante neurotransmissor encontrado nos gânglios do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), medula adrenal, placa motora, terminais parassimpáticos e Sistema Nervoso Central (SNC). Sua síntese é realizada pela colina- acetiltransferase (ChAT, E.C. 2.3.1.6), que se encontra concentrada nos terminais nervosos, como está demonstrado a seguir:



A ACh formada é armazenada em vesículas que tem seu conteúdo liberado por exocitose, quando ocorre um influxo de cálcio no terminal nervoso. Após ser liberada, a ACh interage com receptores específicos causando despolarização e propagação do potencial de ação na célula pós-sináptica e é rapidamente metabolizada enzimaticamente. Os receptores colinérgicos foram previamente classificados com os alcalóides agonistas muscarina e nicotina, sendo denominados nicotínicos ganglionares, neuromusculares ou centrais e muscarínicos. Receptores nicotínicos são classificados em N1, presentes na junção neuromuscular, N2, encontrados em gânglios, sendo que no SNC os receptores exibem maior variedade. Os receptores muscarínicos possuem 5 subtipos, denominados de M₁- M₅ (Siegel et al., 1999).

2.6.2 Acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7)

Colinesterases são enzimas amplamente distribuídas em tecidos neuronais e não-neuronais, que podem ser subdivididas em acetilcolinesterase (AChE, E.C.3.1.1.7) e butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase (BuChE, E.C.3.1.1.8), responsáveis pela hidrólise dos ésteres da colina. Apesar de ser conhecida principalmente por sua propriedade catalítica na regulação da estimulação colinérgica, a AChE também desempenha ações relacionadas à adesão celular e desenvolvimento neuronal (Day & Greenfield, 2002), bem como a BuChE (Darvesh et al., 2003).

A estrutura da AChE ou seu produto de tradução primário possui uma porção N-terminal que é clivada ao originar a proteína “madura”, seguida pelo domínio catalítico, que representa a principal parte da proteína e é composto de aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos e uma pequena porção C-terminal. Os peptídeos C-terminal definem diferentes tipos de subunidades catalíticas e as modificações pós-tradução da proteína, originando as diferentes formas moleculares da enzima (Massoulié et al., 1999).

A diferentes formas moleculares da AChE e BuChE (Figura 5) são denominadas assimétricas (associadas a moléculas, como o colágeno) ou globulares G1, G2 e G4 (denominações que correspondem a monômeros, dímeros ou tetrâmeros), encontradas em diferentes concentrações, de acordo com o tecido estudado (Das et al., 2001; Lassiter et al., 2003). As variantes relacionam-se às subunidades catalíticas da AChE e, incluem a AChE_R, que produz um monômero solúvel encontrado no tecido nervoso, a

AChE_H, que produz um dímero ancorado via-GPI em células sanguíneas de mamíferos e a AChE_T, que é a única subunidade catalítica encontrada em cérebro e músculos de mamíferos adultos e é responsável pela produção de monômeros, dímeros, tetrâmeros, bem como heterooligômeros ligados a moléculas hidrofóbicas e de colágeno. Já a BuChE possui um único tipo de subunidade catalítica correspondente a AChE_T e também é encontrada em diferentes formas moleculares (Massoulié et al., 1998, 1999; Perrier et al., 2002; Darvesh et al., 2003).

As formas de AChE e BuChE associadas ao colágeno (subunidade CoIQ) são encontradas nas junções neuromusculares, sendo que a subunidade CoIQ ancora as enzimas na matriz extracelular organizando-as em tetrâmeros. No SNC, as formas predominantes da AChE e BuChE são tetraméricas, sendo que a subunidade responsável pela organização dos tetrâmeros e ancoragem a membrana é denominada PRiMA (âncora de membrana rica em prolina) (Perrier et al., 2002).

A importância fisiológica dessa variedade de formas das enzimas AChE e BuChE reside na manutenção da atividade colinérgica, pois além de ter eficiência catalítica, essas enzimas precisam posicionar-se na fenda sináptica, ou seja precisam responder as características dos receptores aos quais são confrontadas, de forma a atuar na junção neuromuscular, SNA e SNC (Massoulié, 1980; Massoulié et al., 1993, 1998, 1999; Perrier et al., 2002; Darvesh et al., 2003).

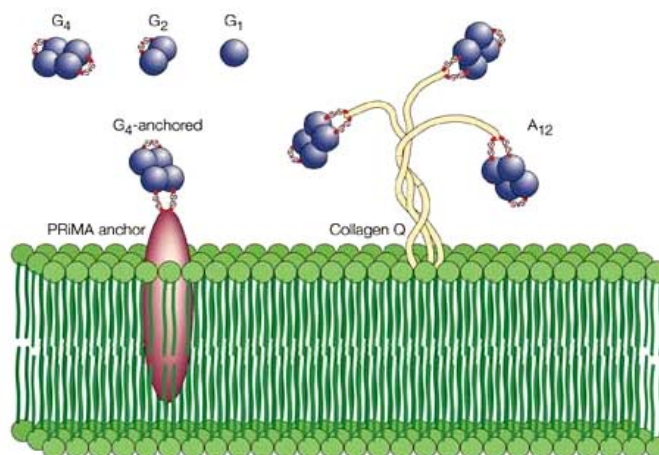


FIGURA 5: Representação das formas moleculares da acetilcolinesterase, demonstrando as formas globulares G1, G2 e G4 e as formas assimétricas ancoradas a membrana. Adaptado de Perrier et al. (2001).

2.7 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo ocorre nas células e tecidos a partir de uma produção aumentada de radicais livres e/ou uma depleção dos sistemas de defesa antioxidante, sendo extremamente importante no desenvolvimento de processos patológicos respiratórios, cardiovasculares, gastrointestinais e cerebrais (Sies, 1997; Muzykantov, 2001; Frostegard, J., 2002; Emerit et al., 2004).

Radicais livres são átomos, íons ou moléculas que contêm um número ímpar de elétrons ou, em outros termos, possuem um elétron não-pareado em sua órbita externa, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio, representadas pelo radical superóxido (O_2^-) e radical hidroxil (OH^\bullet), e as espécies reativas de nitrogênio, representadas pelo óxido nítrico

(NO) e dióxido de nitrogênio (NO_2). O óxido nítrico reage com o radical superóxido para formar o peroxinitrito (ONOO^-), ainda mais reativo (Fang et al., 2002).

Os radicais livres são instáveis e muito reativos, de forma que reagem prontamente com biomoléculas como o DNA, RNA, proteínas e lipídios. A presença de grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas biológicas, torna-as suscetíveis ao processo de peroxidação lipídica, levando a uma degradação progressiva de sua integridade e a formação de vários produtos, como o malondialdeído (MDA) (Rosenblum et al., 1989). Os radicais livres também possuem efeitos benéficos, que incluem a transdução de sinais, transcrição genética e regulação enzimática (Fang et al., 2002).

A maioria dos tecidos produz normalmente radicais livres, sendo que o processo de fosforilação oxidativa mitocondrial gera 3-5 % de sua atividade de transporte de elétrons como radicais livres, ao invés de dióxido de carbono. Enzimas como a monoamino oxidase (MAO), lipooxigenases, xantina oxidase e o citocromo P450 também formam radicais livres. O CYP 450 IIE1, quando induzido pelo consumo crônico de etanol, aumenta ainda mais a produção de radicais livres (McDonough, 2003).

A formação de radicais livres é um processo natural que ocorre durante o metabolismo intracelular, mas a ocorrência de efeitos prejudiciais ao organismo é controlada pelo sistema de defesa antioxidante. A remoção dos radicais livres do organismo ocorre a partir de mecanismos de defesa enzimáticos e não-enzimáticos presentes nos diferentes tecidos. Os mecanismos enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1.), que existe em três formas: a Cu,Zn- SOD citoplasmática, a

Mn-SOD mitocondrial e a SOD extracelular, a catalase (CAT, E.C.1.11.1.6), a glutathiona peroxidase (GSH-Px, E.C.1.11.1.9) e a glutathiona redutase (GR, E.C.1.6.4.2). Os mecanismos não-enzimáticos incluem a glutathiona tripeptídeo (GSH) e as vitaminas A, C e E (Sies, 1997).

2.8 Análise Comportamental

2.8.1 Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus-Maze)

Vários tipos de labirintos vêm sendo empregados ao longo dos anos com a finalidade de avaliar a ansiedade em animais de laboratório, mas o mais utilizado é o labirinto em cruz elevado, devido à facilidade e rapidez na realização do teste (Blatt & Takahashi, 1999; Belzung & Griebel, 2001).

O aparato consiste em uma cruz de materiais e cores variadas com dois braços abertos e dois braços fechados por paredes altas. Os braços abertos são perpendiculares aos braços fechados e conectados por um espaço central, sendo que o labirinto é elevado em aproximadamente 50 cm. No momento da realização do teste por um tempo pré-determinado o animal é colocado na plataforma central voltado para um dos braços abertos ou fechados e avalia-se a frequência e o tempo gasto na parte aberta ou fechada, sendo que outras categorias de comportamento também podem ser avaliadas, como a frequência de “mergulhos”, que significa movimentos realizados com a cabeça na direção do chão quando encontram-se na parte aberta, tentativas de escapar do aparato (“escape behavior”) e outro tipo de comportamento denominado avaliação do risco

(“risk assessment”), onde o animal permanece na plataforma central e estende-se e avalia a parte aberta do aparato (Dawson & Tricklebank, 1995; Belzung & Griebel, 2001).

Os braços abertos representam um caráter exploratório, enquanto que os braços fechados representam um local seguro. Em geral, ratos e camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado tendem a entrar com maior frequência e a permanecer nos braços fechados, evitando os braços abertos (Dawson & Tricklebank, 1995; Rodgers & Dalvi, 1997; Wall & Messier, 2001).

Essa tendência é suprimida com a administração de fármacos ansiolíticos e potencializada por substâncias ansiogênicas, embora o teste possa ser influenciado por vários fatores como a espécie utilizada, perfil do animal, nível de luz, ruídos e odores no ambiente, estrutura do aparato, tempo de realização do teste, escores avaliados e condições pré-teste, originando resultados contraditórios e a necessidade de padronização anterior ao procedimento (Belzung & Griebel, 2001).

2.8.2 Teste do Campo-Aberto (Open-Field Test)

O teste de observação em campo-aberto é provavelmente um dos mais utilizados quando se deseja avaliar a atividade exploratória de animais, devido à facilidade com que é realizado e por ser de baixo custo. A atividade exploratória refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente (Annau, 1986).

O teste é realizado durante um intervalo de tempo pré-determinado em uma arena circular confeccionada em materiais e cores variadas, com a

superfície dividida em áreas de igual tamanho e delimitada por paredes, sendo que o rato é colocado no centro e um observador verifica os efeitos do ambiente não familiar sobre o comportamento do animal.

O pressuposto básico é que para explorar o novo ambiente o rato deve movimentar-se, logo se determina o número de áreas percorridas pelo animal que podem ser subdivididas em regiões periféricas e centrais. Outras categorias de comportamento realizadas para amplificar as informações obtidas do ambiente também podem ser registradas com relação à frequência e duração da ação, como reflexo de orientação (“rearing”), quando o animal permanece apoiado somente nas patas traseiras ou apóia-se nas paredes do aparato, autolimpeza (“grooming”), “sniffing”, quando o animal realiza movimentos com o nariz e vibrissas explorando o ambiente, “freezing”, que representa a ausência de atividade exploratória, latência para iniciar a exploração e quantidade de bolos fecais depositados na arena do teste. Variações do teste podem utilizar alimentos na arena, analisando-se a latência para a alimentação nos ratos submetidos aos diferentes tratamentos (Rex et al., 1998).

O teste de observação em campo aberto é bastante utilizado na avaliação de fármacos ansiolíticos, pois se presume que o ambiente não familiar ao animal provoque medo e/ou ansiedade, fazendo com que o animal diminua sua atividade exploratória, permaneça menos tempo no centro da arena e realize uma maior deposição de bolos fecais na arena do teste, embora a exata função da resposta defecatória não seja clara (Nahas, 2003).

2.8.3 Análise Comportamental e o Etanol

O etanol induz vários efeitos centrais que conduzem a mudanças comportamentais verificadas em modelos animais e em humanos. O desenvolvimento de modelos animais que mimetizam exposições agudas ou longos períodos de uso de etanol, seleção de grupos que apresentam perfis de resistência e tolerância, e modelos de dependência (Pohorecky & Roberts, 1992; Cao et al., 1995; Uzbay & Kayaalp, 1995) contribuem para o esclarecimento das ações desempenhadas no organismo humano e, conseqüentemente para a busca de tratamentos voltados aos pacientes adictos.

Os protocolos de tratamento são bastante variáveis com relação à concentração da solução alcoólica empregada, via de administração, duração da exposição, tempo de abstinência e bateria de testes empregados antes, durante ou após o tratamento. Dessa forma, o etanol demonstrou causar alterações motoras (Keane & Leonard, 1983; Sindclair & Gustafsson, 1987; Alvarez et al., 1998; Miquel et al., 1999; Rajasekaran, 2000; Pires et al., 2001; Correa et al., 2001; Boerngen-Lacerda & Souza-Formigoni, 2001; Tayyabkhan et al., 2002), perturbações na aprendizagem e memória (Pereira et al., 1998), efeitos ansiolíticos e/ ou ansiogênicos (Blokland et al., 1992; Pokk et al., 2001; Ferreira et al., 2000; LaBuda & Fuchs; 2000; Boerngen-Lacerda & Souza-Formigoni, 2001; Mikolajczak et al., 2003), alterações na regulação da temperatura corporal (Sindclair & Gustafsson, 1987; Holloway et al., 1993) e efeito hipnótico (Vassiljev et al., 1998; Pokk et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes empregados durante o desenvolvimento deste trabalho incluem:

- ◆ Acetilcolina da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA);
- ◆ Ácido acético da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Ácido etileno diaminotetracético (EDTA) da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfônico (HEPES) da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA);
- ◆ Ácido-5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA);
- ◆ Ácido tiobarbitúrico (TBA) da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA);
- ◆ Ácido tricloroacético (TCA) da Synth (Labsynth, Diadema, SP);
- ◆ Ácido orto-fosfórico da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Albumina bovina da Reagen;
- ◆ Álcool Etilico da Vetec (Rio de Janeiro, RJ) e Belga Química (Santa Maria, RS);
- ◆ Álcool Polivinílico da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Citrato de sódio da Synth (Labsynth, Diadema, SP);
- ◆ Cloreto de cálcio da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);

- ◆ Cloreto de magnésio da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Cloreto de sódio da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Cloreto de potássio da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Coomassie azul-brilhante da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Dodecil- sulfato de sódio da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Fosfato de potássio monobásico e dibásico da Synth (Labsynth, Diadema, SP);
- ◆ Glicose da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Malondialdeído (MDA) da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA);
- ◆ Molibdato de amônio da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA);
- ◆ Sacarose da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Sulfato de magnésio da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) da Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- ◆ Verde de Malaquita da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Todos os demais reagentes empregados foram de pureza analítica e o preparo das soluções foi realizado com água destilada.

3.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho incluem:

- ◆ Balança Ohaus AS 200;
- ◆ Balança Bircba;
- ◆ Banho-Maria Coel;
- ◆ Centrífuga Bio Eng BE- 4004;
- ◆ Espectrofotômetro U 2001 da Hitachi;
- ◆ Espectrofotômetro CELM E225-D;
- ◆ Homogeneizador Marconi;
- ◆ Pipetas automáticas;
- ◆ Vidrarias volumétricas.

3.3 Modelo Experimental

3.3.1 Animais

Na realização dos experimentos foram utilizados ratos machos adultos Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram mantidos em número de 6-10 por caixa e aclimatados por um período de 5 dias anteriores ao início dos experimentos, no Biotério do Departamento de Química, a uma temperatura controlada de 21°C, sob ciclo de luz natural e com acesso livre a água e ração (Supra®).

3.3.2 Tratamentos

3.3.2.1 Tratamento Agudo

Os ratos submetidos aos tratamentos agudos tinham entre 3-5 meses e pesaram $319,09 \pm 25,47$ gramas. Foram divididos em 6 grupos, constituídos de 6 animais cada, sendo 1 grupo controle e os outros 5 grupos tratados que receberam a solução alcoólica nas doses de 0.8, 2.0, 4.0, 6.0 e 8.0 g etanol/Kg de peso corporal, por via orogástrica. O grupo controle recebeu o volume equivalente em água destilada.

Os ratos foram submetidos a um jejum de 12 horas anterior ao procedimento, recebendo apenas água. Na manhã do experimento foram pesados e calculou-se o volume de solução alcoólica para cada animal, a partir de uma solução alcoólica 30% elaborada por diluição em água destilada de uma solução 95%.

Após a gavagem, os animais voltavam para caixas individuais e eram enviados para outra sala, onde após uma hora eram avaliados em um labirinto em cruz-elevado e, a seguir em campo-aberto. Após completar uma hora e trinta minutos, os animais eram anestesiados com éter e sacrificados por punção cardíaca (Figura 6).

3.3.2.2 Tratamento Crônico

Os ratos submetidos ao tratamento crônico foram divididos em dois grupos de estudo. O primeiro grupo foi constituído por ratos controle (n= 12) e o segundo grupo representado pelos ratos tratados (n= 12), mantidos

em grupos de 6 animais por caixa (Figura 7). Os animais iniciaram o tratamento com 2 meses, sendo que o grupo controle pesava $217,08 \pm 17,76$ gramas e o grupo tratado $205,41 \pm 18,14$ gramas, sem haver diferença significativa entre o peso dos diferentes grupos.

O tratamento crônico consistiu na administração de uma solução alcoólica 20%, elaborada por diluição em água destilada de uma solução 95%, com única fonte de líquido para o grupo tratado durante 31 semanas, enquanto que o grupo controle recebia água destilada. A oferta de ração foi livre para os dois grupos.

A quantidade de água, solução alcoólica e ração foi avaliada duas vezes por semana, usando um intervalo de 24 horas para verificar o consumo diário. Os animais também tiveram seus pesos avaliados semanalmente.

Após 31 semanas de tratamento, os animais foram submetidos a 48 horas de abstinência, ou seja retirou-se a solução alcoólica e ofereceu-se água destilada. Então, os ratos foram avaliados no labirinto em cruz elevado e no campo-aberto, sendo posteriormente anestesiados com éter e sacrificados por punção cardíaca.

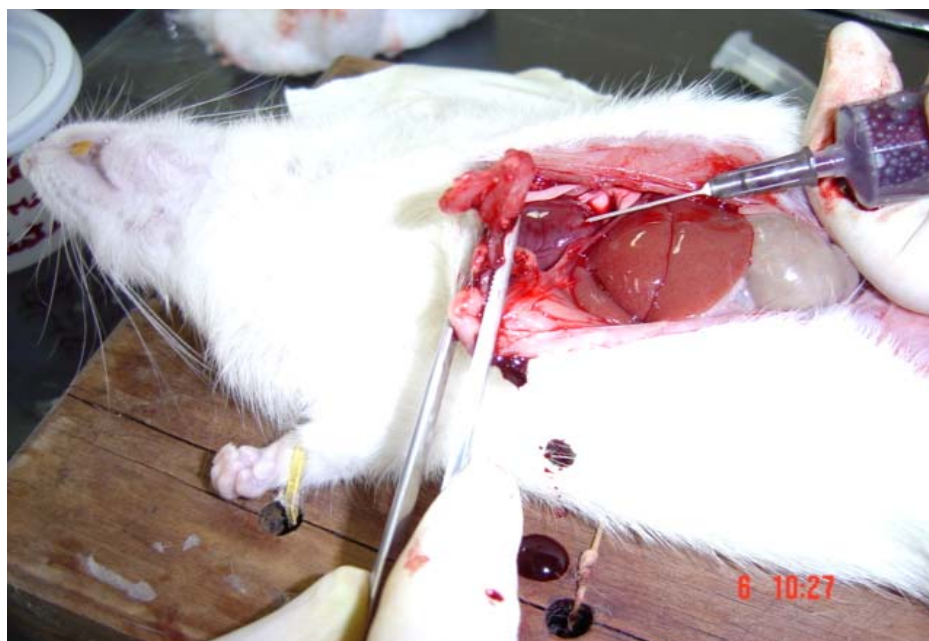


FIGURA 6: Punção cardíaca realizada nos ratos submetidos aos tratamentos agudo e crônico com etanol.



FIGURA 7: Ratos submetidos ao tratamento crônico com etanol.

3.3.3 Preparações teciduais

3.3.3.1 Obtenção dos constituintes sangüíneos

A punção cardíaca foi realizada utilizando-se uma seringa de 10 ml pré-carregada com 1 ml de citrato de sódio 3,8% e com outra seringa de 10 ou 3 ml sem anticoagulante para posterior separação de soro.

O sangue anticoagulado foi depositado em tubos e levado para centrifugação a 160 g/30 minutos para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), adaptado de Pilla et al. (1996). O PRP foi centrifugado a 1400 g/15 minutos e o pellet obtido de plaquetas foi acrescentado de Tampão HEPES 3.5 mM, contendo KCl 2.5 mM, NaCl 142 mM e Glicose 5.5 mM e centrifugado 1400 g/ 15 minutos/ 2 vezes.

O pellet de plaquetas foi então ressuspendido em solução tampão para posterior determinação de proteína e ensaios enzimáticos, sendo empregado somente no dia de sua preparação.

A fração de sangue coletada sem anticoagulante foi centrifugada a 1400 g/30 minutos para a separação do soro que foi imediatamente congelado para o ensaio posterior de determinação de peroxidação lipídica.

3.3.3.2 Obtenção de fígado e rins

Os ratos submetidos aos tratamentos agudo e crônico tiveram fígado e rins retirados para a determinação de peroxidação lipídica . O ensaio das amostras do tratamento agudo foi realizado no dia do sacrifício, enquanto que os órgãos dos animais submetidos ao tratamento crônico foram

pesados, medidos e congelados, realizando-se a determinação posteriormente.

3.3.3.3 Dissecção do tecido cerebral

Os ratos submetidos aos tratamentos agudo e crônico tiveram as cabeças retiradas com o auxílio de uma tesoura e o tecido cerebral foi dissecado nas seguintes estruturas: hipocampo, cerebelo, hipotálamo, estriado e córtex.

A calota craniana foi aberta e as estruturas foram sendo recolhidas sob uma placa de Petri invertida sobre gelo e coberta por papel filtro umedecido com Médium I pH 7.5, constituído por sacarose 0.32 M, Tris 1.0 M, EDTA 0.1 mM. As estruturas foram então transferidas para tubos contendo Médium I e, então foram homogeneizadas e congeladas para posterior ensaio da enzima acetilcolinesterase.

No ensaio que visava a determinação de peroxidação lipídica nas estruturas cerebrais de ratos expostos a doses de 0,8; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 g etanol/kg de peso corporal, em vez de Médium I para umedecer e homogeneizar as estruturas utilizou-se Tris- HCl 50 mM pH 7.4.

3.3.4 Determinação de Proteína

A determinação de proteína nos diferentes ensaios realizados foi através do Método de Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão.

3.3.5 Determinações Enzimáticas

3.3.5.1 NTPDase (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD39, E.C.3.6.1.5)

A atividade da NTPDase foi determinada de acordo com Pilla et al. (1996), através da medida da absorvância a 630 nm do fosfato inorgânico liberado a partir da hidrólise do ATP e ADP, sendo que as amostras foram ensaiadas em triplicata.

O sistema empregado para a determinação da atividade da NTPDase continha KCl 5.0 mM, CaCl₂ 7.0 mM, NaCl 120 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Glicose 60 mM e água destilada em um volume final de 200 µl.

A pré-incubação de 10 minutos a 37°C teve início com a adição de 20 µl das plaquetas ressuspendidas no tampão HEPES para uma concentração de 0.4-0.6 mg proteína/ ml. A reação enzimática iniciou com a adição de 20 µl dos substratos ATP 10 mM ou ADP 10 mM, para uma concentração final de 1.0 mM. Após 60 minutos a reação foi suspensa pela adição de 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) 10%, para uma concentração final de 5%.

Os tubos foram mantidos no gelo até a quantificação do fosfato inorgânico liberado através do método de Chan et al. (1986), usando verde-malaquita como reagente de cor. A atividade enzimática foi expressa como nmol de fosfato liberado/ minuto/ mg de proteína.

3.3.5.2 5'- Nucleotidase (CD 73, E.C. 3.1.3.5)

A atividade da 5'- nucleotidase foi determinada pelo Método de Heymann et al. (1984), baseado na medida da absorvância a 630 nm do fosfato inorgânico liberado a partir da hidrólise do AMP, sendo que todas as amostras foram ensaiadas em triplicata.

O sistema empregado para a determinação da atividade enzimática continha MgCl₂ 10 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7.5 e água destilada, em um volume final de 200 µl.

A pré-incubação de 10 minutos a 37°C teve início com a adição de 20 µl das plaquetas ressuspensas no tampão HEPES para uma concentração de 0.4-0.6 mg proteína/ml. A reação enzimática iniciou com a adição de 20 µl do substrato AMP 20 mM, para uma concentração final de 2.0 mM. Após 60 minutos a reação foi suspensa pela adição de 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) 10%, para uma concentração final de 5%.

Os tubos foram mantidos no gelo até a quantificação do fosfato inorgânico liberado através do método de Chan et al. (1986), usando verde-malaquita como reagente de cor. A atividade enzimática foi expressa como nmol de fosfato liberado/ minuto/ mg de proteína.

3.3.5.3 Acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7)

A atividade da acetilcolinesterase foi determinada, usando como material enzimático, o sobrenadante do material homogeneizado de córtex, estriado, hipocampo, hipotálamo e cerebelo através do Método de Ellman et al. (1961), modificado por Villescas et al. (1981). O método baseia-se na

mensuração da absorvância a 412 nm do íon formado 5- tio- 2-nitrobenzóico, a partir da reação entre a tiocolina liberada pela ação da acetilcolinesterase sobre o substrato acetiltiocolina e o DTNB (ácido 5-5'-ditio-bis- (2-nitrobenzóico)). Todas as amostras foram ensaiadas em duplicatas ou triplicatas.

O sistema de incubação continha Tampão Fosfato 100 mM pH 7.5 e DTNB 10 mM pH 7.0. A pré-incubação de 2 minutos a 25°C iniciou-se com a adição de 100 µl do sobrenadante do homogeneizado das estruturas cerebrais, sendo que a reação teve início com a adição de 200 µl do substrato acetiltiocolina 8.0 mM, para uma concentração final de 0.8 mM.

As leituras foram realizadas a cada 30 segundos durante 2 minutos, expressando-se o resultado final em µmoles de acetiltiocolina hidrolisada/hora/ mg de proteína.

3.3.6 Determinação da Peroxidação Lipídica

A determinação de peroxidação lipídica quantifica o malondialdeído (MDA) formado nas amostras analisadas, como descrito por Ohkawa et al. (1979).

Amostras provenientes de fígado, rim e estruturas cerebrais foram homogeneizadas na proporção de 1g tecido:10 ml de Tris- HCl 50 mM pH 7.4 e centrifugadas a 2000 rpm/10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação do MDA e quantificação da proteína.

O meio empregado para a determinação continha 500 µl de ácido tiobarbitúrico 0.8%, 500 µl de ácido acético 2.5 M pH 3.4, 200 µl de dodecil- sulfato de sódio 8.1% e 10 µl de água destilada, adicionando-se

então 200 µl do sobrenadante. Os tubos contendo o meio e as amostras foram então incubados durante 2 horas a 95°C.

Na determinação da peroxidação lipídica no soro dos animais submetidos aos tratamentos agudo e crônico, utilizou-se um meio contendo 1000 µl de ácido ortofosfórico 0.24 M, 250 µl de ácido tiobarbitúrico 0.8%, 550 µl de água destilada, ao qual adicionou-se 200 µl do soro. Os tubos contendo o meio e as amostras foram então incubados durante 45 minutos a 45°C.

As leituras foram realizadas em 532 nm e os resultados expressos em nmol MDA/ mg de proteína e nmol MDA/ ml de soro.

3.3.7 Avaliação Comportamental

3.3.7.1 Labirinto em cruz elevado (Elevated plus- maze)

O aparato do labirinto em cruz elevado consistia de uma estrutura de madeira em formato de cruz, composta de uma plataforma central, dois braços abertos e dois braços fechados, elevados a 50 cm do chão, sendo que os braços mediam 50 x 10 cm e a parede que fechava os braços fechados media 40 cm de altura. Os animais foram colocados na plataforma central do aparato voltados para a parte aberta e avaliou-se durante 5 minutos a frequência e duração da permanência nas partes abertas e fechadas. O aparato foi limpo entre as avaliações com uma solução alcoólica 30%.

3.3.7.2 Teste do Campo-Aberto (Open- Field Test)

Imediatamente após a avaliação no labirinto em cruz elevado os ratos eram transferidos para a arena do teste de avaliação em campo-aberto. A arena do teste possuía um diâmetro de 56 cm, sendo que a superfície era dividida em 10 áreas de igual tamanho. As 5 áreas que possuíam as bordas limitadas por paredes foram denominadas periféricas, enquanto que as 5 áreas remanescentes e que não tinham contato com a parede do aparato, foram denominadas centrais.

Avaliou-se durante 5 minutos o número de linhas cruzadas centrais e periféricas, a quantidade de bolos fecais depositados na arena do teste, frequência de orientação (“rearing”), quando o animal permanece apoiado somente nas patas traseiras, frequência e duração de autolimpeza (“grooming”) e o tempo que o animal permaneceu parado. O aparato foi limpo entre as avaliações com uma solução alcoólica 30%.

3.3.8 Análise Histológica

As amostras de tecido hepático dos animais submetidos ao tratamento crônico com etanol foram coletadas e imediatamente fixadas em solução BOUIN. Posteriormente, estas amostras foram desidratadas em uma série crescente de álcoois, iniciando-se com álcool 70% até álcool absoluto. Após a desidratação, as amostras foram colocadas por uma hora em xileno, sendo depois disso pré-infiltradas em parafina com ponto de fusão 46^oC -48^oC e logo após em parafina de ponto de fusão de 56^oC-58^oC, com a qual foram feitos os blocos para posterior corte feito em micrótomo.

Os cortes de 6μ de espessura foram distendidos em banho-maria e colocados em lâminas que foram levadas à estufa por um tempo aproximado de 1h. Após, as lâminas contendo os cortes foram colocadas por 5 minutos em xileno, depois passaram por uma série alcoólica decrescente, iniciando-se com álcool 80% até 40% terminando em água destilada, sendo o tempo de permanência em cada um de 3 minutos. Depois da água, as amostras foram colocadas por 2 minutos no corante hematoxilina e por 2 minutos no corante eosina, sendo que após os cortes foram cobertos com lamínulas usando-se entelam e realizou-se a observação ao microscópio óptico.

3.3.9 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados através do Teste t e de análise de variância de uma via (one way ANOVA), seguida dos testes de Duncan ou Tukey- Kramer, com o auxílio dos programas GraphPad InStat (versão 2.05, 1994) e SAS (Statistical Analysis System, versão 8.02, 1999). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. Os gráficos foram obtidos através do programa Slide Write Plus 4.0 (Advanced Graphics Software Inc., 1996).

4. RESULTADOS

4.1 Tratamento Agudo

4.1.1 Atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase

A atividade enzimática da NTPDase com o substrato ATP teve variação significativa entre os diferentes grupos [F (5,24)=23.61]. Ocorreu aumento de 44% e 35% nas doses de 0.8g/kg e 2.0g/kg, respectivamente, quando comparado com o grupo controle ($p < 0.0001$). Com o aumento da dose observou-se inibição significativa da atividade enzimática de 31% na dose de 4.0g/kg, 49% na dose de 6.0g/kg e de 77% na dose de 8.0g/kg, quando em comparação com o grupo controle ($p < 0.0001$) (Figura 8).

A atividade da NTPDase com o substrato ADP apresentou tendência ao aumento, de 25% e de 13% nas doses de 0.8g/kg e 2.0g/kg, respectivamente. Ocorreram alterações significativas entre os diferentes grupos [F (5,24)=20.43], sendo que houve inibição de 41% na dose de 4.0g/kg, 66% na dose de 6.0g/kg e de 62% na dose de 8.0g/kg, quando em comparação com o grupo controle ($p < 0.0001$) (Figura 9).

A atividade da enzima 5'-nucleotidase apresentou tendência ao aumento, de 36% e de 3% nas doses de 0.8g/kg e 2.0g/kg, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Com o aumento da dose observou-se alteração significativa [F (5,24)=11.5], sendo que ocorreu inibição de 45% na dose de 4.0g/kg, 64% na dose de 6.0g/kg e de 100% na dose de 8.0g/kg, quando em comparação ao grupo controle ($p < 0.0001$) (Figura 10).

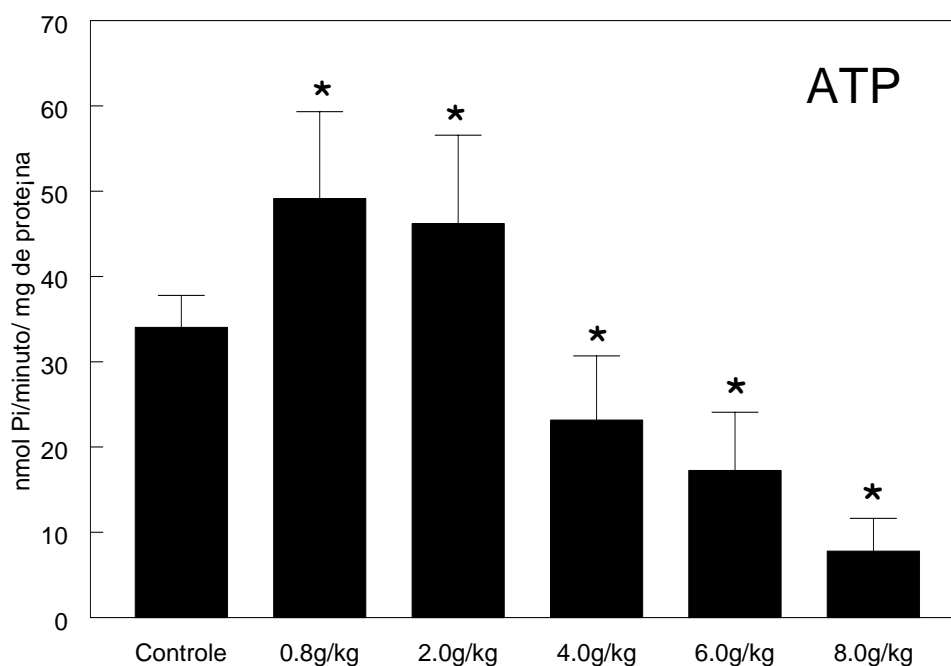


FIGURA 8: Efeito da administração aguda de etanol nas doses de 0.8, 2.0, 4.0, 6.0 e 8.0g/kg sobre a atividade da enzima NTPDase de plaquetas de ratos com o substrato ATP. Resultados expressos em η mol Pi liberado/minuto/mg de proteína. *Diferente do grupo controle para $p < 0.0001$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Duncan, média \pm desvio-padrão (n=5).

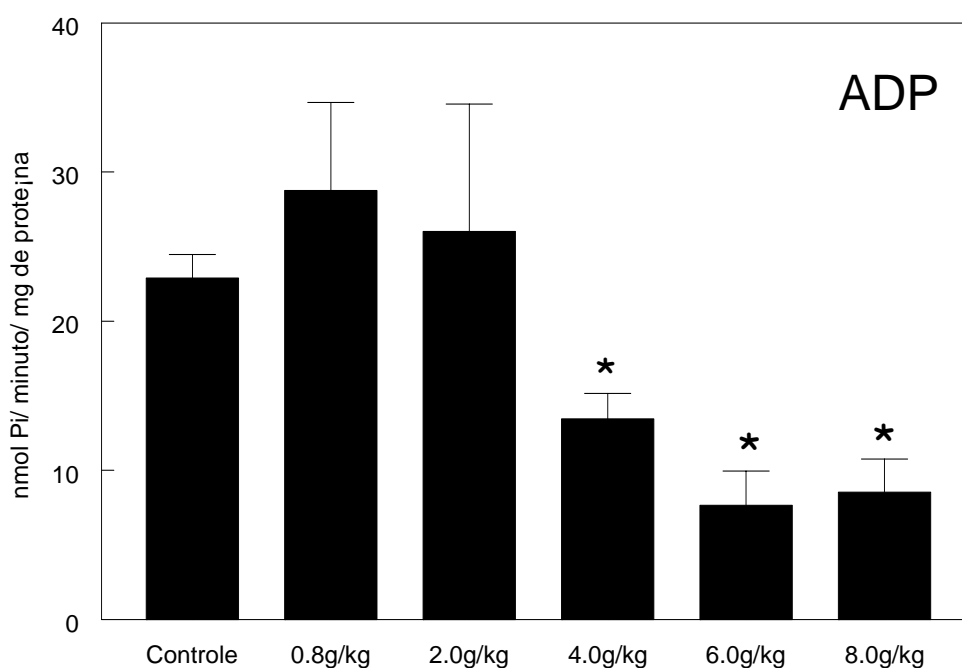


FIGURA 9: Efeito da administração aguda de etanol nas doses de 0.8, 2.0, 4.0, 6.0 e 8.0g/kg sobre a atividade da enzima NTPDase de plaquetas de ratos com o substrato ADP. Resultados expressos em nmol Pi liberado/minuto/mg de proteína. *Diferente do grupo controle para $p < 0.0001$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Duncan, média \pm desvio-padrão (n=5).

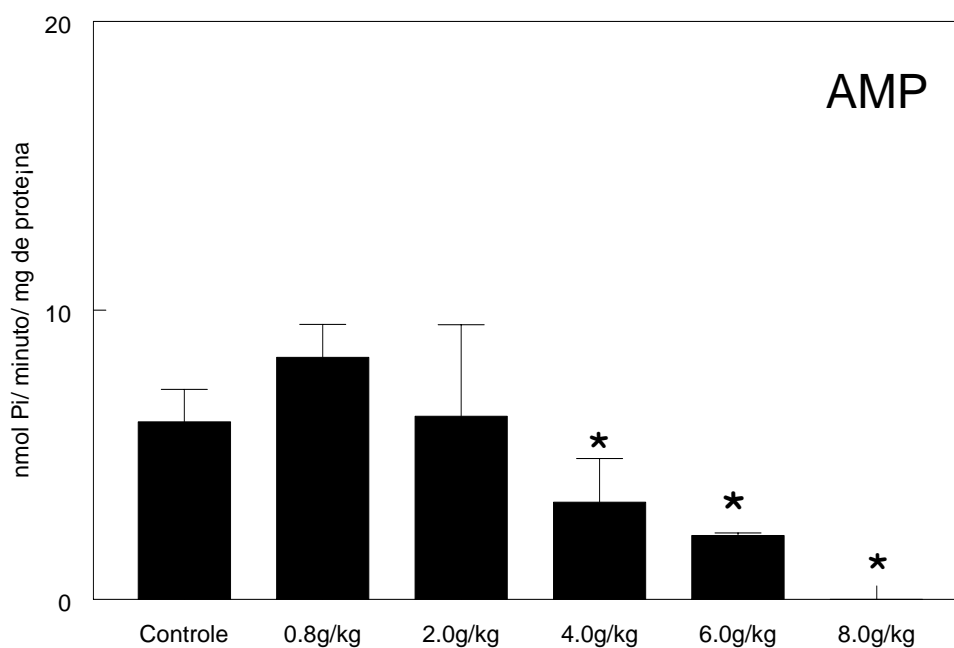


FIGURA 10: Efeito da administração aguda de etanol nas doses de 0.8, 2.0, 4.0, 6.0 e 8.0g/kg sobre a atividade da enzima 5'-nucleotidase de plaquetas de ratos com o substrato AMP. Resultados expressos em η mol Pi liberado/minuto/mg de proteína. *Diferente do grupo controle para $p < 0.0001$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Duncan, média \pm desvio-padrão (n=5).

4.1.2 Atividade da enzima Acetilcolinesterase

As atividades da enzima acetilcolinesterase determinadas no córtex, hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado dos ratos submetidos ao tratamento agudo estão demonstradas na tabela 1.

Na determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex ocorreu alteração significativa entre os diferentes grupos [F(5,24)=26.20], sendo que houve inibição nas doses de 6.0 e 8.0g/kg, quando em comparação com o grupo controle ($p < 0.0001$). No hipotálamo ocorreu alteração significativa [F(5,24)=20.29], sendo que houve inibição nas doses de 6.0 e 8.0g/kg, quando comparado ao grupo controle ($p < 0.0001$). Alterações significativas entre os diferentes grupos também ocorreram no hipocampo [F(5,24)=44.58], cerebelo [F(5,24)=22.08] e estriado [F(5,24)=71.80], onde se podem observar inibições da atividade da enzima acetilcolinesterase nas doses de 6.0 e 8.0g/kg, quando em comparação ao grupo controle ($p < 0.0001$).

TABELA 1: Atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex, hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado dos ratos submetidos ao tratamento agudo com etanol. Os resultados estão expressos em μ moles de acetiltiocolina hidrolisada/ hora/ mg de proteína.

Grupos	Córtex	Hipotálamo	Hipocampo	Cerebelo	Estriado
Controle	3.74 ± 0.34	4.43 ± 0.11	6.01 ± 1.28	1.93 ± 0.22	16.67 ± 0.95
Dose de 0.8 g/kg	3.94 ± 0.45	4.12 ± 0.11	5.98 ± 1.23	1.87 ± 0.25	16.43 ± 0.86
Dose de 2.0 g/kg	4.32 ± 0.41	4.06 ± 0.52	5.89 ± 1.26	1.76 ± 0.13	16.14 ± 2.66
Dose de 4.0 g/kg	3.97 ± 0.46	4.09 ± 0.26	5.84 ± 0.73	1.96 ± 0.18	15.62 ± 1.43
Dose de 6.0 g/kg	$2.49 \pm 0.26^*$	$2.24 \pm 0.18^*$	$1.32 \pm 0.23^*$	$1.39 \pm 0.05^*$	$6.72 \pm 0.78^*$
Dose de 8.0 g/kg	$2.61 \pm 0.30^*$	$2.47 \pm 0.29^*$	$1.78 \pm 0.24^*$	$1.28 \pm 0.14^*$	$6.98 \pm 0.42^*$

* Diferente do grupo controle, $p < 0.001$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey-Kramer, média \pm desvio padrão (n=5-6).

4.1.3 Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus-Maze)

Os diferentes parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado dos ratos submetidos ao tratamento agudo com etanol estão demonstrados na tabela 2.

Com relação à frequência que os ratos entraram na parte fechada do aparato houve diferença significativa entre os diferentes grupos [$F(3,16)=5.45$], sendo que o grupo tratado com 4.0g/kg teve uma maior frequência de entradas, quando comparado ao grupo controle ($p<0.05$), embora não tenha ocorrido diferença significativa com relação ao tempo de permanência entre os grupos tratados e o grupo controle [$F(3,16)=0.12$; $p=0.94$]. Na análise referente à frequência de entrada na parte aberta não houve diferença significativa entre os diferentes grupos [$F(3,16)=0.36$; $p=0.78$] e também não houve diferença significativa com relação ao tempo de permanência na parte aberta [$F(3,16)=2.31$; $p=0.11$].

TABELA 2: Efeito do tratamento agudo com etanol em ratos nos diferentes parâmetros de comportamento avaliados no labirinto em cruz elevado

Parâmetros Grupos	Frequência na PF (n)	Tempo PF (minutos)	Frequência na PA (n)	Tempo PA (minutos)
Controle	2.62 ± 1.59	3.49 ± 1.59	2.71 ± 1.79	1.58 ± 1.50
Dose de 0.8g/kg	1.83 ± 0.98	3.70 ± 1.03	2.20 ± 0.44	1.02 ± 1.09
Dose de 2.0g/kg	1.50 ± 0.57	3.18 ± 2.04	3.25 ± 1.25	2.94 ± 2.16
Dose de 4.0g/kg	5.50 ± 0.7*	3.06 ± 2.60	3.66 ± 4.61	3.62 ± 1.29
Dose de 6.0g/kg	-	-	-	-
Dose de 8.0g/kg	-	-	-	-

PF= parte fechada, PA= parte aberta, n= número de vezes, - Dados não disponíveis, pois os ratos apresentaram-se anestesiados nessas doses.

* Diferente do grupo controle, $p < 0.05$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey-Kramer, média ± desvio padrão (n=5,6).

4.1.4 Comportamento no Campo-Aberto (Open-Field Test)

Os diferentes parâmetros avaliados no comportamento em campo-aberto dos ratos submetidos ao tratamento agudo com etanol estão demonstrados na tabela 3.

Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle com relação aos cruzamentos centrais, ou seja ao número de espaços centrais percorridos na arena do teste [$F(4,20)= 1.735$; $p=0.1819$] e nos cruzamentos periféricos, ou seja o número de espaços percorridos na periferia da arena do teste [$F(4,20)= 0.922$; $p=0.471$], inclusive quando esses dados são analisados em conjunto para indicar o total de espaços percorridos [$F(4,20)= 1.313$; $p=0.299$]. Com relação à deposição de bolos fecais na arena do teste não houve diferença significativa entre o grupo tratado na dose de 0.8g/kg e o grupo controle [$F=0.415$; $p=0.5$]. O reflexo de orientação não variou entre os grupos tratados e o grupo controle [$F(3,15)= 0.415$; $p=0.74$]. Na avaliação da frequência de autolimpeza não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle [$F(2,10)=0.788$; $p=0.48$], mas com relação ao tempo (expresso em minutos) houve diferença significativa [$F(2,10)=12.42$], que ocorreu entre o grupo tratado com a dose de 2.0g/kg e o grupo controle ($p<0.01$). Com relação ao tempo que os ratos permaneceram parados não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle [$F(4,25)=7.089$; $p>0.05$].

TABELA 3: Efeito do tratamento agudo com etanol em diferentes parâmetros de comportamento avaliados em ratos no Campo-Aberto

Parâmetros Grupos	Cruzamentos	Cruzamentos	Bolos	Reflexo de	Autolimpeza	Autolimpeza	Tempo
	Centrais (freq)	Periféricos (freq)	fecais (número)	Orientação (freq)	(freq)	(t em minutos)	parado (minutos)
Controle	7.50 ± 5.73	17.75 ± 10.10	2.25 ± 0.95	5.75 ± 4.77	2.20 ± 1.30	0.30 ± 0.26	3.53 ± 0.79
Dose de 0.8g/kg	2.83 ± 2.22	13.83 ± 8.51	1.75 ± 0.95	5.20 ± 4.32	2.60 ± 1.94	0.56 ± 0.39	2.27 ± 1.37
Dose de 2.0g/kg	4.00 ± 3.39	15.40 ± 13.66	0	5.00 ± 6.08	4.00 ± 3.00	1.92 ± 0.78*	2.42 ± 1.50
Dose de 4.0g/kg	3.50 ± 2.64	9.66 ± 2.88	0	2.33 ± 1.52	0	0	4.43 ± 0.53
Dose de 6.0g/kg	1.50 ± 0.70	4.50 ± 2.12	0	0	0	0	4.72 ± 0.42
Dose de 8.0g/kg	-	-	-	-	-	-	-

Freq= frequência ou número de vezes, t= tempo, - Ratos apresentaram-se anestesiados nessa dose. * Diferente do grupo controle, $p < 0.01$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey-Kramer, média ± desvio padrão (n=5-6).

4.1.5 Peroxidação Lipídica

A análise da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos fígados dos ratos submetidos ao tratamento agudo com etanol demonstrou alteração significativa entre os diferentes grupos [F(5,27)=31.21]. Todas as doses empregadas causaram aumento na produção de TBARS e, conseqüentemente na peroxidação lipídica, quando em comparação ao grupo controle ($p < 0.0001$) (Figura 11).

Com relação à análise de TBARS nos rins, também ocorreu alteração significativa na peroxidação lipídica [F(5,27)=23.74], sendo que todas as doses empregadas causaram aumento na produção de TBARS, quando em comparação ao grupo controle ($p < 0.0001$) (Figura 12).

Na determinação de TBARS no soro dos ratos submetidos ao tratamento agudo com etanol houve alteração significativa [F(5,27)=12.64], sendo que ocorreu aumento na produção de TBARS em todas as doses empregadas, quando em comparação ao grupo controle ($p < 0.0001$) (Figura 13).

Na determinação de TBARS no córtex, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e estriado dos ratos submetidos ao tratamento agudo com etanol os resultados apresentaram variações de acordo com a região estudada (Tabela 4). No córtex não ocorreu diferença significativa entre os diferentes grupos estudados [F(5,27)=1.65; $p=0.16$]. No hipocampo ocorreu alteração significativa entre os diferentes grupos [F(5,27)=15.75], sendo que se pode verificar aumento na produção de TBARS nas doses de 4.0, 6.0 e 8.0g/kg, quando em comparação ao grupo controle ($p < 0.0001$). No hipotálamo se evidenciou alteração significativa [F(5,27)= 3.25], sendo que ocorreu

aumento na produção de TBARS na dose de 8.0g/kg, quando em comparação ao grupo controle ($p < 0.05$). Já no cerebelo ocorreu alteração significativa [$F(5,27) = 9.85$], sendo que as doses de 4.0 e 8.0g/kg provocaram aumento na produção de TBARS, quando em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$), enquanto que no estriado ocorreu alteração significativa [$F(5,27) = 11.16$], onde o aumento na produção de TBARS foi evidenciado nas doses de 4.0, 6.0 e 8.0g/kg, quando comparado ao grupo controle ($p < 0.0001$).

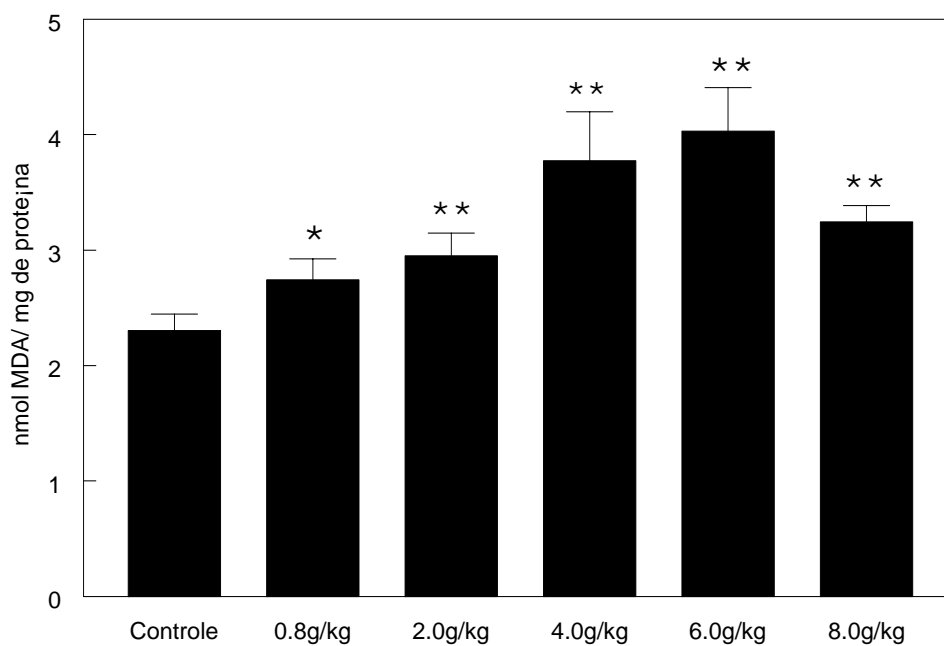


FIGURA 11: Efeito do tratamento agudo com etanol sobre a peroxidação lipídica em fígado de ratos. Resultados expressos em η mol MDA/ mg de proteína. * Diferente do grupo controle, $p < 0.05$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey Kramer, média \pm desvio padrão (n=5-6); **Diferente do grupo controle, $p < 0.001$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey Kramer, média \pm desvio padrão (n=5-6).

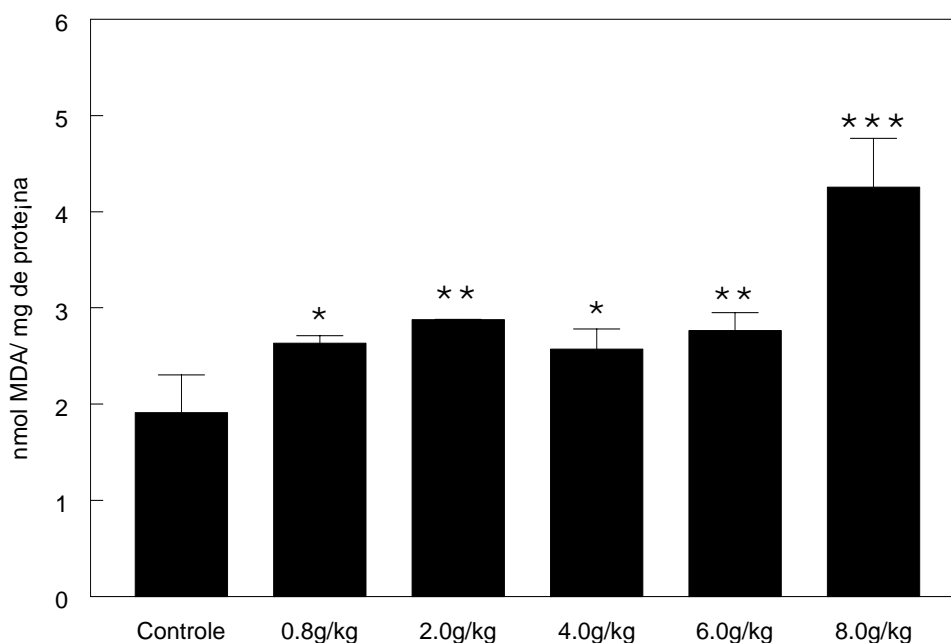


FIGURA 12: Efeito do tratamento agudo com etanol sobre a peroxidação lipídica em rim de ratos. Resultados expressos em η mol MDA/ mg de proteína. * Diferente do grupo controle, $p < 0.05$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey Kramer, média \pm desvio padrão ($n=5-6$); **Diferente do grupo controle, $p < 0.01$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey Kramer, média \pm desvio padrão ($n=5-6$); *** Diferente do grupo controle, $p < 0.001$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey- Kramer, média \pm desvio padrão ($n=5-6$);

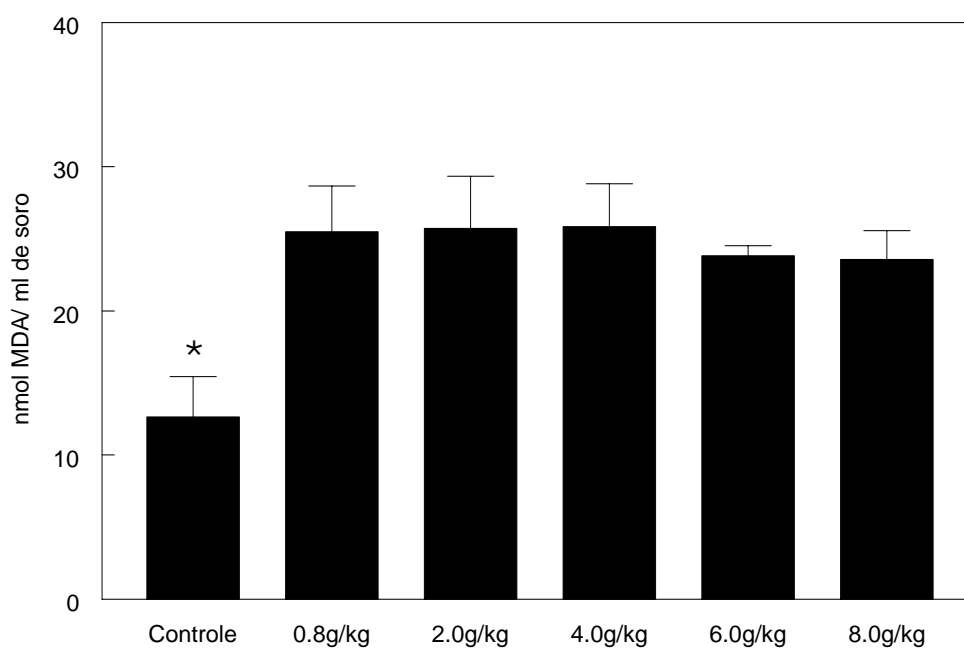


FIGURA 13: Efeito do tratamento agudo com etanol sobre a peroxidação lipídica em soro de ratos. Resultados expressos em η mol MDA/ ml de soro. * Diferente dos grupos tratados nas doses de 0.8g/kg, 2.0g/kg, 4.0g/kg, 6.0g/kg e 8.0g/kg, $p < 0.001$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey-Kramer, média \pm desvio padrão (n=5-6);

TABELA 4: Efeito do tratamento agudo com etanol na peroxidação lipídica em córtex, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e estriado de ratos. Os resultados estão expressos em $\eta\text{mol MDA/ mg}$ de proteína.

Grupo	Córtex	Hipotálamo	Hipocampo	Cerebelo	Estriado
Controle	1.13 \pm 0.13	1.24 \pm 0.46	1.44 \pm 0.23	0.74 \pm 0.13	1.39 \pm 0.58
Dose de 0.8 g/kg	0.94 \pm 0.04	1.79 \pm 0.23	1.76 \pm 0.09	0.63 \pm 0.11	2.07 \pm 0.17
Dose de 2.0 g/kg	1.04 \pm 0.09	1.22 \pm 0.33	1.91 \pm 0.28	0.58 \pm 0.03	1.10 \pm 0.22
Dose de 4.0 g/kg	0.96 \pm 0.20	1.42 \pm 0.24	2.08 \pm 0.12*	1.20 \pm 0.15**	2.33 \pm 0.29*
Dose de 6.0 g/kg	0.93 \pm 0.14	1.23 \pm 0.24	2.33 \pm 0.24**	0.88 \pm 0.21	2.63 \pm 0.01**
Dose de 8.0 g/kg	1.03 \pm 0.28	2.15 \pm 0.82*	2.45 \pm 0.07*	1.07 \pm 0.21*	2.34 \pm 0.12*

* Diferente do grupo controle, $p < 0.05$, ** Diferente do grupo controle, $p < 0.01$, ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey Kramer, média \pm desvio padrão (n=5-6);

4.2 Tratamento Crônico

4.2.1 Modelo experimental

O tratamento crônico iniciou com 12 ratos no grupo controle e 12 ratos no grupo tratado, sendo que 2 ratos que pertenciam ao grupo tratado foram descartados durante o tratamento devido ao aparecimento de tumores, posteriormente identificados na necropsia (Departamento de Patologia, Seção de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário, UFSM) como carcinoma indiferenciado de pele em um dos animais e osteossarcoma no outro (ANEXOS 1 e 2).

A ingestão diária de ração e líquido (solução alcoólica ou água destilada) durante as 31 semanas de tratamento demonstrou diferença significativa entre os grupos controle e tratado ($p < 0.0001$, Teste t, média \pm desvio padrão), sendo que esses dados podem ser observados nas figuras 14 e 15. A média diária de consumo líquido no decorrer do tratamento do grupo controle foi de 291.37 ± 82.62 ml de água destilada, enquanto que no grupo tratado o consumo de solução alcoólica foi de 109.13 ± 17 ml, equivalente a 21.82 ± 3.4 g de etanol ou cerca de 11g de etanol/kg de peso/dia para cada rato tratado. A média diária do consumo de ração foi de 101.57 ± 19.26 g no grupo controle e de 62.99 ± 8.77 g no grupo tratado.

A avaliação semanal do peso dos ratos dos grupos controle e tratado demonstrou que a partir da sexta semana de tratamento ocorreu diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0.05$, Teste t, média \pm desvio padrão), sendo que ao final do tratamento os ratos do grupo

controle pesaram $362.72 \pm 35.73\text{g}$ e os ratos tratados pesaram $320.5 \pm 25.54\text{g}$. A avaliação do peso dos ratos dos grupos controle e tratado nas 31 semanas de tratamento pode ser visualizada na figura 16 e a comparação entre dois ratos que representam o grupo controle e tratado na figura 17.

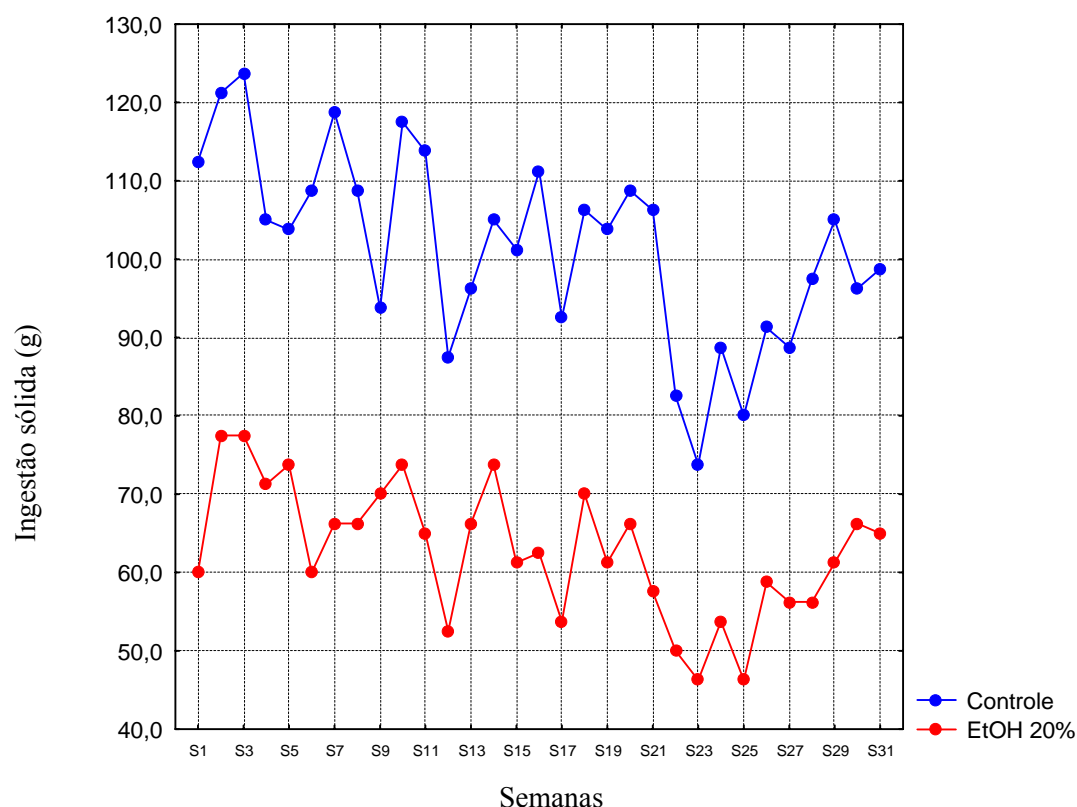


FIGURA 14: Ingestão sólida de ração em gramas do grupo controle e do grupo tratado com solução alcoólica 20% no decorrer das 31 semanas de tratamento. Cada ponto representa a média de duas observações diárias realizadas na semana, sendo que os valores diferem entre os grupos ($p < 0.0001$, Teste t, média \pm desvio padrão, $n=2$).

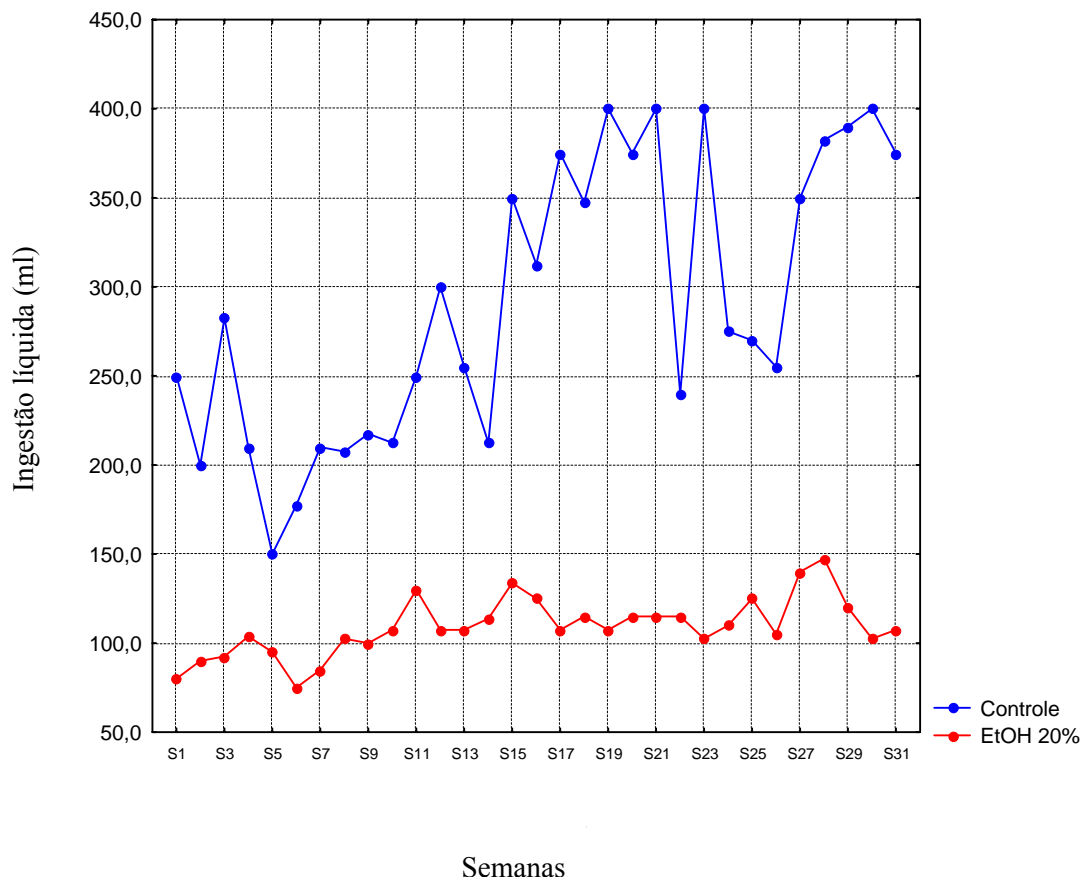


FIGURA 15: Ingestão líquida de água (ml) do grupo controle e solução alcoólica 20% (ml) do grupo tratado no decorrer das 31 semanas de tratamento. Cada ponto representa a média de duas observações diárias realizadas na semana, sendo que os valores diferem entre os grupos ($p < 0.0001$, Teste t, média \pm desvio padrão, $n=2$).

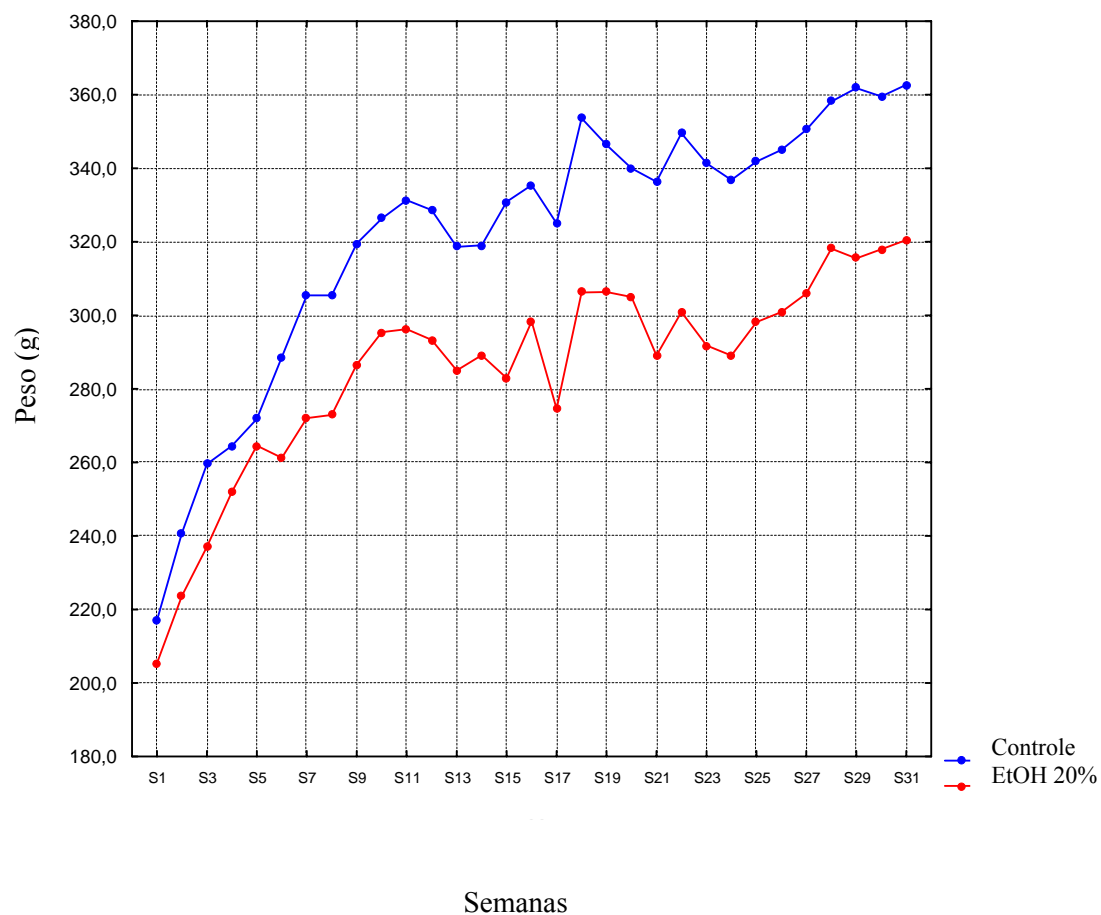


FIGURA 16: Peso em gramas do grupo controle e do grupo tratado com solução alcoólica 20% no decorrer das 31 semanas de tratamento. Cada ponto representa a média de uma observação semanal, sendo que os valores diferem entre os grupos ($p < 0.0001$, Teste t, média \pm desvio padrão, $n=2$) a partir da sexta semana de tratamento.



FIGURA 17: Comparação entre o peso do rato que representa o grupo controle (abaixo) e o rato que representa o grupo tratado com etanol durante 31 semanas (acima).

A análise morfométrica do fígado e rim dos ratos submetidos ao tratamento crônico com etanol demonstrou diminuição significativa no tamanho do fígado e no tamanho do rim direito do grupo tratado ($p < 0.05$, Teste t, média \pm desvio padrão), embora o peso desses órgãos não tenha apresentado diferença significativa entre os grupos controle e tratado (Tabela 5).

TABELA 5: Análise Morfométrica do fígado e rim de ratos dos grupos controle e tratado crônico com solução alcoólica 20%

Parâmetros	Grupos	Grupo Controle	Grupo Tratado EtOH 20%
Peso do fígado (g)		9.58 \pm 0.88	9.92 \pm 1.05
Tamanho do fígado (cm)		5.45 \pm 0.38	5.09 \pm 0.36*
Peso do rim esquerdo (g)		1.01 \pm 0.07	0.98 \pm 0.08
Tamanho do rim esquerdo (cm)		1.87 \pm 0.09	1.81 \pm 0.09
Peso do rim direito (g)		1.05 \pm 0.09	1.01 \pm 0.24
Tamanho do rim direito (cm)		1.84 \pm 0.10	1.71 \pm 0.07*

* $p < 0.05$, Teste t, média \pm desvio padrão (n=10-11).

A análise histológica do fígado dos ratos submetidos ao tratamento crônico com etanol demonstrou a ocorrência de tumefação turva (também denominada tumefação celular, degeneração granular, degeneração albuminosa ou ainda, degeneração grânulo-albuminosa). Essa alteração foi evidenciada no exame microscópico pela visualização do citoplasma opaco, granuloso, turvo e com mascaramento do núcleo, observando-se ainda aumento do volume celular, com alteração da proporção citoplasma-

núcleo e vacuolização citoplasmática, sendo que os vacúolos são pequenos e não apresentam compartimentalização (Figuras 18-21).

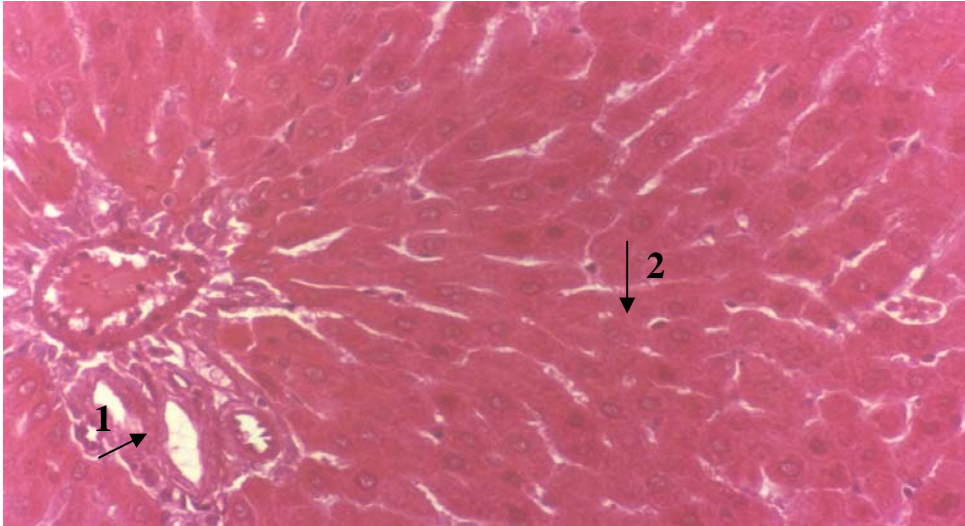


FIGURA 18: Amostra de fígado de um rato do grupo controle. Observar espaço porta (seta 1) e os cordões de hepatócitos (seta 2). HE.Aum.400x.

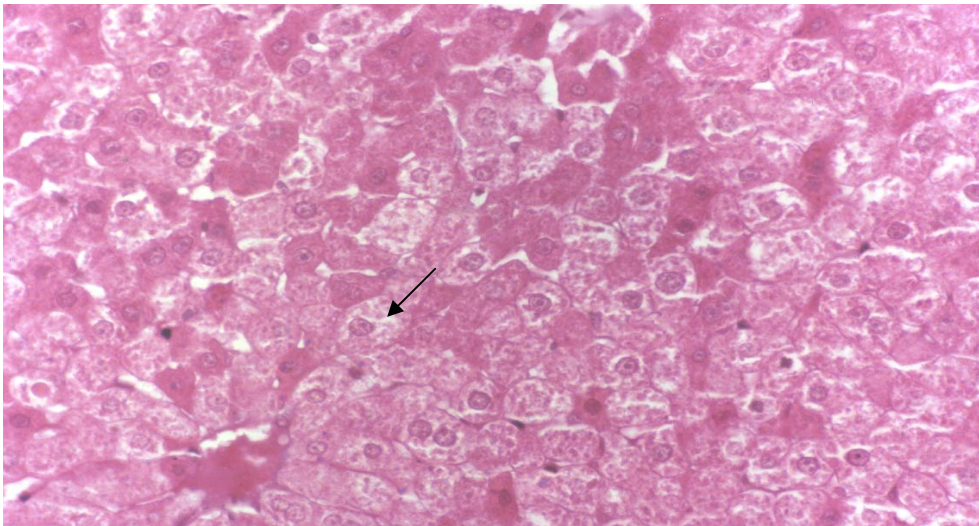


FIGURA 19: Amostra de fígado de um rato do grupo tratado. Observar a tumefação celular (seta). HE.Aum.400x.

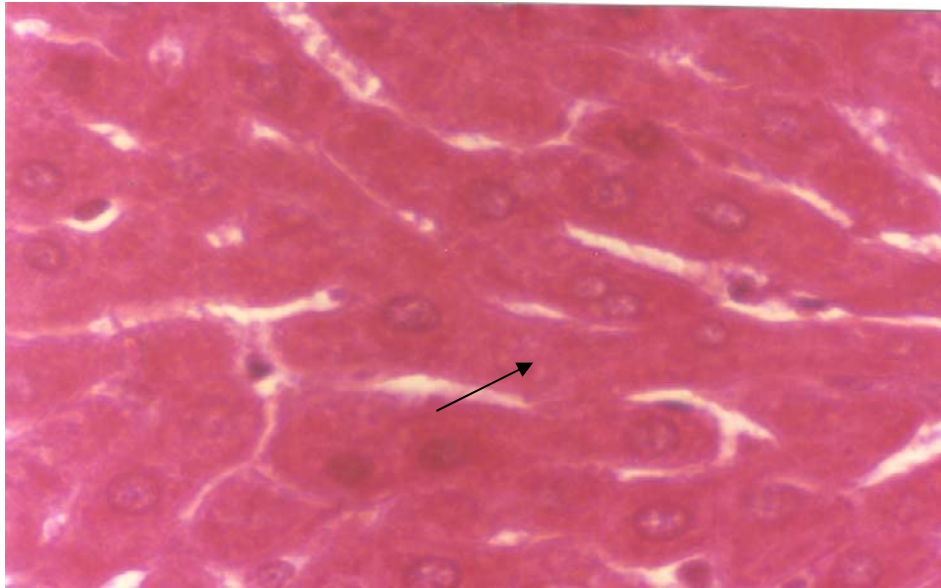


FIGURA 20: Amostra de fígado de um rato do grupo controle. Observar cordões de hepatócitos (seta). HE.Aum.1000x.

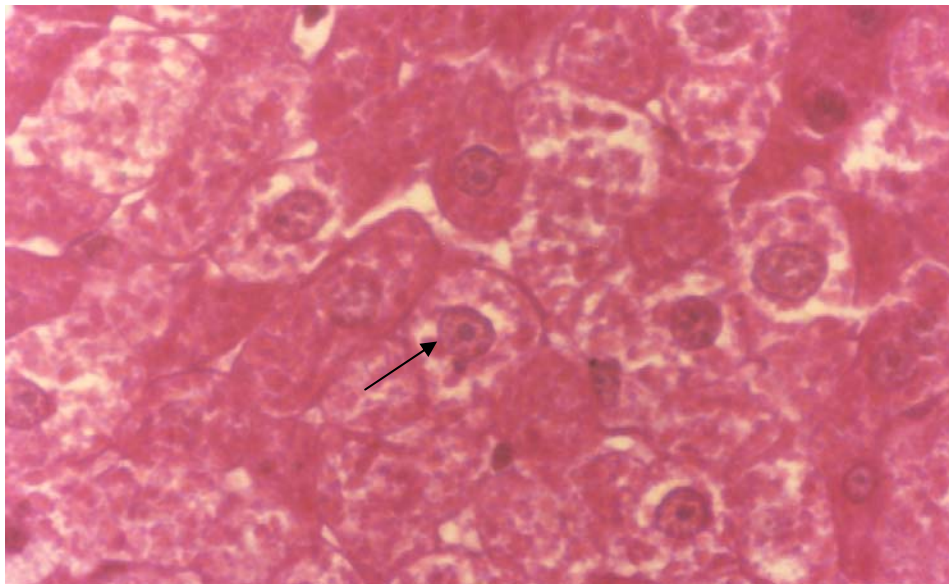


FIGURA 21: Amostra de fígado de um rato do grupo tratado. Observar a tumefação celular (seta). HE.Aum.1000x.

4.2.2 Atividade das Enzimas NTPDase e 5'-Nucleotidase

A atividade da enzima NTPDase em plaquetas de ratos do grupo tratado cronicamente com etanol seguido de 48 horas de abstinência foi alterada significativamente ($p < 0.05$, Teste t, média \pm desvio padrão, $n=10-11$), quando em comparação ao grupo controle (Figura 22).

O tratamento crônico com etanol inibiu a atividade da enzima NTPDase em plaquetas com o substrato ATP em 15% ($p=0.013$), enquanto que com o substrato ADP a inibição foi de 20% ($p=0.028$).

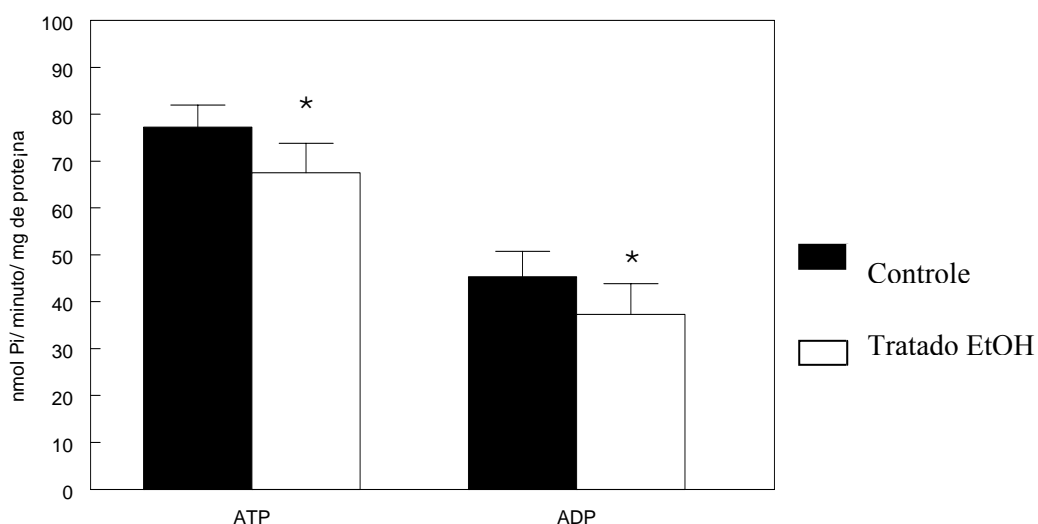


FIGURA 22: Atividade da NTPDase em plaquetas de ratos dos grupos controle e tratado crônico com solução alcoólica. Resultados expressos em η mol Pi liberado/ minuto/ mg de proteína. *Diferente do grupo controle, $p < 0.05$, Teste t, média \pm desvio padrão ($n=10-11$).

A atividade da enzima 5'-nucleotidase em plaquetas de ratos do grupo tratado cronicamente com etanol seguido de 48 horas de abstinência foi alterada significativamente ($p < 0.05$, Teste t, média \pm desvio padrão, $n=10-11$), quando em comparação ao grupo controle (Figura 23).

O tratamento crônico com etanol ativou a enzima 5'-nucleotidase em 40% ($p=0.018$).

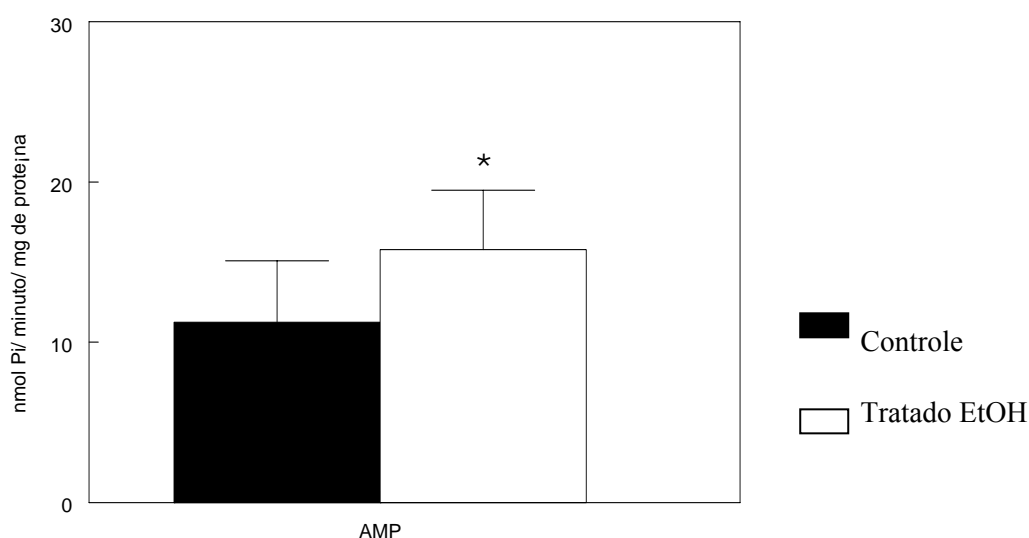


FIGURA 23: Atividade da 5'-nucleotidase em plaquetas de ratos dos grupos controle e tratado crônico com solução alcoólica. Resultados expressos em nmol Pi liberado/ minuto/ mg de proteína. *Diferente do grupo controle, $p < 0.05$, Teste t, média \pm desvio padrão ($n=10-11$).

4.2.3 Atividade da enzima Acetilcolinesterase

As atividades da enzima acetilcolinesterase determinadas no córtex, hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado dos ratos dos grupos controle e tratado crônico com solução alcoólica estão demonstradas na tabela 6.

TABELA 6: Atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex, hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado dos ratos submetidos ao tratamento crônico com etanol. Os resultados estão expressos em μ moles de acetiltiocolina/ hora/ mg de proteína.

Região SNC	Grupos	
	Grupo Controle	Grupo Tratado EtOH 20%
Córtex	1.38 \pm 0.40	1.36 \pm 0.24
Hipotálamo	2.02 \pm 0.41	2.45 \pm 0.48*
Hipocampo	1.42 \pm 0.24	2.20 \pm 0.34***
Cerebelo	0.94 \pm 0.11	1.17 \pm 0.09**
Estriado	7.35 \pm 0.59	9.90 \pm 1.05***

* Diferente do grupo controle ($p < 0.05$), ** Diferente do grupo controle ($p < 0.001$), *** Diferente do grupo controle ($p < 0.0001$), Teste t, média \pm desvio padrão (n=10-11).

4.2.4 Comportamento no labirinto em cruz elevado (Elevated Plus-Maze)

Os diferentes parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado dos ratos dos grupos controle e tratado crônico com solução alcoólica estão demonstrados na tabela 7.

TABELA 7: Efeito do tratamento crônico com etanol em diferentes parâmetros de comportamento no labirinto em cruz elevado

Parâmetros	Grupos	
	Grupo Controle	Grupo Tratado EtOH 20%
Frequência na PF (n)	2.00 ± 1.48	3.30 ± 2.83
Tempo na PF (min)	3.24 ± 1.79	4.58 ± 0.39*
Frequência na PA (n)	2.00 ± 1.41	1.90 ± 1.52
Tempo na PA (min)	1.65 ± 1.84	0.32 ± 0.33*

PF= parte fechada, PA= parte aberta, n= número de vezes, min= minutos, * p<0.05, Teste t, média ± desvio padrão (n=10-11).

4.2.5 Comportamento no Campo-Aberto (Open-Field Test)

Os diferentes parâmetros avaliados no comportamento em campo-aberto dos ratos dos grupos controle e tratado crônico com solução alcoólica estão demonstrados na tabela 8.

TABELA 8: Efeito do tratamento crônico com etanol em diferentes parâmetros de comportamento no campo-aberto

Parâmetros	Grupos	
	Grupo Controle	Grupo Tratado EtOH 20%
Cruzamentos Centrais (freq)	9.36 ± 8.02	9.40 ± 4.52
Cruzamentos Periféricos (freq)	15.09 ± 5.80	20.10 ± 6.75
Bolos fecais (número)	0.54 ± 1.21	2.20 ± 2.15*
Reflexo de orientação (freq)	6.36 ± 5.20	7.50 ± 2.79
Autolimpeza (freq)	2.18 ± 1.53	2.70 ± 2.62
Tempo de Autolimpeza (min)	0.16 ± 0.24	0.54 ± 0.75
Tempo parado (min)	2.70 ± 0.40	2.03 ± 1.19

Freq= frequência ou número de vezes, min= minuto; *Diferente do controle, $p < 0.05$, Teste t, média ± desvio padrão (n=10-11).

4.2.6 Peroxidação Lipídica

As análises dos fígados, rins e soro dos ratos dos grupos controle e tratado crônico com solução alcoólica seguido de 48 horas de abstinência demonstraram aumento significativo na peroxidação lipídica evidenciada pelo aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Tabela 9).

TABELA 9: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a peroxidação lipídica em fígado, rim e soro. Os resultados em fígado e rins estão expressos em $\eta\text{mol MDA/mg}$ de proteína e em soro estão expressos em $\eta\text{mol MDA/ml}$ de soro.

	Grupo Controle	Grupo Tratado EtOH 20%
Fígado	1.53 ± 0.10	$2.04 \pm 0.10^{**}$
Rim	2.00 ± 0.15	$2.39 \pm 0.12^*$
Soro	10.29 ± 0.65	$16.06 \pm 1.50^*$

* Diferente do grupo controle, $p < 0.01$, ** Diferente do grupo controle, $p < 0.0001$, Teste t, média \pm desvio padrão (n=10-11).

5. DISCUSSÃO

5.1 Tratamento Agudo

5.1.1 Atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase

O tratamento agudo com etanol teve um efeito bifásico sobre a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de ratos. O efeito bifásico também pode ser denominado hormético, sendo que o etanol está associado com a ocorrência de respostas bifásicas ou horméticas, onde as menores doses causam estimulação e doses elevadas causam inibição em diferentes parâmetros fisiológicos avaliados (Calabrese & Baldwin, 2003).

As menores doses empregadas (0.8g/kg e 2.0g/kg) provocaram aumento na atividade da NTPDase e, conseqüentemente ocorreu aumento na hidrólise do ATP e do ADP, produzindo o AMP. Dessa forma, pode-se observar também o aumento da atividade da 5'-nucleotidase, responsável por hidrolisar o AMP, formando adenosina.

No entanto, com o aumento da dose (4.0g/kg, 6.0g/kg e 8.0g/kg) observou-se inibição da enzima NTPDase e, assim prejuízo na hidrólise do ATP e ADP, diminuindo a disponibilidade do AMP, substrato da enzima 5'-nucleotidase, que se mostrou bastante inibida.

Logo, os efeitos observados com a administração aguda de etanol sobre as atividades das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase podem estar relacionados a perturbação que este causa nas funções plaquetárias, devido

a importância dos nucleotídeos da adenina no controle da agregação plaquetária e tônus vascular.

Os efeitos inibitórios do etanol sobre a agregação plaquetária são amplamente reconhecidos e, envolvem a inibição da fosfolipase A2 que forma o tromboxano A2, responsável por induzir a agregação plaquetária e causar vasoconstrição, e a ativação da enzima ciclooxygenase que aumenta a produção de prostaciclina, com efeitos antiagregantes e vasodilatadores (Landolfi & Steiner, 1984; Mehta et al., 1987; Rubin, 1989; Duarte et al., 1995; Renaud & Ruf, 1995; Nguyen et al., 1999).

Observou-se que o efeito antitrombótico de uma única dose de etanol (24 g) persiste por 6 horas, mesmo após o retorno dos níveis basais de alcoolemia, em homens e mulheres (Lacoste et al., 2001). Esse efeito antitrombótico prolongado do etanol pode ser clinicamente relevante quando se consideram seus efeitos cardioprotetores.

Deve-se considerar também a atuação do acetaldeído, produto do metabolismo do etanol, na agregação plaquetária. De acordo, com Spertini et al. (1992), o acetaldeído *in vitro* atua como antiagregante plaquetário, o que pode explicar o prejuízo na agregação plaquetária e inibição da liberação de tromboxano A2 em alcoólatras, até mesmo na ausência de alcoolemia.

Além dessas ações, o fibrinogênio e outros fatores da coagulação, também parecem sofrer alterações devido à influência do álcool (Belleville, 2002), logo sua atuação ocorre em diferentes níveis dos processos responsáveis pela trombo-regulação.

Enquanto que o consumo moderado de etanol parece desencadear efeitos cardioprotetores, em parte pelos seus efeitos antiagregantes, o

consumo excessivo parece predispor a doenças hemorrágicas e, paradoxalmente, a doenças trombóticas. Dessa forma, a avaliação da reatividade plaquetária em alcoólatras durante as primeiras duas semanas de abstinência demonstra uma maior produção de tromboxano B₂ (produto estável obtido a partir da degradação espontânea do tromboxano A₂) e, conseqüentemente um efeito pró-agregante plaquetário (Hillbom et al., 1985; Mikhailidis et al., 1990), que pode estar relacionado com a ocorrência de doenças trombóticas.

Assim, as alterações causadas pelo etanol sobre as enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase observadas neste trabalho, podem estar contribuindo para esse perfil variável de causar ou inibir a agregação plaquetária. As menores doses exerceram um efeito antiagregante ao limitar a disponibilidade do ADP, principal agonista ao processo de agregação plaquetária, bem como ao favorecer a formação de adenosina, responsável por inibir o processo de agregação plaquetária e causar vasodilatação. No entanto, as maiores doses exibem um perfil pró-agregante ao inibir a hidrólise do ATP e ADP, além de prejudicar a formação da adenosina.

Devido à ausência de trabalhos que exploram os efeitos do etanol sobre as enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de ratos, pode-se considerar seus efeitos sobre outras enzimas com características comuns a estas, como por exemplo, a presença na membrana celular e atividade de hidrólise de nucleotídeos.

Assim, os efeitos bifásicos do etanol, ou seja, em baixa concentração ativa a enzima, enquanto que concentrações maiores provocam inibição, já foram evidenciados sobre a atividade da

Na⁺,K⁺-ATPase em eritrócitos e leucócitos humanos (Green & Baron, 1986), fígado de ratos (Gonzales-Calvin et al., 1983), rins e pulmões de ratos (Rodrigo & Thielemann, 1997; Rodrigo et al., 2002), córtex cerebral de ratos (Guerra & Grisolia, 1983; Beaugé et al., 1984; Swann, A., 1987; Marques & Guerra, 1988; Foster et al., 1989; Foley & Rhoads, 1992) camundongos (Lin et al., 1980) e humanos (Bertoni & Sprenkle, 1994).

Os efeitos do etanol sobre as enzimas presentes nas membranas das diferentes células e tecidos estudados podem ser explicados através das alterações nas propriedades físico-químicas dessas membranas biológicas, pois o etanol é um solvente orgânico solúvel em água e lipídios, podendo facilmente intercalar-se na bicamada fosfolipídica ou interagir com as proteínas aí inseridas. Além disso, também se deve considerar os efeitos do acetaldeído, metabólito do etanol, que igualmente pode intercalar-se na bicamada fosfolipídica e por ser quimicamente mais reativo pode ligar-se irreversivelmente aos fosfolipídios e proteínas da membrana. Dessa forma, ocorreria a desestruturação da conformação ótima necessária para a atividade enzimática e, conseqüentemente as alterações observadas *in vitro* e *in vivo* (Fenn & Littleton, 1982; Guerra & Grisolia, 1983; Collins et al., 1984; Marques & Guerra, 1988; Benaim et al., 1994; Sanchez- Amate et al., 1996; Rodrigo & Thielemann, 1997).

5.1.2 Atividade da enzima Acetilcolinesterase

A exposição ao etanol causa alterações nos diferentes sistemas de neurotransmissão do SNC, incluindo neuropeptídeos (Slawewski et al., 1999), anandamida (Hungund & Basavarajappa, 2000), aminoácidos

aspartato, glutamato, arginina, taurina e alanina (Dahchour et al., 2000), opióides (Patel & Pohorecky, 1989; Alvarez et al., 1998) e catecolaminas (Lynch et al., 1985; Hellevuo et al., 1989; Patel & Pohorecky, 1989; Vasconcelos et al., 2003), sendo que a neurotransmissão colinérgica parece ser particularmente vulnerável aos seus efeitos.

O tratamento agudo com etanol nas doses de 6.0g/kg e 8.0g/kg demonstrou inibir a enzima acetilcolinesterase em córtex, hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado de ratos, de forma que a hidrólise de seu substrato acetilcolina foi bastante prejudicada nessas estruturas cerebrais.

Além disso, não ocorreu aumento da atividade enzimática nas menores doses empregadas, sendo que inclusive testou-se doses de 0.2g/kg e 0.4g/kg (dados não demonstrados).

Pode-se verificar que somente as maiores doses empregadas (6.0g/kg e 8.0g/kg) alteraram a atividade da enzima acetilcolinesterase, enquanto que Owasoyo & Iramain (1981) relataram inibição da acetilcolinesterase em córtex cerebral de camundongos sacrificados após 30 minutos de uma dose de 2.0g/kg, via intraperitoneal.

Devido a variabilidade de formas moleculares que a acetilcolinesterase é encontrada no SNC, ou seja formas solúveis e associadas a membrana, os efeitos do etanol podem variar de acordo com a forma predominante na preparação, embora se considere que o processo de homogeneização das estruturas cerebrais deve possibilitar a solubilização de ambas as formas no tampão (Lassiter et al., 2003).

O estudo da enzima acetilcolinesterase isolada de órgãos elétricos de *Torpedo californica* demonstrou que as formas solúveis são pouco sensíveis aos efeitos do etanol, enquanto que as formas associadas a

membrana são sensíveis ao efeito bifásico em concentrações que variaram de 20-200 mM (Lasner et al., 1995). No entanto, o emprego de uma concentração bastante elevada de 2.0 M demonstrou que as formas associadas a membrana são mais resistentes aos efeitos inibitórios do etanol do que as formas solúveis (Baker & Chen, 1989).

É importante considerar que a variabilidade de resultados encontrados com relação à atividade da acetilcolinesterase frente a exposição ao etanol, pode ser devido aos diferentes protocolos utilizados nos tratamentos *in vivo* e, que os estudos *in vitro*, podem não refletir as concentrações que o etanol alcança no sítio de ação *in vivo*.

5.1.3 Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus-Maze)

O tratamento agudo com etanol demonstrou aumentar significativamente a frequência de entrada dos ratos tratados com 4.0g/kg na parte fechada do aparato, embora o tempo de permanência na parte aberta e fechada não tenha variado entre os diferentes grupos.

O aumento na frequência de entrada na parte fechada sem variações significativas nos outros parâmetros parece ser devido a uma maior atividade locomotora induzida pelo etanol nessa dose, embora esse fato não tenha sido comprovado na avaliação em campo-aberto.

É importante notar que nas maiores doses empregadas (6.0 e 8.0g/kg) não se pode avaliar o comportamento, pois os ratos não se movimentaram no aparato, devido às propriedades sedativas do etanol.

5.1.4 Comportamento no Campo-Aberto (Open-Field Test)

Na avaliação do comportamento em campo-aberto dos ratos submetidos ao tratamento agudo com etanol o tempo gasto no “grooming” ou autolimpeza variou significativamente entre o grupo controle e o grupo tratado na dose de 2.0g/kg. Não houve evidências de aumento na atividade locomotora, bem como de efeito ansiolítico nas diferentes doses empregadas de etanol.

5.1.5 Peroxidação Lipídica

Várias evidências indicam que o etanol exerce efeitos deletérios sobre o tecido hepático e tecidos extra-hepáticos através de mecanismos que envolvem a ocorrência de estresse oxidativo, pois atua tanto na produção de radicais livres quanto na depleção dos sistemas de defesa antioxidante (Nordmann et al., 1992; McDonough, 2003).

O tratamento agudo com etanol nas diferentes doses empregadas, com o sacrifício após uma hora e meia de exposição, demonstrou causar peroxidação lipídica em fígado, rim e soro, bem como em hipocampo, hipotálamo, cerebelo e estriado de ratos.

Considerando a farmacocinética do etanol, sua absorção ocorre entre 30 e 90 minutos pós-ingestão, embora possa ser modificada por vários fatores, como raça, idade, gênero, via de administração, concentração da solução alcoólica empregada, presença de alimentos, duração do tratamento e dose. Através da padronização desses vários fatores esperou-se minimizar diferenças no tratamento, sendo que a

escolha de uma única administração da solução alcoólica empregada baseou-se no fato de que esta resulta em níveis de etanol mais elevados e uma maior latência para que a concentração de etanol desapareça do sangue, em comparação a administrações em doses divididas (Bielawski & Abel, 2002).

O tratamento agudo com etanol na dose de 4.5g/kg, via orogástrica em ratos sacrificados duas horas pós-tratamento demonstrou inibir a enzima glutamina sintetase, sensível ao estresse oxidativo, em fígado (Bondy & Guo, 1994). No entanto, na avaliação aguda dos efeitos do etanol em testículos se verificou que somente após quatro horas pós-tratamento ocorria aumento dos níveis de MDA (Schlorff et al., 1999b), demonstrando que cada amostra pode requerer determinado tempo para variar o conteúdo de MDA.

Pode-se verificar que ocorreu peroxidação lipídica em todas as amostras analisadas neste trabalho, evidenciada pelo aumento significativo dos níveis de MDA uma hora e meia pós-ingestão, sendo que esse tempo demonstrou ser o ideal para avaliar a peroxidação lipídica no plasma de ratos (Schlorff et al., 1999a).

Também se pode observar que a concentração de MDA presente em fígado e rins foi dependente das doses utilizadas, pois com o aumento da dose evidenciou-se aumento dos níveis de MDA (Figuras 11 e 12). No entanto, a concentração de MDA no soro dos ratos submetidos ao tratamento agudo não variou entre as diferentes doses (Figura 13), talvez a uma limitada liberação de MDA pelos tecidos na circulação sanguínea no tempo de uma hora e meia pós-ingestão. Nas diferentes estruturas cerebrais estudadas pode-se verificar que somente as doses mais elevadas

(4.0g/kg, 6.0g/kg e 8.0g/kg) causaram aumento significativo dos níveis de MDA (Tabela 4), pois devem ser as que alcançaram concentrações capazes de induzir o estresse oxidativo nessas estruturas no tempo de uma hora e meia pós-ingestão.

O tratamento agudo com etanol na dose de 50 mmol/kg, via intraperitoneal em ratos sacrificados duas e quatro horas pós-exposição demonstrou aumentar significativamente os níveis de MDA em cerebelo (Rouach et al., 1987), efeito evidenciado neste trabalho no tempo de uma hora e meia pós-exposição, resguardando-se os diferentes protocolos utilizados.

O estudo dos efeitos da ingestão de etanol nas doses de 2.0g/kg, 4.0g/kg e 6.0g/kg, via orogástrica, em frações subcelulares de cérebro de ratos sacrificados após uma hora de ingestão, demonstrou que os níveis de MDA aumentaram em sinaptossomas, microssomas, citosol e mitocôndrias, sendo que os maiores níveis ocorreram na dose de 6.0g/kg (Reddy et al., 1999).

Assim, os resultados deste trabalho estão de acordo ao demonstrar o aumento dos níveis de MDA em estruturas cerebrais nas maiores doses utilizadas, embora também se pode notar que cada estrutura exhibe um perfil de resposta. Essa diferença pode ser explicada pelos efeitos seletivos do etanol, já que cada região cerebral poderia reagir de acordo com o nível de antioxidantes presentes ou de acordo com sua composição bioquímica à presença do agente estressor (Bondy e Guo, 1995; Husain & Somani, 1998).

5.1.6 Considerações Gerais sobre o Tratamento Agudo

O modelo experimental utilizado no tratamento agudo mostrou-se bastante útil, pois demonstrou que somente após uma hora e meia de exposição a diferentes doses de etanol ocorrem alterações significativas na atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas, acetilcolinesterase em diferentes estruturas cerebrais, comportamento no labirinto em cruz elevado e campo-aberto, além de peroxidação lipídica em fígado, rim, soro e estruturas cerebrais.

É importante ressaltar que nas doses onde se observou inibição da acetilcolinesterase nas estruturas cerebrais, ocorreu o aumento da peroxidação lipídica. No entanto, nas doses que a acetilcolinesterase foi inibida não se pode avaliar o comportamento já que os ratos estavam com a atividade locomotora prejudicada. A avaliação comportamental dos ratos no tratamento agudo não foi capaz de detectar maiores diferenças entre os grupos devido ao pouco tempo de ingestão (uma hora). Sindclair & Gustafsson (1987) avaliaram os efeitos comportamentais agudos do etanol na dose de 2.5g/kg, via intraperitoneal, durante as primeiras 48 horas pós-administração, sendo que as alterações significativas foram encontradas entre as 20-24 horas e 48 horas pós-injeção.

5.2 Tratamento Crônico

5.2.1 Modelo Experimental

O peso dos ratos tratados com a solução alcoólica 20% durante 31 semanas foi menor, quando em comparação ao grupo controle, a partir da sexta semana de tratamento. Ratos tratados cronicamente com etanol por períodos superiores a 20 semanas demonstram ingerir uma menor quantidade de ração, como pode-se evidenciar nesse trabalho, conseqüentemente apresentando prejuízo no ganho de peso (Blockland et al., 1992; Casamenti et al., 1993; Malatová & Cízková, 2002). A fim de se evitar esse efeito do tratamento, pode-se utilizar protocolos como o de Pereira et al. (1998) que adicionou o etanol 20% em uma solução de sacarose 8.75%, e verificou que o peso dos animais tratados e controle não apresentou diferença estatística significativa após 32 semanas de tratamento. No entanto, tratamentos crônicos que utilizam um intervalo menor de tempo (30 dias), não apresentam diferença estatística significativa entre os pesos dos animais (Rajasekaran, 2000).

O método escolhido para a administração da solução alcoólica, semivoluntário, pois os animais receberam a solução com fonte única de líquido e ingeriram espontaneamente, embora possa apresentar desvantagens (Macieira et al., 1997), mostrou-se útil nesse trabalho. Os ratos aceitaram a solução alcoólica desde a primeira semana, ingerindo quantidades semelhantes as demonstradas em outros trabalhos (Macieira et al., 1997; Pereira et al., 1998; Malatová & Cízkova, 2002).

A análise morfométrica do fígado e rins dos ratos submetidos ao tratamento crônico com etanol demonstrou diferença significativa somente com relação ao tamanho dos órgãos, entre o grupo controle e tratado. Não se observaram alterações macroscópicas no aspecto dos órgãos, embora a análise histológica tenha demonstrado a ocorrência de tumefação celular (Figuras 18-21) no fígado dos ratos tratados cronicamente com a solução alcoólica 20% durante 31 semanas.

A tumefação celular ocorre pelo acúmulo intracelular de água (hiperidratação celular), que se origina a partir de desequilíbrios no controle do gradiente osmótico ao nível de membrana citoplasmática e nos mecanismos de absorção e eliminação de água e eletrólitos intracelulares.

É geralmente a primeira manifestação de agressão celular, sendo uma fase mais precoce, comum e reversível e menos grave de lesão celular. Com a persistência dessa etiopatogenia, pode haver evolução para um estado mais avançado de edema celular, com maior quantidade de água nas organelas e aparecimento de grande quantidade de vacúolos citoplasmáticos, originando a degeneração hidrópica (ou também denominada vacuolar, balonosa ou globulosa).

A tumefação celular é explicada a partir de alterações na $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase, que por localizar-se na membrana plasmática sofreria as agressões impostas a esta, sejam químicas, físicas ou biológicas. O mau funcionamento dessa enzima causa um desequilíbrio iônico entre o Na^+ e o K^+ , acumulando Na^+ no interior da célula, que provoca a entrada de água e a retenção do K^+ extracelularmente. A atividade mitocondrial seria diminuída e conseqüentemente, também os níveis de ATP, contribuindo para o agravamento do quadro de edema celular.

O etanol *in vitro* inibiu a atividade da enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase de fígado de ratos, efeito explicado a partir de alterações na membrana plasmática (Gonzales-Calvin et al., 1983).

Considerando os efeitos do etanol sobre as membranas biológicas torna-se compreensível a ocorrência da tumefação celular em fígado de ratos tratados cronicamente com solução alcoólica 20% durante 31 semanas. A injúria hepática causada pelo etanol é multifatorial (French, 1989), sendo que os eventos iniciais envolvem a perda da função mitocondrial, decorrente de alterações na membrana celular da organela por peroxidação lipídica e da ligação do etanol aos seus componentes (Roseblum et al., 1989).

O estresse oxidativo pode exacerbar a toxicidade do ferro presente no fígado, desde que este elemento pode acelerar a decomposição de peróxidos de lipídios, estimulando o processo de peroxidação lipídica. Assim, o estresse oxidativo induzido pelo ferro parece ser fundamental no desenvolvimento da injúria hepática, pois contribui para a hepatotoxicidade do etanol e aumenta a geração de citocinas e mediadores da fibrogênese (Hoek & Pastorino, 2002; Pietrangelo, 2003).

O etanol aumenta a suscetibilidade das membranas ao processo de peroxidação lipídica, devido à ocorrência de alterações na sua composição, pois membranas de eritrócitos de ratos tratados cronicamente com etanol ajustado para contribuir com 36% das necessidades calóricas totais durante 28 dias, possuem maior concentração de colesterol e de ácidos graxos poliinsaturados e demonstram ser mais sensíveis a peroxidação lipídica induzida por FeSO_4 e ácido ascórbico (Lindi et al., 1998).

A avaliação de membranas de eritrócitos de alcoólatras também demonstrou um aumento no conteúdo de colesterol e maior suscetibilidade a peroxidação lipídica (Parmahamsa et al., 2004).

5.2.2 Atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase

O tratamento crônico com etanol seguido de 48 horas de abstinência alterou a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de ratos. A atividade da NTPDase foi inibida com os substratos ATP e ADP, diminuindo a disponibilidade do AMP. No entanto, a enzima 5'-nucleotidase foi ativada, ou seja aumentou a geração de adenosina.

A inibição da NTPDase resulta em uma maior disponibilidade do ATP e ADP, logo se favorece um perfil pró-agregante plaquetário e de vasoconstrição. A ativação da 5'-nucleotidase pode demonstrar um aumento compensatório do organismo na geração de adenosina, que favorece um perfil antiagregante e de vasodilatação.

O tratamento crônico com etanol aumentou progressivamente a atividade da enzima 5'-nucleotidase em sinaptossoma de córtex cerebral de ratos mensurada após 2, 4 e 8 semanas de exposição ao etanol, efeito explicado pelas alterações que o etanol causou nas membranas celulares (Guerra & Grisolia, 1983).

A avaliação de membranas de eritrócitos e plaquetas de pacientes alcoólatras por fluorescência demonstrou que a membrana das plaquetas estava rígida no primeiro dia da Síndrome de Abstinência, mas após 13 dias do término dos sintomas de abstinência, estava mais fluída. No

entanto, as membranas dos eritrócitos não demonstraram alteração (Thompson, 1999).

As alterações nas enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase observadas nesse trabalho podem ser explicadas através desse efeito inespecífico do etanol sobre a membrana celular, já que essas enzimas aí se encontram inseridas. Também pode estar relacionado o fato de que o etanol pode interagir diretamente com proteínas, ligando-se especialmente a sítios hidrofóbicos e, assim, provoca alterações em suas funções (Korpi et al., 1998; Weight et al., 1999; Harris & Mihic, 2004).

5.2.3 Atividade da enzima Acetilcolinesterase

Estudos realizados em humanos e ratos demonstram que o etanol seletivamente afeta a fisiologia e a bioquímica do sistema colinérgico, levando a perda de neurônios colinérgicos corticais e do tronco cerebral (Miller & Rieck, 1993; Cadete-Leite et al., 2003), bem como a alterações nas enzimas responsáveis pela formação e degradação da ACh.

Embora tenham sido realizados vários trabalhos, os resultados são conflitantes, pois alguns estudos demonstram liberação aumentada, outros diminuída de ACh, atividades da AChE aumentadas, diminuídas ou sem alteração. Segundo Bilgi et al. (2003), esses resultados conflitantes podem ser devido a variedade de técnicas e modelos experimentais empregados.

Os mecanismos pelos quais o etanol afeta o sistema colinérgico não são claramente definidos, mas provavelmente envolvam as várias alterações já observadas. As alterações causadas na AChE são relacionadas a interações do etanol no sítio hidrofóbico da enzima

(Shin et al., 1991a, 1991b) e a seus efeitos inespecíficos sobre a estrutura das membranas onde a enzima pode localizar-se (Guerra & Grisolia, 1983; Baker & Chen, 1989; Lasner et al., 1995), embora a morte de neurônios responsáveis por sua síntese e liberação também esteja envolvida (Miller & Rieck, 1993).

O tratamento crônico com etanol seguido de 48 horas de abstinência nesse trabalho alterou a atividade da enzima acetilcolinesterase, sendo que ocorreu ativação significativa em hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado. A ativação da acetilcolinesterase nessas estruturas aumenta a hidrólise da acetilcolina, limitando a sua atuação e pode ser uma resposta fisiológica adaptativa aos efeitos inibitórios iniciais do etanol (Guerra & Grisolia, 1983; Bilgi et al., 2003).

A atividade da acetilcolinesterase em córtex não foi alterada, em acordo com o que foi demonstrado por Pereira et al. (1998), onde o consumo crônico de uma solução alcoólica 20% *ad libitum* durante 32 semanas de tratamento seguidas de 20 dias de abstinência não alterou significativamente a atividade da acetilcolinesterase em córtex. O tratamento com solução alcoólica 20% *ad libitum* durante 4 meses também não encontrou alterações na atividade da acetilcolinesterase em córtex de ratos (Pires et al., 2001).

O consumo crônico de etanol na concentração que variou de 4.8% nos primeiros 3 dias até 7.2% nos 35 dias subsequentes, seguidos de 8, 24 e 72 horas de abstinência, demonstrou ativar a acetilcolinesterase sérica de ratos nos dias 3, 7, 14 e 35 do tratamento, bem como nas 8 e 24 horas de abstinência, com retorno aos valores basais nas 72 horas de abstinência (Bilgi et al., 2003).

O tratamento crônico com etanol na dose de 2.0g/kg, por via orogástrica durante 6.5 semanas em ratos demonstrou inibir a atividade da acetilcolinesterase em córtex, cerebelo e hipotálamo (Husain & Somani, 1998). Já no tratamento com uma dieta líquida onde o etanol representou 36% das calorias totais, ocorreu ativação da acetilcolinesterase em sinaptossomas de córtex de ratos durante 2, 4 e 8 semanas de tratamento (Guerra & Grisolia, 1983).

5.2.4 Comportamento no labirinto em cruz elevado (Elevated Plus-Maze)

O comportamento dos ratos tratados cronicamente com etanol seguido de um período de abstinência de 48 horas demonstrou que os animais permaneceram a maior parte do tempo de realização do teste na parte fechada do aparato, embora a frequência de entradas nas partes aberta e fechada não tenha apresentado diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo tratado.

Assim os ratos tratados movimentaram-se no mesmo grau que os ratos controles, mas preferiram a parte fechada. Isso indica um efeito ansiogênico do tratamento, já relatado e condizente com a ocorrência de Síndrome de Abstinência, pois os animais estavam privados da solução alcoólica há 48 horas

O tratamento crônico com solução alcoólica 20% *ad libitum* durante 6 meses em ratos adultos Lewis reduziu a ansiedade, mas as avaliações do comportamento em campo-aberto, labirinto em cruz elevado e esQUIVA inibitória foram realizadas 3, 7 e 9 semanas após o término do

tratamento, ou seja após o período de Síndrome de Abstinência (Blokland et al., 1992).

Assim, reconhece-se que a administração crônica de etanol induz um efeito ansiolítico, mas a Síndrome de Abstinência induz ao efeito ansiogênico (Onaivi et al., 1989; File et al., 1993; Cole et al., 2000; Pokk et al., 2001).

5.2.5 Comportamento em Campo-Aberto (Open-Field Test)

As relações entre parâmetros colinérgicos e comportamento motor foram previamente estabelecidas (Pohorecky et al., 1979), sendo que animais tratados por 4 meses com solução alcoólica seguida de 20 dias de abstinência demonstraram inibição da acetilcolinesterase no hipocampo e alterações na categoria de “sniffing”, consideradas nesse trabalho como rápidos movimentos realizados com nariz e vibrissas e permanência de contato entre as patas dianteiras com a parede do aparato (Pires et al., 2001) e animais tratados por 30 dias com 2g etanol/kg peso, via orogástrica demonstraram menor atividade locomotora espontânea e inibição da acetilcolinesterase no cerebelo e cérebro (Rajasekaran, 2000).

Os efeitos do tratamento crônico com etanol seguido de 48 horas de abstinência verificados nesse trabalho em campo aberto só apresentaram diferença significativa com relação a maior deposição de bolos fecais na arena do teste pelo grupo tratado. A maior deposição de bolos fecais pode ter ocorrido devido à ansiedade dos animais, privados da solução alcoólica há 48 horas.

O tratamento crônico com uma dieta líquida contendo 7% de etanol durante 21 dias diminuiu a deposição de bolos fecais na arena do teste em observações realizadas em campo-aberto nos dias 4, 7, 14 e 21 do tratamento (Harkany et al., 1997), confirmando a observação de que o tratamento crônico com etanol tem efeitos ansiolíticos sem a interrupção da administração do etanol, para evitar a ocorrência da Síndrome de Abstinência.

5.2.6 Peroxidação Lipídica

O tratamento crônico com etanol seguido de 48 horas de abstinência confirmou a ocorrência de peroxidação lipídica em fígado, rins e soro de ratos, evidenciada pelo aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

A administração crônica de etanol demonstrou causar peroxidação lipídica em eritrócitos (Harkany et al., 1997), plasma (Harkany et al., 1997; Husain & Somani, 1998; Schlorff et al., 1999a), cérebro (Rouach et al., 1987; Husain & Somani, 1998; Reddy et al., 1999), tecido cardíaco (Husain & Somani, 1997), fígado, rins (Husain et al., 2001) e testículos (Rosenblum et al., 1989; Schlorff et al., 1999b). Em geral, esses estudos também avaliam as enzimas CAT, SOD, GSH-Px, GR e o conteúdo de glutathiona tripeptídeo, demonstrando alterações significativas que comprovam a ocorrência de estresse oxidativo induzido pelo etanol.

5.2.7 Considerações Gerais sobre o Tratamento Crônico

O tratamento crônico com etanol seguido de 48 horas de abstinência demonstrou ser bem tolerado pelos ratos, apesar do prejuízo no ganho de peso. Pode-se verificar o início de agressão ao fígado na análise histológica e confirmar que esse órgão estava sofrendo com a ocorrência de estresse oxidativo, fator reconhecidamente responsável por injúria celular.

As enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas foram alteradas no tratamento crônico com etanol seguido de 48 horas de abstinência. Essas alterações podem acrescentar uma explicação adicional aos efeitos do etanol sobre as funções plaquetárias, devido à importância destas enzimas na regulação dos nucleotídeos extracelulares, responsáveis pela modulação da agregação plaquetária e tônus vascular. No entanto, devido à complexidade dos mecanismos envolvidos na agregação plaquetária e da participação dos diferentes constituintes do sangue e endotélio vascular, mais estudos são necessários para evidenciar a extensão da contribuição dos efeitos do etanol sobre as enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase nas alterações das funções plaquetárias e coagulação sanguínea observadas com o uso de bebidas alcoólicas em humanos.

A enzima acetilcolinesterase foi alterada pelo tratamento crônico com etanol seguido de 48 horas de abstinência, apresentando ativação em hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado. Embora tenham ocorrido alterações na avaliação do comportamento, essas demonstram o efeito ansiogênico da abstinência alcoólica, não estando intimamente relacionadas ao sistema colinérgico.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitem apresentar as seguintes conclusões:

- ◆ As enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase de plaquetas de ratos foram alteradas pelo tratamento agudo com etanol de forma bifásica ou hormética, pois as menores doses empregadas ativaram as enzimas, enquanto que as doses maiores provocaram inibição;
- ◆ As maiores doses empregadas no tratamento agudo com etanol inibiram a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex, hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado da ratos, causando prejuízo na hidrólise da acetilcolina;
- ◆ O tratamento agudo com etanol provocou alterações comportamentais em ratos evidenciadas no labirinto em cruz elevado e em campo-aberto;
- ◆ O tratamento agudo com etanol causou peroxidação lipídica em fígado, rins e soro de ratos;
- ◆ O tratamento agudo com etanol causou peroxidação lipídica em hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado de ratos nas doses que demonstraram inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase nessas estruturas;

- ◆ O tratamento crônico com etanol diminuiu a ingestão de ração e o peso dos ratos tratados, quando em comparação ao grupo controle;
- ◆ O tratamento crônico com etanol não causou alterações macroscópicas nos órgãos dos ratos tratados, mas a análise histológica do fígado revelou o início da agressão celular, evidenciada pela ocorrência de tumefação celular;
- ◆ As enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase foram alteradas pelo tratamento crônico com etanol seguido de 48 horas de abstinência, sendo que a NTPDase foi inibida e a 5'-nucleotidase ativada;
- ◆ A enzima acetilcolinesterase foi alterada pelo tratamento crônico com etanol seguido de 48 horas de abstinência, sendo ativada em hipotálamo, hipocampo, cerebelo e estriado de ratos;
- ◆ O tratamento crônico com etanol seguido de 48 horas de abstinência teve um efeito ansiogênico, indicativo de Síndrome de Abstinência, evidenciada no labirinto em cruz elevado e em campo-aberto;
- ◆ O tratamento crônico com etanol causou peroxidação lipídica em fígado, rins e soro de ratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, C.; PRUNELL, M.; BOADA, J. Effect of naloxone on behavioral changes induced by subchronic administration of ethanol in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.59, n.4, p.961-965, 1998.

ANNAU, Z. **Neurobehavioral Toxicology**. Austrália: Edward Arnold. 1986, p.442.

BAER, D.J.; JUDD, J.T.; CLEVIDENCE, B.A; MUESING, R.A; CAMPBELL, W.S.; BROWN, E.D.; TAYLOR, P.R. Moderate alcohol consumption lowers risk factors for cardiovascular disease in postmenopausal women fed a controlled diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.75, p.593-599, 2002.

BAKER, G.M.; CHEN, C.H. The effects of ethanol on the structural stability of acetylcholine receptor and the activity of various molecular forms of acetylcholinesterase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.92, p.333-340, 1989.

BAKKER, W.W.; POELSTRA, K.; BARRADAS, M.A.; MIKHAILIDIS, D.P. Platelets and ectonucleotidases. **Platelets**, v.5, p.121-129, 1994.

BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.B.T; BARCELLOS, C.K.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Characterization of na ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in sinaptosomes from cerebral córtex of adult rats. **Neurochemical Research**, v.16, n.12, p.1303-1310, 1991.

BAU, C.H.D. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.7, n.1, p.183-190, 2002.

BEAUGÉ, F.; FLEURET, C.; BARIN, F.; NORDMANN, R. Brain membrane disordering after acute in vivo administration of ethanol, isopropanol or t- butanol in rats. **Biochemical Pharmacology**, v.33, n.22, p. 3591-3595, 1984.

BELLEVILLE, J. The French Paradox: Possible Involvement of Ethanol in the Protective Effect Against Cardiovascular Diseases. **Nutrition**, v.18, p. 173-177, 2002.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, v.125, p.141-149, 2001.

BENAIM, G.; CERVINO, V.; LOPEZ-ESTRAÑO, C.; WEITZMAN, C. Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1195, p. 141-148, 1994.

BERGAMINI, C.; GRAZI, E. Human platelets 5'-nucleotidase: a cell membrane ectoenzyme with a possible regulatory role in the aggregation reaction. **Italian Journal of Biochemistry**, p.273-288, 1980.

BERMOND II, D.M.; TOSE, H. Consumo de bebidas alcoólicas: interações com o benzeno e outras substâncias de uso ocupacional. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.27, n.2, 2000.

BERTELLI, M.S.; CONCI, F.M. **Álcool e Fígado**.1.ed. Caxias do Sul: EDUCS, 1997, p.219.

BERTONI, J.M.; SPRENKLE, P.M. Effects of in vitro ethanol on the brain cation pump in alcoholics and controls. **Biochemical Pharmacology**, v.48, n.2, p. 435-437, 1994.

BIELAWSKI, D.M.; ABEL, E.L. The effect of administering ethanol as single vs. divided doses on blood alcohol levels in the rat. **Neurotoxicology and Teratology**, v.24, p.559-562, 2002.

BILGI, C.; TOKGÖZ, S.; AYDIN, A.; ÇELİK, T.; UZBAY, T. The effects of chronic ethanol consumption and ethanol withdrawal on serum cholinesterase activity in rats. **Alcohol & Alcoholism**, v.38, n.4, p.316-320, 2003.

BIRK, A.V.; BUBMAN, D.; BROEKMAN, J.; ROBERTSON, H.D.; DROSOPOULOS, J.H.F.; MARCUS, A.J.; SZETO, H.H. Role of a novel soluble nucleotide phosphohydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: hemostasis, thrombosis, and vascular biology. **Journal of Laboratory Clinical Medical**, v.139, n.2, 2002a.

BIRK, A.V.; BROEKMAN, J.; GLADEK, E.M.; ROBERTSON, H.D.; DROSOPOULOS, J.H.F.; MARCUS, A.J.; SZETO, H.H. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **Journal of Laboratory Clinical Medical**, v.140, n.3, 2002b.

BLATT, S.L.; TAKAHASHI, R.N. Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.457-461, 1999.

BLOCKLAND, A.; PRICKAERTS, J.; RAAJMAKERS, W. Reduced level of anxiety in adult Lewis rats after chronic ethanol consumption. **Physiology & Behavior**, v.51, p.245-248, 1992.

BOARDER, M.R.; HOURANI, S.M.O. The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. **TIPS**, v.19, p.99-107, 1998.

BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M.L.O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.67, p.225-232, 2000.

BONDY, S.C.; GUO, S.X. Effect of ethanol treatment on indices of cumulative oxidative stress. **European Journal of Pharmacology**, v.270, p.349-355, 1994.

BONDY, S.C.; GUO, S.X. Regional selectivity in ethanol-induced pro-oxidant events within the brain. **Biochemical Pharmacology**, v.49, n.1, p.69-72, 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.218-254, 1976.

BURNSTOCK, G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. **Neuropharmacology**, v.39, n.9, p.1127-1139, 1997.

BURNSTOCK, G. Purinergic cotransmission. **Brain Research Bulletin**, v.50, n.5/6, p.355-357, 1999.

CADETE-LEITE, A.; PEREIRA, P.A.; MADEIRA, M.D.; PAULA-BARBOSA, M.M. Nerve growth factor prevents cell death and induces hypertrophy of basal forebrain cholinergic neurons in rats withdrawn from prolonged ethanol intake. **Neuroscience**, v.119, p.1055-1069, 2003.

CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. Ethanol and hormesis. **Critical Reviews in Toxicology**, v.33, n.3/4, p.407-424, 2003.

CAO, W.; WEHNER, J.M.; COLLINS, A.C. Chronic intragastric infusion produces tolerance to ethanol in LS and SS mice. **Alcohol**, v.12, n.3, p.241-246, 1995.

CASAMENTI, F.; SCALI, C.; VANNUCCHI, M.G.; BARTOLINI, L.; PEPEU, G. Long-term ethanol consumption by rats: effect on acetylcholine release *in vivo*, choline acetyltransferase activity, and behavior. **Neuroscience**, v.56, n.2, p.465-471, 1993.

CHAN, K.; DELFERT, D.; JUNGER, K.D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} - ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v.157, p. 375-380, 1986.

COADE, S.B.; PEARSON, J.D. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. **Circulation Research**, v.65, n.3, p.531-537, 1989.

COLE, J.C.; LITTLETON, J.M.; LITTLE, H.J. Acamprosate, but not naltrexone, inhibits conditioned abstinence behaviour associated with repeated ethanol administration and exposure to a plus-maze. **Psychopharmacology**, v.147, p.403-411, 2000.

COLLINS, A.C.; SMOLEN, A.; WAYMAN, A.L.; MARKS, M.J. Ethanol and temperature effects on five membrane bound enzymes. **Alcohol**, v.1, p.237-246, 1984.

CORREA, M.; SANCHIS-SEGURA, C.; ARAGON, C.M.G. Brain catalase activity is highly correlated with ethanol-induced locomotor activity in mice. **Physiology & Behavior**, v.73, p.641-647, 2001.

CÔTÉ, Y.P.; PICHER, M.; ST-JEAN, P.; BÉLIVEAU, R.; POTIER, M.; BEAUDOIN, A.R. Identification and localization of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) in bovine aorta: relevance to vascular tone and platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1078, p.187-191, 1991.

CRISTALLI, G.; VOLPINI, R.; VITTORI, S. 2-alkynil derivatives of adenosine-5'-N-ethyluronamide: selective A₂ adenosine receptor agonists with potent inhibitory activity on platelet aggregation. **Journal of Medical Chemistry**, v.37, p.1720-1726, 1994.

DAHCHOUR, A.; HOFFMAN, A.; DEITRICH, R.; DE WITTE, P. Effects of ethanol on extracellular amino acid levels in high and low alcohol sensitive rats: a microdialysis study. **Alcohol & Alcoholism**, v.35,n.6, p.548-553, 2000.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews/ Neuroscience**, v.4, p.131-138, 2003.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sciences**, v.68, p.1545-1555, 2001.

DAWSON, G.R.; TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **TiPS**, v.16, p.33-36, 1995.

DAY, T.; GREENFIELD, A. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones *in vitro*: molecular mechanisms. **Neuroscience**, v.111, n.3, p.649-656, 2002.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J.M.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, R. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, n.3, p.587-600, 2001.

DROSOPOULOS, J.H.F. Roles of Asp54 and Asp213 in Ca^{2+} utilization by soluble human CD39/ecto-nucleotidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.406, p.85-95, 2002.

DUARTE, A.P.; DONG, Q.S.; YOUNG, J.; ABI-YOUNES, S.; MYERS, A.K. Inhibition of platelet aggregation in whole blood by ethanol. **Thrombosis Research**, v.78, n.2, p.107-115, 1995.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p.88-95, 1961.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.58, p.39-46, 2004.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, p.872-879, 2002.

FENN, C.G.; LITTLETON, J.M. Inhibition of platelet aggregation by ethanol in vitro shows specificity for aggregating agent used and is influenced by platelet lipid composition. **Thrombosis Haemostasis**, v.48, n.1, p.49-53, 1982.

FERREIRA, V.M.M.; TAKAHASHI, R.N.; MORATO, G.S. Dexamethasone reverses the ethanol-induced anxiolytic effect in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.66, n.3, p.585-590, 2000.

FILE, S.E.; ANDREWS, N.; Al-Farhan, M. Anxiogenic responses of rats on withdrawal from chronic ethanol treatment: effects of tinepine. **Alcohol & Alcoholism**, v.28, p.281-286, 1993.

FOLEY, T.D.; RHOADS, D.E. Effects of ethanol on Na⁺-dependent amino acid uptake: dependence on rat age and Na⁺, K⁺- ATPase activity. **Brain Research**, v.594, p.39-43, 1992.

FOSTER, D.M.; HUBER, M.D.; KLEMM, W.R. Ethanol may stimulate or inhibit (Na⁺,K⁺) ATPase, depending upon Na⁺ and K⁺ concentrations. **Alcohol**, v.6, p. 437-443, 1989.

FRASSETO, S.S.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 129, p. 47-55, 1993.

FRASSETO, S.S.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Inhibition and kinetic alterations by excess free ATP and ADP of the ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.35, n.3, p.499-506, 1995.

FRENCH, S.W. Biochemical basis for alcohol-induced liver injury. **Clinical Biochemistry**, v.22, p.41-49, 1989.

FRIDOVICH, I. Oxygen radicals from acetaldehyde. **Free Radical Biology & Medicine**, v.7, p. 557-558, 1989.

FROSTEGARD, J. Autoimmunity, oxidized LDL and cardiovascular disease. **Autoimmunity Reviews**, v.1, p.233-237, 2002.

FUCHS, C.S.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A. Alcohol consumption and mortality among women. **New England Journal of Medicine**, v.332, p.1245-1250, 1995.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p.678.

GANGADHARAN, S.P.; IMAI, M.; RHYNHART, K.K.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S.C.; CONTE, M.S. Targeting platelet aggregation: CD39 gene transfer augments nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in injured rabbit arteries. **Surgery**, v.130, n.2, p.296-303, 2001.

GAZIANO, J.M.; GAZIANO, T.A; GLYNN, R.J.; SESSO, H.D.; AJANI, U.A.; STAMPFER, M.J.; MANSON, J.E.; HENNEKENS, C.H.; BURING, J.E. Light-to-moderate alcohol consumption and mortality in the Physicians' Health Study Enrollment Cohort. **Journal of the American College of Cardiology**, v.35, n.1, p.96-105, 2000.

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

GOLDBERG, D.M.; HAHN, S.E.; PARKES, J.G. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. **Clinica Chimica Acta**, v.237, p.155-187, 1995.

GONZALES- CALVIN, J.L.; SAUNDERS, J.B.; WILLIAMS, R. Effects of ethanol and acetaldehyde on hepatic plasma membrane ATPases. **Biochemical Pharmacology**, v.32, n.11, p.1723-1728, 1983.

GREEN, R.J.; BARON, D.N. The acute in vitro effect of ethanol, its metabolites and other toxic alcohols on ion flux in isolated human leucocytes and erythrocytes. **Biochemical Pharmacology**, v.35, n. 20, p. 3457-3464, 1986.

GUERRI, C.; GRISOLÍA, S. Chronic ethanol treatment affects synaptosomal membrane-bound enzymes. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.18, n.1, p. 45-50, 1983.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**.9.ed.Rio de Janeiro: 1997, p.1014.

HARKANY, T.; SASVARI, M.; NYAKAS, C. Chronic ethanol ingestion-induced changes in open-field behavior and oxidative stress in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.58, n.1, p. 195-201, 1997.

HARRIS, R.A.; MIHIC, S.J. Alcohol and inhibitory receptors: unexpected specificity from a nonspecific drug. **PNAS**, v.101, n.1, p. 2-3, 2004.

HELLEVUO, K.; KIIANMAA, K., KIM, C. Effect of ethanol on brain catecholamines in rat lines developed for differential ethanol-induced motor impairment. **Alcohol**, v.7, p.159-163, 1990.

HEYMANN, D.; REDDINGTON, M.; KREUTZBERG, G.W. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v.43, p. 263- 273, 1984.

HILLBOM, M.; KANGASAHO, M.; LÖWBEER, C.; KASTE, M.; MUURONEN, A.; NUMMINEN, H. Effects of ethanol on platelet function. **Alcohol**, v.2, p.429-432, 1985.

HOEK, J.B.; PASTORINO, J.G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. **Alcohol**, v.27, p.63-68, 2002.

HOLLOWAY, F.A.; MILLER, J.M.; KING, D.A.; BEDINGFIELD, J.B. Delayed ethanol effects on physiological and behavioral indices in the rat. **Alcohol**. v.10, p.511-519, 1993.

HUNGUND, B.L.; BASAVARAJAPPA, B.S. Are anandamide and cannabinoid receptors involved in ethanol tolerance? A review of the evidence. **Alcohol & Alcoholism**, v.35, n.2, p.126-133, 2000.

HUNT, W.A. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain-a review. **Alcohol**, v.13, n.2, p. 147-151, 1996.

HUSAIN, K.; SOMANI, S.M. Response of cardiac antioxidant system to alcohol and exercise training in the rat. **Alcohol**, v.14, n.3, p.301-307, 1997.

HUSAIN, K.; SOMANI, S.M. Effect of exercise training and chronic ethanol ingestion on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in blood and brain regions of rat. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat**, v.22, p.411-423, 1998.

HUSAIN, K.; SCOTT, B.R.; REDDY, S.K.; SOMANI, S.M. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. **Alcohol**, v.25, p.89-97, 2001.

KANNEL, W.B.; ELLISON, R.C. Alcohol and coronary heart disease: the evidence for a protective effect. **Clinica Chimica Acta**, v.246, p.59-76, 1996.

KAUP, Z.O.L.; MERIGHI, M.A.B.; TSUNECHIRO, M.A. Avaliação do consumo de bebida alcoólica durante a gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.23, n.9, 2001.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NIMOMIYA, H. Contribution of ecto- 5'- nucleotidase to the inhibition platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v.96, n.6, p.2157-2162, 2000.

KEANE, B.; LEONARD, B.E. Changes in “open-field” behavior and in some membrane-bound enzymes following the chronic administration of ethanol to the rat. **Neuropharmacology**, v.22, n.4, p. 555-557, 1983.

KETTLUN, A.M.; LEYTON, M.; VALENUELA, M.A.; MANCILLA, M.; TRAVERSO-CORI, A. Identification and subcellular localization of two isoenzymes of apyrase from *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, v.36, n.6, p.1889-1894, 1992.

KHAN, S.; O' BRIEN, P.J. Role of the cellular redox state in modulating acute ethanol toxicity in isolated hepatocytes. **Clinical Biochemistry**, v.32, n.7, p. 585-589, 1999.

KORPI, E.R.; MÄKELÄ, R.; UUSI-OUKARI, M. Ethanol: novel actions on nerve cell physiology explain impaired functions. **News Physiology Science**, v.13, p.164-170, 1998.

LABUDA, C.J.; FUCHS, P.N. Aspirin attenuates the anxiolytic actions of ethanol. **Alcohol**, v.21, p.287-290, 2000.

LACOSTE, L.; HUNG, J.; LAM, J.Y.T. Acute and delayed antithrombotic effects of alcohol in humans. **The American Journal of Cardiology**, v. 87, p.82-85, 2001.

LANDOLFI, R.; STEINER, M. Ethanol raises prostacyclin in vivo and in vitro. **Blood**, v.64, n.3, p. 679-682, 1984.

LASNER, M.; ROTH, L.G.; CHEN, C.H. Structure- functional effects of a series of alcohols on acetylcholinesterase- associated membrane vesicles: elucidation of factors contributing to the alcohol action. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.317, n.2, p.391-396, 1995.

LASSITER, T.L.; MARSHALL, R.S.; JACKSON, L.C.; HUNTER, L.; VU, J.T.; PADILLA, S. Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. **Toxicology**, v.186, p.241-253, 2003.

LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. **Wintrobe Hematologia Clínica**. v. I/ II. São Paulo: Manole, 1998, p.2623.

LÉON, C.; HECHLER, B.; VIAL, C.; LERAY, C.; CAZENAVE, J.P.; GACHET, C. The P2Y receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. **FEBS Letters**, v.403, p.26-31, 1997.

LIN, D.C. Involvement of the lipid and protein components of (Na⁺, K⁺) adenosine triphosphatase in the inhibitory action of alcohol. **Biochemical Pharmacology**, v.29, p.771-775, 1980.

LINDI, C.; MONTORFANO, G.; MARCIANI, P. Rat erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation after chronic ethanol intake. **Alcohol**, v.16, n.4, p.311-316, 1998.

LOPES, C.S.; SICHIERI, R. Estudo caso-controle sobre distúrbios psiquiátricos e com álcool como fatores de risco para padrão de abuso de drogas. **Caderno de Saúde Pública**, v.18, n.6, p.1571-1575, 2002.

LORENZI, T.F. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 2.ed. MEDSI, 1999.

LYNCH, M.A.; PAGONIS, C.; SAMUEL, D.; LITTLETON, J.M. Alterations in Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent release of catecholamines in preparations of rat brain produced by ethanol treatment *in vivo*. **Alcohol**, v.2, p.139-144, 1985.

MACIEIRA, M.S; ALMEIDA, W.G.; SILVA, E.A.; SCHENBERG, L.C.; AKAMURA-PALACIOS, E.M. Alcohol dependence induced in rats by semivoluntary intermittent. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.1107-1111, 1997.

MALATOVÁ, Z.; CÍSKOVÁ, D. Effect of ethanol on axonal transport of cholinergic enzymes in rat sciatic nerve. **Alcohol**, v.26, p.115-120, 2002.

MANN, K.; HERMANN, D.; HEINZ, A. One hundred years of alcoholism: the twentieth century. **Alcohol & Alcoholism**, v.35, n.1, p.10-15, 2000.

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.F.; PINSKY, D.J.; ISLAM, N.; MALISZEWSKI, C.R. Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD 39/ ecto-ADPase: significance for occlusive vascular diseases. **Italian Heart Journal**, v.2, p.824-830, 2001.

MARQUES, A.; GUERRI, C. Effects of ethanol on rat brain (Na⁺,K⁺) ATPase from native and delipidized synaptic membranes. **Biochemical Pharmacology**, v.37, n.4, p. 601-606, 1988.

MASSOULIÉ, J. The polymorphism of cholinesterases and its physiological significance. **TIBS**, p.160-164, 1980.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v.41, p.31-91, 1993.

MASSOULIÉ, J.; ANSELMET, A.; BON, S.; KREJCI, E.; LEGAY, C.; MOREL, N.; SIMON, S. Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. **Journal of Physiology**, v.92, p.183-190, 1998.

MASSOULIÉ, J.; ANSELMET, A.; BON, S.; KREJCI, E.; LEGAY, C.; MOREL, N.; SIMON, S. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. **Chemico-Biological Interactions**, v.119-120, p.29-42, 1999.

McDONOUGH, K.H. Antioxidant nutrients and alcohol. **Toxicology**, v.178, p.89-97, 2003.

MEHTA, P.; MEHTA J.; LAWSON, D.; PATEL, S. Ethanol stimulates prostacyclin biosynthesis by human neutrophils and potentiates anti-platelet aggregatory effects of prostacyclin. **Thrombosis Research**, v.48, p.171-180, 1987.

MEISTER, K.A.; WHELAN, E.M.; KAVA, R. The health effects of moderate alcohol intake in humans: an epidemiologic review. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.37, n.3, p.261-296, 2000.

MIKHAILIDIS, D.P.; BARRADAS, M.A.; JEREMY, J.Y. The effect of ethanol on platelet function and vascular prostanoids. **Alcohol**, v.7, p.171-180, 1990.

MIKOLAJCZAK, P.; OKULICZ-KOZARYN, I.; KAMINSKA, E.; SZULC, M.; DYR, W.; KOSTOWSKI, W. Lack of ifenprodil anxiolytic activity after its multiple treatment in chronically ethanol-treated rats. **Alcohol & Alcoholism**, v.38, n.4, p.310-315, 2003.

MILLER, M.W.; RIECK, R.W. Effects of chronic ethanol administration on acetylcholinesterase activity in the somatosensory cortex and basal forebrain of the rat. **Brain Research**, v.627, p.104-112, 1993.

MINAYO, M.C.S.; DESLANDES, S.F. A complexidade das relações entre drogas, álcool e violência. **Caderno de Saúde Pública**, v.14, n.1, p.35-42, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. A Política do Ministério da Saúde para a Atenção Integral a Usuários de Álcool e outras Drogas, Brasília, 2003, p.55.

MIQUEL, M.; AGUILAR, M.A.; ARAGÒN, C.M.G. Ascorbic acid antagonizes ethanol-induced locomotor activity in the open-field. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.62, n.2, p.361-366, 1999.

MUZYKANTOV, V.R. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. **Journal of Controlled Release**, v.71, p.1-21, 2001.

NAHAS, T.R. O teste do campo-aberto. Disponível em <<http://www.ib.usp.br/~gfxavier/cap11.html>> Acesso em: 1º set. 2003.

NGUYEN, A.; PACKHAM, M.A.; RAND, M.L. Effects of ethanol on platelet responses associated with adhesion to collagen. **Thrombosis Research**, v.95, p.303-314, 1999.

NIAURA, R.S.; NATHAN, P.E.; FRANKENSTEIN, W.; SHAPIRO, A.P.; BRICK, J. Gender differences in acute psychomotor, cognitive, and pharmacokinetic response to alcohol. **Addictive Behaviors**, v.12, p.345-356, 1987.

NORDMANN, R.; RIBIÈRE, C.; ROUACH, H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v.12, p.219-240, 1992.

ONAIVI, E.S.; TODD, S.; MARTIN, B.R. Behavioral effects in the mouse during and following withdrawal from ethanol ingestion and/or nicotine administration. **Drug and Alcohol Dependence**, v.24, p.205-211, 1989.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351-358, 1979.

OSÉS, J.P.; CARDOSO, C.M.; GERMANO, R.A.; KIRST, I.B.; RÜCKER, B.; FÜRSTENAU, C.R.; WINK, M.R.; BONAN, C.D.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Life Sciences**, v.74, p.3275-3284, 2004.

OWASOYO, J.O.; IRAMAIN, C.A. Effect of acute ethanol intoxication on the enzymes of the cholinergic system in mouse brain. **Toxicology Letters**, v.9, p.267-270, 1981.

PARMAHAMSA, M.; REDDY, R.K.; VARADACHARYULU, E. Changes in composition and properties of erythrocyte membrane in chronic alcoholics. **Alcohol & Alcoholism**, v.39, p.110-112, 2004.

PATEL, V.A.; POHORECKY, L.A. Acute and chronic ethanol treatment on beta-endorphin and catecholamine levels. **Alcohol**, v.6, p.59-63, 1989.

PEREIRA, S.R.C.; MENEZES, G.A.; FRANCO, G.C.; COSTA, A.E.B.; RIBEIRO, A.M. Chronic ethanol consumption impairs spatial remote memory in rats but does not affect cortical cholinergic parameters. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.60, n.2, p.305-311, 1998.

PERRIER, A.L.; MASSOULIÉ, J.; KREJCI, E. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. **Neuron**, v.33, p.275-285, 2002.

PIETRANGELO, A. Iron-induced oxidant stress in alcoholic liver fibrogenesis. **Alcohol**, v.30, p.121-129, 2003.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETO, S.S.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v.7, p.225-230, 1996.

PINSKY, D.J.; BROEKMAN, M.J.; PESCHON, J.J.; STOCKING, K.L.; FUJITA, T.; RAMASAMY, R.; CONNOLY JR, E.S.; HUANG, J.; KISS, S; ZHANG, Y.; CHOUDHRI, T.F.; MCTAGGART, R.A.; LIAO, H.; DROSOPOULOS, J.H.F.; PRICE, V.L.; MARCUS, A.J.; MLISZEWSKI, C.R. Elucidation of the thromboregulatory role of CD 39 ecto-apyrase in the ischemic brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v.109, n.8, p.1031-1040, 2002.

PIRES, R.G.W.; PEREIRA, S.R.C.; PITTELLA, J.E.H.; FRANCO, G.C.; FERREIRA, C.L.M.; FERNANDES, P.A.; RIBEIRO, A.M. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.70, p.227-235, 2001.

POHORECKY, L.A.; MAKOWSKI, E.; NEWMAN, B.; RASSI, E. Cholinergic mediation of motor effects of ethanol in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.55, p.67-72, 1979.

POHORECKY, L.A.; ROBERTS, P. Daily dose of ethanol and the development and decay of acute and chronic tolerance and physical dependence in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.42, p.831-842, 1992.

POKK, P.; SEPP, E.; VASSILJEV, V.; VÄLI, M. The effects of the nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on the behaviour of mice after chronic ethanol administration. **Alcohol & Alcoholism**, v.36, n.3, 2001.

PÖSCHL, G.; SEITZ, H.K. Alcohol and cancer. **Alcohol & Alcoholism**, v.39, n.3, p.155-165, 2004.

RAJASEKARAN, K. Effects of combined exposure to aluminium and ethanol on food intake, motor behaviour and a few biochemical parameters in pubertal rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.9, p.25-30, 2000.

RAMAMURTHI, A.; ROBSON, S.C.; LEWIS, R.S. Effects of nitric oxide (NO) and soluble nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) on inhibition of platelet deposition in vitro. **Thrombosis Research**, v.102, p.331-341, 2001.

RAMCHANDANI, V.A.; BOSRON, W.F.; LI, T.K. Research advances in ethanol metabolism. **Pathol Biol**, v.49, p.676-682, 2001.

REDDY, S.K.; HUSAIN, K.; SCHLORFF, E.C.; SCOTT, R.B.; SOMANI, S.M. Dose response of ethanol ingestion on antioxidant defense system in rat brain subcellular fractions. **Neurotoxicology**, v.20, n.6, p 977-987, 1999.

RENAUD, S.C.; RUF, J.C. Effects of alcohol on platelet functions. **Clinica Chimica Acta**, v.246, p.77-89, 1996.

REX, A; VOIGT, J.P.; VOITS, M.; FINK, H. Pharmacological evaluation of a modified open-field test sensitive to anxiolytic drugs. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.59, n.3, p.677-683, 1998.

RODGERS, R.J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.21, n.6, p.801-810, 1997.

RODRIGO, R.; TRUJILLO, S.; Bosco, C.; ORELLANA, M.; THIELEMANN, L.; ARAYA, J. Changes in (Na⁺, K⁺)-adenosine triphosphatase activity and ultrastructure of lung and kidney associated with oxidative stress induced by acute ethanol intoxication. **Chest**, v.121, n.2, p.589-596, 2002.

RODRIGO, R.; THIELEMANN, L. Effects of chronic and acute ethanol exposure on renal (Na⁺,K⁺) ATPase in the rat. **General Pharmacology**, v.29, n.5, p. 719-723, 1997.

ROSENBLUM, E.R.; GAVALER, J.S.; VAN THIEL, D.H. Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol-induced testicular injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v.7, p.569-577, 1989.

ROUACH, H.; RIBIERE, C.; PARK, M.K.; SAFFAR, C.; NORDMANN, R. Lipid peroxidation and brain mitochondrial damage induced by ethanol. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v.18, p.211-217, 1987.

RUBIN, R. Ethanol interferes with collagen-induced platelet activation by inhibition of arachidonic acid mobilization. **Archives of Biochemistry & Biophysics**, v.270, p. 99-113, 1989.

SANCHEZ-AMATE, M.C.; CARRASCO, M.P.; MARCO, C.; SEGOVIA, J.L. Adaptative changes induced by chronic ethanol ingestion on hepatic mitochondrial and microsomal enzyme activities. **International Journal of Biochemistry/ Cellular Biology**, v.28, n.1, p. 23-27, 1996.

SANCHIS-SEGURA, C.; MIQUEL, M.; CORREA, M.; ARAGON, C.M.G. The catalase inhibitor sodium azide reduces ethanol-induced locomotor activity. **Alcohol**, v.19, n.1, p.37-42, 1999.

SCHLORFF, E.C.; HUSAIN, K.; SOMANI, S.M. Dose and time dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. **Alcohol**, v.17, n.2, p.97-105, 1999a.

SCHLORFF, E.C.; HUSAIN, K.; SOMANI, S.M. Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. **Alcohol**, v.18, n.2/3, p. 203-214, 1999b.

SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.;BRAUN, N.; GUCKELBERGER, O.; CSIZMADIA, E.; QAWI, I.; IMAI,M.; ZIMMERMAN, H.; ROBSON, S.C. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1) and NTPDase 2 have implicatios for thromboregulation. **Blood**, v.99, p.2801-2809, 2002.

SHAW, S. Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. **Free Radical Biology & Medicine**, v.7, p.541-547, 1989.

SHIN, S.; ROTH, L.G.; CHEN, C.H. Ethanol-acetylcholinesterase-inhibitor interactions: inhibitor hydrophobicity and site specificity dependence. **International Journal of Biochemistry**, v.23, n.10, p.1131-1136, 1991a.

SHIN, S.; WU, P.; CHEN, C.H. Biochemical studies of the actions of ethanol on acetylcholinesterase activity: ethanol-enzyme-solvent interaction. **International Journal of Biochemistry**, v.23, n.2, p.169-174, 1991b.

SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; FISHER, S.K.; UHLER, M.D. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 6. ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 1999, p.1183.

SIES, H. **Antioxidant in Disease Mechanisms and Terapy/ Advances in Pharmacology**. v. 38. California: Academic Press, 1997, p.707.

SINCLAIR, J.D.; GUSTAFSSON, K. Behavioral changes in rats on the day after acute ethanol intoxication. **Alcohol**, v.4, p.503-507, 1987.

SLAWECKI, C.J.; SOMES, C.; EHLERS, C.L. Effects of chronic ethanol exposure on neurophysiological responses to corticotropin- releasing factor and neuropeptide Y. **Alcohol & Alcoholism**, v.34, n.3, p.289-299, 1999.

SOSLAU, G.; McKENZIE, R.J.; BRODSKY, I.; DEVLIN, T.M. Extracellular ATP inhibits agonist-induced mobilization of internal calcium in human platelets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1268, p.73-80, 1995.

SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKORN, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1355, p.131-140, 1997.

SOSLAU, G.; SCHECHNER, A.J.; ALCASID, P.J.; CLASS, R. Influence of vortex speed on fresh versus stored platelet aggregation in the absence and presence of extracellular ATP. **Thrombosis Research**, v.97, p.15-27, 2000.

SPERTINI, O.; HAUERT, J.; BACHMANN, F. Reaction of acetaldehyde with human platelets. **Thrombosis and Haemostasis**, v.67, n.1, p.126-130, 1992.

SWANN, A. (Na⁺, K⁺)-ATPase and noradrenergic function: effects of chronic ethanol. **European Journal of Pharmacology**, v.134, p.145-153, 1987.

TAKAHASHI, O. Characteristics of rat platelets and relative contributions of platelets and blood coagulation to haemostasis. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p.203-218, 2000.

TASCA, T.; BONAN, C.D; DE CARLI, G.A.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. **Experimental Parasitology**, article in press, 2003.

TAYYABKHAN, T.R.; MAMMOLA, B.N.; DRUGAN, R.C. A comparison of female and male rats' ETOH-induced ataxia and exploration following restraint or swim stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.72, p.335-342, 2002.

THOMPSON, P. Platelet and erythrocyte membrane fluidity changes in alcohol-dependent patients undergoing acute withdrawal. **Alcohol & Alcoholism**, v.34, n.3, p.349-354, 1999.

UZBAY, I.T.; KAYAALP, S.O. A modified liquid diet of chronic ethanol administration validation by ethanol withdrawal syndrome in rats. **Pharmacological Research**, v.31, n.1, 1995.

VALENZUELA, M.A.; LOPES, J.; DEPIX, M.; MANCILLA, M.; KETTLUN, A.M.; CATALAN, L.; CHIONG, M.; GARRIDO, J.; TRAVERSO-CORI, A. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.93B, p.911-919, 1989.

VASCONCELOS, S.M.M.; MACÊDO, D.S.; LIMA, L.O.; SOUSA, F.C.F.; FONTELES, M.M.F.; VIANA, G.S.B. Effect of one-week ethanol treatment on monoamine levels and dopaminergic receptors in rat striatum. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.503-509, 2003.

VASSILJEV, V.; KALDA, A.; POKK, P.; VÄLI, M.; ZHARKOVSKY, A. The effects of the nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on ethanol pharmacokinetics in rats after acute and chronic ethanol administration. **Alcohol & Alcoholism**, v.33, n.6, p.609-615, 1998.

VILLESCAS, R.; OSTWALD, R.; MORIMOTO, H.; BENNET, E. Effects of neonatal undernutrition and cold stress on behavior and biochemical brain parameters in rats. **Journal of Nutrition**, v.111, p.1103-1110, 1981.

VLIEGENTHART, R.; GELEIJNSE, J.M.; HOFMAN, A.; MEIJER, W.T.; VAN ROOIJ, F.J.A.; GROBBEE, D.E.; WITTEMAN, J.C.M. Alcohol consumption and risk of peripheral arterial disease- The Rotterdam Study-. **American Journal of Epidemiology**, v.155, n.4, p.332-338, 2002.

WALL, P.M.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, p.275-286, 2001.

WANG, M.Q.; NICHOLSON, M.E.; JONES, C.S.; FITZHUGH, E.C.; WESTERFIELD, C.R. Acute alcohol intoxication, body composition, and pharmacokinetics. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.43, p.641-643, 1992.

WEIGHT, F.F.; Li, C.; PEOPLES, R.W. Alcohol action on membrane ion channels gated by extracellular ATP (P2X receptors). **Neurochemistry International**, v.35, p.143-152, 1999.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B.; HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International**, 32, p. 421-425, 1998.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends in Pharmacology Science**, v.20, p.231-236, 1999.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v.52, p.44-56, 2001.

ANEXOS

ANEXO 1

30



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
 DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
 Seção de Patologia Veterinária
 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil
 Telefone (055) 220-8168. fax (055) 220-8284
 E-mail <Barroscs@lince.hcv.ufsm.br>

LAUDO DE NECROPSIA
 (Vn-394-03)

Ficha clínica: não se aplica

Material nº. não se aplica

Data rec.: 16/12/03

1. Espécie: roedor 2. Procedência: Santa Maria - RS 3. Idade: 6 meses

4. Sexo: M MC F FC 5. Peso(kg): 6. Raça: Wistar

7. Proprietário: Glaecir Dias

8. Endereço/Telefone: UFSM

9. Clínico: Glaecir Dias

10. Endereço/Telefone: UFSM Fone: 220-8665

11. Tempo decorrido desde a morte: 8 horas

Eutanásia - Método: éter Morte espontânea

12. Conservado em: Câmara fria Temperatura ambiente

13. Estado de conservação:

Bom Alterações PM iniciais Alterações PM moderadas Alterações PM acentuadas.

14. Histórico clínico (incluindo resultados laboratoriais): segundo o proprietário, o animal apresenta aumento de volume duro no lado esquerdo da face e emagressimento progressivo. O animal pertence ao grupo dos animais tratados de um experimento com etanol a 20% adicionado a água de beber.

15. Diagnóstico: não consta

16. Diagnóstico(s) do Patologista (incluindo código numeral):

98390 - Mandíbula, osteossarcoma, roedor, macho, Wistar, 6 meses

95532 - Fígado, sem alterações, roedor, macho, Wistar, 6 meses

17. Comentários: laudo em andamento (tumor na mandíbula descalcificando).

18. Material enviado p/:[Tóxicologia, Bacteriologia, Virologia, Parasitologia Micologia. Patol. Clínica Microscopia Eletrônica: Pat. /

19. Patologista/CRMV: Dominguita L. Graça/2109 20. Pós-Grad.: Marcia Silva

Descrição de Necropsia
 (Vn-394-03)

Cadáver de um roedor, macho, Wistar, 6 meses, com 20 cm da nuca ao sacro, em estado nutricional regular. Há um aumento de volume duro no lado esquerdo da face, recoberto por pele e músculo (compatível com osteossarcoma). Histo (fígado) - sem alterações.

ANEXO 2

30



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
 DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
 Seção de Patologia Veterinária
 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil
 Telefone (055) 220-8168. fax (055) 220-8284
 E-mail <Barroscs@lince.hcv.ufsm.br>

LAUDO DE NECROPSIA
 (Vn-028-04)

Ficha clínica: não se aplica

Material nº. não se aplica

Data rec.: 17/02/04

1. Espécie: *Rattus norvegicus* 2. Procedência: Santa Maria - RS 3. Idade: 8 meses

4. Sexo: M MC F FC 5. Peso(kg): 6. Cepa: Wistar

7. Proprietário: Glaecir Dias

8. Endereço/Telefone: Bioquímica - UFSM

9. Clínico: não consta

10. Endereço/Telefone: não consta

11. Tempo decorrido desde a morte:

Eutanásia - Método: éter Morte espontânea

12. Conservado em: Câmara fria Temperatura ambiente

13. Estado de conservação:

Bom Alterações PM iniciais Alterações PM moderadas Alterações PM acentuadas.

14. Histórico clínico (incluindo resultados laboratoriais): segundo o proprietário, o animal pertence a experimento ingerindo solução alcoólica a 20% há 6 meses. Há uma semana apresenta aumento de volume na região ventral do pescoço.

15. Diagnóstico: não consta

16. Diagnóstico(s) do Patologista (incluindo código numeral):

91191 - *Pele, carcinoma indiferenciado, Rattus norvegicus, macho, cepa Wistar, 8 meses*

17. Comentários:

18. Material enviado p/:[Toxicologia, Bacteriologia, Virologia, Parasitologia Micologia. Patol. Clínica Microscopia Eletrônica: Pat. /

19. Patologista/CRMV: Claudio Barros/588

20. Pós-Grad.: Marcia

Silva

**Descrição de Necropsia
(Vn-028-04)**

Cadáver de um *Rattus norvegicus*, macho, cepa Wistar, 8 meses, com 15 cm da nuca ao sacro, em bom estado nutricional. Há aumento de volume flutuante de 5 cm de diâmetro, recoberto por pele na região ventral do pescoço. Ao corte é macio, beje com áreas centrais marrom (necrose). Histo (pele) - há acentuada proliferação de células neoplásicas pleomórficas com aspecto sólido na derme. Essas células possuem núcleo grande, redondo ou ovalado, com cromatina moderadamente agregada. O tecido conjuntivo de sustentação é escasso. Pode-se notar áreas multifocais de necrose no interior do tumor. Histo (fígado) - sem alterações.

Material coletado: tumor, fígado, rim, adrenal, coração, pulmão

Material encaminhado: tumor, fígado