NEUSA MARIA NASCIMENTO PIMENTEL

Avaliação da resposta imuno-inflamatória no tecido
cerebral de camundongos deficientes em CRAMP
submetidos a modelo de etilismo agudo

São Paulo

2018

NEUSA MARIA NASCIMENTO PIMENTEL

Avaliação da resposta imuno-inflamatória no tecido
cerebral de camundongos deficientes em CRAMP
submetidos a modelo de etilismo agudo

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos
Imunes e Infeciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano
Pinheiro da Silva

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pimentel, Neusa Maria Nascimento
Avaliação da resposta imuno-inflamatória no tecido
cerebral de camundongos deficientes em CRAMP
submetidos a modelo de etilismo agudo / Neusa Maria
Nascimento Pimentel. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Imunes e Infecciosos.
Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Descritores: 1.Alcoolismo 2.Inflamação 3.Sistema
nervoso central 4.Adolescente 5.Ácido gama-
aminobutírico 6.Interleucina-1beta 7.Dopamina

USP/FM/DBD-211/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

*Dedico este trabalho a minha família,
que esteve ao meu lado
incondicionalmente.*

Meu amor eterno.

Agradecimentos

Concluir uma dissertação não é tarefa fácil, exige muito trabalho e dedicação. Mas, ao final vem à alegria do trabalho concluído. Perceber o quanto vale a pena ter ampliado o conhecimento, que independente de vários fatores sempre poderá buscá-lo. O conhecimento traz domínio e a certeza que sempre poderemos aprender mais, que nunca é o suficiente, pois ele só se encerra com o final da vida.

Meu primeiro agradecimento está direcionado a **Deus**, pois creio na força divina, amorosa que nos envolve e nos auxilia na caminhada.

A minha **família**, que amo muito. Meu pai **Bartolomeu** um homem fantástico, sábio e inteligente que me ensinou e ensina muito. A **Lindaura** minha mãe querida, sempre amorosa e dedicada. Minha irmã **Rosângela** exemplo de disciplina, dedicação e alegria. Meu irmão **Carlos**, sempre amoroso e alegre. Meus sobrinhos **Álida, Aleksander, Rafael, Gabriel e Miguel** que eu amo muito. Uma família maravilhosa que Deus me concedeu a oportunidade de fazer parte.

Ao meu orientador **Fabiano Pinheiro da Silva**, que teve paciência nos meus momentos de dificuldade, que mostrou sem um ser humano maravilhoso, que se preocupa e se dedica a todos os alunos. Tenho orgulho de fazer parte do seu grupo. Só posso lhe agradecer muito por tudo.

Ao professor Prof. Dr. **Heraldo Possolo de Souza**, que me auxiliou quando necessitei, não há palavras que sejam suficientes para agradecer.

Ao Prof. Dr. **Francisco Soriano** obrigada pelas orientações, pelo carinho e alegria que dedica a todos nós.

Ao Prof. Dr. **Marcel Cerqueira Cesar** todo meu agradecimento por dividir conosco sua incomensurável sabedoria.

A minha querida amiga **Suely Ariga**, que durante minha caminhada pela pesquisa me ensinou muito, esteve do meu lado em vários experimentos, mas acima de tudo, hoje faz parte da minha família.

Aos amigos **Thais Salgado, Denise e Hermes Barbeiro, Kely Gouvea, Ricardo Petroni, Marta de Almeida, Mike Yoshio, Marta Batista, Simone Ferreira**, que estiveram comigo e me auxiliaram nesta trajetória.

Aos amigos, **Antônio Carlos Pedroso de Moraes Jr.** antes meu professor, hoje meu irmão, sempre ao meu lado e **Marli Roque de Oliveira** amiga de infância, unidas sempre.

Agradeço ao Prof. Dr. ***Irineu Tadeu Velasco*** pela oportunidade de realizar este trabalho.

Pensar é difícil por isso à maioria das pessoas prefere julgar. Tudo que nos irrita no outro nos leva a um conhecimento de nós mesmos. O melhor trabalho político, social e espiritual que podemos fazer é parar de projetar nossas sombras nos outros. Não há despertar de consciências sem dor. As pessoas farão de tudo, chegando aos limites do absurdo para evitar enfrentar a sua própria alma. Ninguém se torna iluminado por imaginar figuras de luz, mas sim por tornar consciente a escuridão.

Carl Gustav Jung

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabela

Resumo

Summary

1 Introdução

1.1 Alcoolismo.....	1
1.2 O Distúrbio por uso de álcool (AUD) de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (DSM).....	6
1.3 Transtornos relacionados a substância e transtornos aditivos.....	7
1.4 Alcool e danos à saúde.....	14
1.5 Uso do álcool na adolescência.....	18
1.6 Aspecto neurobiológico da dependência do álcool.....	23
1.7 Plasticidade sináptica e álcool.....	30
1.8 Neuroadaptação.....	32
1.9 Sistemas dopaminérgico.....	36
1.10 Neuropeptídeos.....	38
1.11 Orexina.....	39
1.12 Neurotensina.....	41
1.13 Substância P.....	44
1.14 α MSH.....	45
1.15 Ocitocina.....	47
1.16 β Endorfina.....	49
1.17 CRAMP.....	50

1.18	Alcoolismo, infecção e sistema neuroimune.....	51
2	Objetivos.....	56
3	Justificativa.....	57
4	Metodologia	
4.1	Local de realização dos experimentos.....	58
4.2	Animais.....	58
4.3	Modelo de intoxicação alcoólica.....	59
4.4	Coleta do material biológico.....	61
4.5	Técnicas moleculares e de histologia.....	62
4.6	Análise estatística.....	62
5	Resultados	
5.1	Resultado de ingestão de álcool.....	63
5.2	Resultado de neuropeptídeo.....	64
5.3	Resultados de citocinas.....	66
6	Discussão.....	70
7	Conclusão.....	76
8	Anexo	77
9	Referências.....	78

Lista de abreviaturas

ADH	Álcool desidrogenase
AIE	Álcool intermitente adolescente
AMG	Amígdala
AMP	Antimicrobial Peptide
APA	American Psychiatric Association
ARND	Transtorno neurológico relacionado ao álcool
Arc	Núcleo arqueado do hipotálamo
ATV	Área tegmental Ventral
AUD	Distúrbio por uso de álcool
AVP	Vasopressina
BACs	Beber álcool compulsivo
BDNF	Fator neurotrópico derivado do cérebro
CAC	Cortex cingulado anterior
CAS	Concentração de álcool no sangue
C e A	Núcleo central da amígdala
CRAMP	Peptídeo antimicrobiano em murrinos equivalente catalecidina LL-37 em humanos.
CISA	Centro de informação sobre saúde e álcool
CID	Código internacional de doenças
CPF	Cortex pré-frontal
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DA	Dopamina
DAergic	Dopaminérgico
DLS	Striatum dorsolateral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	Manual diagnóstico e estatístico das doenças mentais da Associação Americana de Psiquiatria
FAZ	Alcoolismo fetal
FASDs	Transtorno do espectro do alcoolismo fetal
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GABAR	Receptores GABA
GRAMP	Catelina péptido antimicrobiano
HF	Histórico familiar
HF+	Histórico familiar positivo
HL	Hipotálamo lateral
HMGB1	Grupo de alta mobilidade grupo 1
HMD	Hipotálamo dorsal medial
LPT	Potencial de longo termo
LTD	Potencial de longo prazo
MC4R	Melanocortina 4R
MeA	Núcleo medial da amígdala
NAC	Núcleo accumbens

ND-PAE	Distúrbio Neurocomportamental associado a exposição pré-natal ao álcool
NE	Norepinefrina
NF-KB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NKR1	Neuroquinina 1
NLET	Núcleo terminal estrial
NMDA	Receptor glutamatergico de N-metil-D-aspartato
NPs	Neuropeptídeos
NT	Neurotensina
OMS	Organização mundial de saúde
OTX	Ocitocina
OX	Orexina
PAE	Exposição pré-natal ao álcool
PEF	Hipotálamo periférico
PFLH	
POMC	Pró-encefalomelanocortina
PPRs	Receptores de reconhecimento padrão
PV	pálido ventral
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervoso central
SMS	Striatum dorso medial
SP	Substância P
TK	Taquiquinina
TLRs	Toll like receptor
TUS	Transtorno por uso de substância
VTA	Área tegmental ventral

Lista de Figuras

Figura 1	Consumo de álcool no mundo.....	5
Figura 2	Circuitos de recompensa e sistema de neurotransmissores.....	9
Figura 3	Critérios para TUS entre DSM-IV e DSM 5.....	10
Figura 4	Transtornos relacionados a substâncias e transtornos aditivos (TUS).....	11
Figura 5	Via de orexina.....	18
Figura 6	Ingesta de álcool entre os grupos de animais KO Eth e WT Eth.....	25
Figura 7	Análise dos neuropeptídeos no encéfalo de camundongos Wild type vs KO Cramp.....	35
Figura 8	Vias dopaminérgicas.....	37
Figura 9	Dosagem de citocinas por Milliplex no encéfalo de camundongos c57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp.....	40
Figura 10	Dosagem por Milliplex no encéfalo de camundongos c57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp.....	63
Figura 11	Análise dos neuropeptídeos no encefalo de camundongos Wild type vs KO Cramp.....	64
Figura 12	Dosagem dos neuropeptídeos por Milliplex no encefalo de camundongos C57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp.....	65
Figura 13	Dosagem de citocinas por Milliplex no encefalo de camundongos C57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp.....	66
Figura 14	Dosagem por Milliplex no encefalo de camundongos C57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp.....	67
Figura 15	Níveis de IL-1 beta no fígado e íleo de camundongos selvagens e deficientes em CRAMP.....	68

Lista de Tabela

Tabela 1	Efeitos da alcoolemia (CAS) no comportamento.....	13
----------	---	----

Resumo

Pimentel NMN. *Avaliação da resposta imuno-inflamatória no tecido cerebral de camundongos deficientes em CRAMP submetidos a modelo de etilismo agudo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O uso de álcool está aumentando em nossa sociedade e permanece associado a inúmeros problemas sociais, econômicos e de saúde. De fato, o álcool e os problemas de saúde associados a ele exercem um impacto importante na prática médica e representam um dos maiores desafios da saúde pública. O consumo de álcool na sociedade contemporânea é geralmente aceito positivamente, dificultando o reconhecimento de certos padrões de consumo como doença.

O alcoolismo é um transtorno recidivante crônico caracterizado pela ingestão compulsiva de quantidades excessivas de etanol, perda de controle em sua ingestão, comportamento inadequado e a presença de um estado emocional negativo. O consumo de quantidades nocivas de álcool resulta em danos físicos e psicológicos e o vício é um transtorno psiquiátrico que afeta as funções executivas, causando perda de interesse em outros alvos do prazer e comportamento compulsivo de busca por drogas. O álcool interage com vários sistemas neurológicos. O presente trabalho analisou a resposta imunoinflamatória no tecido cerebral de camundongos CRAMP knockout (KO) jovens e tipo selvagem (WT) submetidos ao modelo de intoxicação alcoólica, com o objetivo de investigar o impacto de CRAMP na dependência alcoólica no adolescente. O CRAMP é um peptídeo antimicrobiano com efeitos pleotrópicos e, até onde sabemos, seu papel nunca foi investigado nesse sentido. Também analisamos a secreção de vários neuropeptídeos, proteínas e citocinas. Nossos resultados mostraram uma diferença significativa na ingestão de etanol entre os animais comparados CRAMP KO e WT, o que foi relacionado a um aumento nos níveis cerebelares de IL-1 β . Concluímos que os peptídeos antimicrobianos podem ter um papel importante na resposta imunoinflamatória que ocorre durante o etilismo agudo.

Descritores: Alcoolismo; Inflamação; Sistema nervoso central; Adolescente;

Ácido gama-aminobutírico; Interleucina-1beta; Dopamina

Summary

Pimentel NMN. *Evaluation of the immune and inflammatory response in the brain tissue of CRAMP-deficient mice submitted to a model of acute ethanol intake* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

The use of alcohol is increasing in our society and remains associated with countless social, economic and health problems. In fact, alcohol and the health issues associated to its abuse exert an important impact on medical practice and represent one of the biggest challenges of public health. The consumption of alcohol in contemporary society is generally accepted positively, making certain patterns of consumption very difficult to be recognized as a disease.

Alcoholism is a chronic relapsing disorder characterized by compulsive ingestion of excessive amounts of ethanol, loss of control in its intake, inappropriate behavior and the presence of a negative emotional state. The consumption of harmful amounts of alcohol results in physical and or psychological damage and addiction is a psychiatric disorder that affects the executive functions, causing loss of interest in other aspects of life and a compulsive behavior. Alcohol interacts with several neurologic systems. The present work analyzed the immuno-inflammatory response in the brain tissue of young CRAMP knockout (KO) and wild-type (WT) mice submitted to a model of alcohol intoxication, in order to investigate the impact of CRAMP in teenager alcohol addiction. CRAMP is an antimicrobial peptide with pleiotropic effects and, as far as we know, its role had never been investigated in this regard. We also analysed the secretion of several neuropeptides, proteins and cytokines. Our results showed a significant difference in ethanol intake when CRAMP KO and WT animals were compared, which was related to an increase in the cerebellar levels of IL-1 β . We conclude that antimicrobial peptides may play an important role in the immunoinflammatory response that occurs during acute alcoholism.

Descriptors: Alcoholism; Inflammation; Central nervous system; Adolescent;

Gamma-aminobutyric acid; Interleukin-1 beta; Dopamine

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alcoolismo

O álcool, talvez seja a droga mais antiga utilizada pela espécie humana¹. O consumo de álcool nas diferentes civilizações, inicia-se com a revolução neolítica, onde se dá um avanço nas tecnologias de fermentação, o que contribui para um aumento da produção de matérias primas como cevada e frutas. Registros datados de 2200 a.C. apontam para o consumo de bebidas. Os antigos egípcios tinham destilarias a cerca de seis mil anos havendo o culto a Osíris como forma de agradecimento pela dádiva da cevada.

Os gregos por sua vez, cultuavam a Dionísio, onde ofereciam bebidas alcoólicas a deuses e a soldados para facilitar as relações interpessoais. Os romanos agradeciam a Baco a criação do “vinho divino” e foram eles que contribuíram para a regulação da produção do vinho e sua distribuição pela Europa. O vinho tornou se assim, um fenômeno universal. Também a nível da religião o vinho é fortemente reverenciado.

O vinho era e é uma constante nas cerimônias religiosas, realçando as realizadas pelo cristianismo, astecas, religião familiar chinesa, hinduísmo, bantu, entre outras. Uma das religiões que restringe ou proíbe o uso de álcool, é o islamismo.

Durante a idade média, o álcool esteve intimamente associado à saúde e bem estar, tendo sido associado como *aqua vitae*, tendo mesmo uma aplicação terapêutica em alguns casos de saúde. Já no século XVII os destilados passaram a liderar a comercialização, substituindo os fermentados e tornando-se um dos primeiros mercados mundiais.

Com a revolução industrial do século XIX, o mercado dos destilados adquire uma expansão maior, aumentando consideravelmente o seu consumo e, por consequência, aumentando os problemas relacionados a estes produtos. As primeiras campanhas de prevenção surgem nos anos 60 nos países desenvolvidos². No século 19, o alcoolismo passou a ser cientificamente aceito como uma doença em seu mais amplo conceito, como uma enfermidade física e mental³.

O consumo de álcool na sociedade contemporânea é visto predominantemente de forma positiva, o que dificulta o reconhecimento de determinados padrões de consumo como doença. Foi em 1849 que surgiu o termo alcoolismo e uma de suas primeiras definições, segundo Magnus Huss, o definiu como “o conjunto de manifestações patológicas do sistema nervoso, nas esferas psíquica, sensitiva e motora”. Mais tarde, de acordo com Morton Jellinek, a definição de alcoolismo foi reestruturada e o comportamento do alcoólico passou a ser classificado como doença, o que gerou uma repercussão social negativa. Jellinek definiu o alcoolista como todo indivíduo cujo consumo de bebidas alcoólicas pudesse prejudicar o próprio, a sociedade ou ambos, e categorizou o alcoolismo como doença, tendo como base as quantidades de álcool consumidas⁴.

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) define o alcoolista como um bebedor excessivo, cuja dependência em relação ao álcool é acompanhada de perturbações mentais, da saúde física, da relação com os outros e do comportamento social e econômico⁴.

O alcoolismo é um distúrbio recidivante crônico caracterizado pela ingestão compulsiva de quantidades excessivas de etanol, perda de controle sobre o consumo de álcool, presença de um estado emocional negativo (por exemplo, humor deprimido, ansiedade, sensibilidade ao estresse). Na retirada do consumo de álcool, o indivíduo apresenta uma preocupação com a obtenção do álcool e há um estreitamento do comportamento, onde o repertório é a busca pelo álcool em detrimento das atividades sociais, ocupacionais e recreativas, tolerância aos efeitos intoxicantes do etanol e consumo contínuo apesar das consequências negativas. O alcoolismo se desenvolve ao longo dos anos e envolve ciclos em espiral de intoxicação /retirada/craving⁵.

O alcoolismo é uma desordem psiquiátrica complexa, que causa danos nos tecidos em quase todos os órgãos⁶. A dependência do álcool tem sido tradicionalmente considerada um distúrbio cerebral em que as alterações de vários neurotransmissores e seus receptores em áreas específicas, como o circuito de recompensa cerebral desempenham um papel importante no desenvolvimento do vício. O álcool pode influenciar o comportamento e levar à manifestação de sintomas psicológicos em indivíduos dependentes⁶. O consumo pesado de álcool continua sendo um grave problema de saúde pública nos Estados Unidos e no mundo⁷.

Estima-se que 4 a 40% dos pacientes clínicos e cirúrgicos sofram de problemas relacionados ao consumo de álcool⁸. Assim, o álcool e os problemas de saúde associados a ele exercem impacto importante sobre a prática dos médicos e de outros especialistas, além de representar um dos maiores desafios da saúde pública⁸. O álcool é a droga viciante mais aceita socialmente. O abuso e a dependência do álcool causam problemas sociais, como violência doméstica e perda de produtividade no local de trabalho, bem como acidentes de trânsito e transtornos crônicos em órgãos³. O uso excessivo de álcool é a terceira causa de morte evitável nos Estados Unidos e é responsável por 3,8% das mortes no mundo⁹.

No Brasil e no mundo, o uso e abuso de álcool e/ou outras drogas legais e ilegais está aumentando gradualmente entre pessoas de todas as classes sociais, especialmente entre os jovens. É uma questão de saúde pública que merece mais atenção hoje devido a seus determinantes e restrições culturais, ético-legais, políticas, econômicas e tecnológicas que impactam os indivíduos, as famílias e a sociedade. Dessa forma, exige atenção não apenas dos pais e responsáveis dos jovens, mas também da sociedade, dos educadores, dos profissionais de saúde e da comunidade científica¹⁰. O alcoolismo é uma desordem debilitante para o indivíduo e muito dispendiosa para a sociedade. O reforço positivo é importante nas fases iniciais do consumo e abuso de álcool⁶.

De acordo com a OMS, 20% da população nos países em desenvolvimento são alcoólicos. Esta desordem é um dos principais problemas de saúde pública no mundo³. O uso do álcool está cada vez mais

prevalente em nossa sociedade e permanece associado a inúmeros problemas sociais, econômicos e de saúde.¹¹ A dependência do álcool e uso nocivo do álcool são reconhecidos como doença mental pela OMS (WHO, 1992)³. Cerca de 3,3 milhões de pessoas morreram em 2012 em todo o mundo em consequência do consumo nocivo de álcool. Pesquisa divulgada pela OMS mostra que o Brasil está acima da média mundial em consumo de bebidas alcoólicas. Segundo o levantamento, foram consumidos, em média, 8,7 litros de álcool por ano, entre 2008 e 2010, no país. A média mundial calculada pela OMS é de 6,2 litros. Os dados consideram o público maior de 15 anos¹² (Figura 1).

Figura 1 – Consumo de álcool no Mundo

Fonte CISA- Centro de informações sobre saúde e álcool – OMS – 2014

1.2 O Transtorno por uso de álcool de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (DSM)

Em maio de 2013, com o lançamento da 5ª edição do DSM (Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais da Associação Americana de Psiquiatria, ou DSM 5), houve uma mudança importante no diagnóstico dos transtornos por uso de substância¹¹. Conforme definido na quinta edição do DSM; American Psychiatric Association, 2013)¹³, o Transtorno por Uso de Álcool (AUD) é a nomenclatura atual para uso indevido de álcool. O distúrbio envolve um padrão problemático de uso de álcool, levando a sofrimento significativo e exigindo que dois dos 11 possíveis sintomas ocorram dentro de um período de 12 meses para atender aos critérios diagnósticos¹⁴.

O transtorno por uso de álcool ficou no capítulo de Addictive Disorders, que também inclui jogo patológico. O termo adicção ou adição já está em uso por alguns autores brasileiros e em alguns dicionários e possui o significado de predileção, vício ou "compulsão apresentada por determinados indivíduos para repetir os mesmos comportamentos gratificantes"¹¹. Até então abuso e dependência eram divididos em categorias diferentes. No DSM 5 os transtornos por uso de substâncias ficam definidos como um agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que indicam que o indivíduo continua usando a substância a despeito de problemas significativos.

Há uma combinação das categorias abuso de álcool e dependência de álcool em um contínuo de gravidade, conforme o número de critérios. Houve a exclusão do critério "uso leva a problemas legais" e inclusão do "craving" (alterações fisiológicas que podem predizer a recaída)¹⁴. O termo dependência é usado exclusivamente para a dependência farmacológica que pode ser uma resposta natural do organismo a uma substância¹². A desordem por uso de álcool (AUD) é uma doença comum da saúde mental em que indivíduos bebem quantidades excessivas de álcool apesar das consequências negativas. Muitos indivíduos com AUD se engajam em padrões pesados de consumo, definido como um beber compulsivo, sendo este definido como concentrações de álcool no sangue superior a 80 mg/dL. No entanto, muitos estudos em seres humanos têm documentado um beber extremo levando a beber álcool compulsivo (BACs) de cerca de 400 mg/dL¹⁵.

1.3 Transtornos Relacionados a Substâncias e Transtornos Aditivos

O transtorno por uso de álcool é definido por um agrupamento de sintomas comportamentais e físicos, os quais podem incluir abstinência, tolerância e fissura ou craving¹⁴. A abstinência de álcool se caracteriza por sintomas que se desenvolvem aproximadamente 4 a 12 horas após a redução do consumo. A característica fundamental é o desenvolvimento de uma alteração comportamental com concomitante fisiológico e cognitivos, devido à interrupção ou redução do uso intenso e prolongado da

substância.¹⁴ Como a abstinência de álcool pode ser desagradável e intensa, os indivíduos podem prosseguir no consumo apesar de consequências adversas, frequentemente para evitar ou aliviar os sintomas de abstinência.¹²

Assim, indivíduos com transtorno por uso de álcool podem dedicar grandes períodos de tempo para obter e consumir bebidas alcoólicas¹². A fissura por álcool é indicada por um desejo intenso de beber, o qual torna difícil pensar em outras coisas e frequentemente resulta no início do consumo. Um padrão problemático de uso de álcool, levando a comprometimento ou sofrimento clinicamente significativos, manifestado por pelo menos dois dos seguintes critérios, ocorrendo durante um período de 12 meses (Figuras 2-4).

O Transtorno por uso de álcool de acordo com o DSM 5

1. Álcool é frequentemente consumido em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido.
2. Existe um desejo persistente ou esforços malsucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso de álcool.
3. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção de álcool, na utilização de álcool ou na recuperação de seus efeitos.
4. Fissura ou um forte desejo ou necessidade de usar álcool.
5. Uso recorrente de álcool, resultando no fracasso em desempenhar papéis importantes no trabalho, na escola ou em casa.
6. Uso continuado de álcool, apesar de problemas sociais ou interpessoais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados por seus efeitos.
7. Importantes atividades sociais, profissionais ou recreacionais são abandonadas ou reduzidas em virtude do uso de álcool.
8. Uso recorrente de álcool em situações nas quais isso representa perigo para a integridade física.
9. O uso de álcool é mantido apesar da consciência de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pelo álcool.
10. Tolerância, definida por qualquer um dos seguintes aspectos: a. Necessidade de quantidades progressivamente maiores de álcool para alcançar a intoxicação ou o efeito desejado. b. Efeito acentuadamente menor com o uso continuado da mesma quantidade de álcool.
11. Abstinência, manifestada por qualquer um dos seguintes aspectos: a. Síndrome de abstinência característica de álcool (consultar os Critérios A e B do conjunto de critérios para abstinência de álcool, p. 499-500). b. Álcool (ou uma substância estreitamente relacionada, como benzodiazepínicos) é consumido para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.

Figura 2 – Transtorno por uso de álcool (AUD) de acordo com o DSM 5

Associação Americana de Psiquiatria (2013). Manual de diagnóstico e estatística dos transtornos mentais (5th ed.). Arlington VA: American Psychiatric Publishing15.

A gravidade do transtorno por uso de substância se baseia na quantidade de critérios diagnósticos preenchidos. Fatores de risco e prognóstico ambientais podem incluir atitudes culturais em relação ao consumo e à intoxicação, a disponibilidade de álcool (incluindo o preço), experiências pessoais adquiridas com álcool e níveis de estresse¹².

Critérios para TUS entre DSM-IV e DSM 5

DSM-IV		DSM 5
Critério de abuso	Critério de dependência	Transtorno por uso de substância
<ul style="list-style-type: none"> • Fracasso em cumprir obrigações • Abandono/redução de atividades • Risco à integridade física • Problemas legais 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso maior/mais tempo • Reduzir/controlar uso • Muito tempo gasto • Problemas sociais/interpessoais • Problemas físicos/psicológicos • Tolerância • Abstinência 	<ul style="list-style-type: none"> • Fracasso em cumprir obrigações • Abandono/redução de atividades • Risco à integridade física • Uso maior/mais tempo • Reduzir/controlar uso • Muito tempo gasto • Problemas

Figura 3 - Critérios para TUS entre DSM-IV e DSM 5

Adaptado de: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIH, 2013)

Figura 4 – Transtornos relacionados a substâncias e transtornos aditivos (TUS)

Fonte DSM-5 2013

Ao considerar os pacientes que podem ter problemas relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas, é útil distinguir os 3 tipos de consumo de álcool: consumo de álcool moderado e não problemático; consumo de álcool perigoso ou de risco (que expõe os pacientes ao risco de desenvolver problemas relacionados ao consumo de álcool); e consumo de álcool prejudicial (que provoca diretamente o aparecimento de problemas relacionados à ingestão de bebidas alcoólicas). Pacientes com problemas relacionados ao consumo de álcool em estágios mais avançados podem atender aos critérios de dependência ou vício em álcool¹.

O consumo moderado de bebidas alcoólicas é definido em termos de média do número de doses (exemplos de uma dose: uma taça de vinho, uma dose de 50 ml de destilado ou uma lata de cerveja) consumidos em 1 dia, que expõe um indivíduo adulto a um risco relativamente baixo de

desenvolvimento de problemas de saúde associados ao consumo de álcool. O consumo de risco ocorre quando o número de doses consumido em uma única ocasião excede uma determinada quantidade (4 doses por ocasião para os homens; 3 doses por ocasião para as mulheres).

O consumo de álcool prejudicial é definido como aquele que resulta em danos físicos ou psicológicos. Este distúrbio é definido segundo os critérios da International Classification of Diseases, 10ª revisão (CID-10). Os critérios específicos para diagnosticar o consumo abusivo de álcool foram desenvolvidos pela American Psychiatric Association (APA)⁸.

A tabela abaixo correlaciona os níveis de concentração de álcool no sangue (CAS) e os sintomas clínicos correspondentes (Tabela 1).

Tabela 1 -Efeitos da alcoolemia (CAS) no comportamento²

CAS (g/100ml)	Efeitos sobre o corpo
0,01-0,05	Aumento do ritmo cardíaco e respiratório Diminuição das funções de vários centros nervosos Comportamento incoerente ao executar tarefas Diminuição da capacidade de discernimento e perda da inibição Leve sensação de euforia, relaxamento e prazer.
0,06-0,10	Entorpecimento fisiológico de quase todos os sistemas Diminuição da atenção e da vigilância, reflexos mais lentos, dificuldade de coordenação e redução da força muscular. Redução da capacidade de tomar decisões racionais ou de discernimento Sensação crescente de ansiedade e depressão Diminuição da paciência
0,10-0,15	Reflexos consideravelmente mais lentos Problemas de equilíbrio e de movimento Alteração de algumas funções visuais Fala arrastada Vômito, sobretudo se esta alcoolemia for atingida rapidamente
0,16-0,29	Transtornos graves dos sentidos, inclusive consciência reduzida dos estímulos externos. Alterações graves da coordenação motora, com tendência a cambalear e a cair frequentemente.
0,30-0,39	Letargia profunda Perda da consciência Estado de sedação comparável ao de uma anestesia cirúrgica Morte (em muitos casos)
A partir de 0,40	Inconsciência Parada respiratória Morte, em geral provocada por insuficiência respiratória

1.4 Álcool e danos à saúde

O uso abusivo e indiscriminado de bebidas alcoólicas é responsável por mais de 60 agravos à saúde, como câncer de esôfago, estômago e de fígado, doenças cardiovasculares, cirrose hepática, pancreatite crônica e úlceras pépticas, além de traumas de todos os tipos, com uma estimativa que o abuso de bebidas alcoólicas reduz a expectativa de vida de um indivíduo em cinco anos.

Vários estudos epidemiológicos têm relatado a forte associação entre o nível de consumo de álcool e a incidência de câncer de boca, faringe, laringe, esôfago e fígado¹⁶. Os danos físicos relacionados ao álcool são consequências de suas propriedades tóxicas e que produzem dependência. Etanol (ou álcool etílico) em bebidas alcoólicas é produzido pela fermentação de açúcar pela levedura. É uma molécula pequena que é rapidamente absorvida no intestino, e é distribuída para todo o corpo. A maioria dos órgãos do corpo pode ser afetados pelos efeitos tóxicos do álcool¹⁷. A biodisponibilidade de etanol, a fração da dose ingerida, que atinge a circulação sistêmica, é de cerca de 80%. Por conseguinte, uma grande parte do etanol ingerido atinge a circulação e é distribuído para todos os tecidos do organismo¹⁶.

O consumo excessivo de álcool é direta ou indiretamente responsável por 75% das internações psiquiátricas e 50% das internações clínicas hospitalares³. É responsável por 3,2% da mortalidade mundial. No Brasil, um país emergente, o cenário é ainda pior³. O álcool tem sido associado à metade de todos os assaltos violentos, casos de abuso de crianças e outros incidentes de violência doméstica, bem como homicídios e assassinatos¹⁸. A

AUD pode ser dividida em três etapas: (1) compulsão/intoxicação, (2) preocupação/antecipação, (3) afastamento/afecção negativa¹⁹.

A fase de intoxicação refere-se ao desenvolvimento de uma síndrome reversível específica da substância que ocorreu devido a sua recente ingestão. As mudanças comportamentais ou psicológicas clinicamente significativas associadas a intoxicação (ex. beligerância, labilidade do humor, julgamento prejudicado) são atribuíveis aos efeitos fisiológicos da substância sobre o sistema nervoso central e se desenvolvem logo após o uso da substância.¹⁴ O aumento da sensibilidade aos efeitos intoxicantes, muitas vezes, impede o consumo, enquanto que uma maior sensibilidade aos efeitos gratificantes do álcool pode promover a ingestão²⁰. O uso prejudicial do álcool resulta em doenças, assim como um ônus social e econômico significativo em todo o mundo.²¹

De fato, o Relatório de Status Global da Organização Mundial da Saúde de 2014 estimou que houvesse 3,3 milhões de mortes (5,9% de todas as mortes globais) atribuíveis ao consumo de álcool em 2012, e a carga global das doenças e lesões causadas pelo uso de álcool foi de 5,1%. Historicamente, o estudo dos Transtornos do Uso de Álcool (AUDs) enfocou os adultos, com ênfase nas origens das AUDs como emergentes na adolescência. Começando na última parte do Século XX, numerosos estudos longitudinais com origem na infância e primeira infância começaram a fornecer evidência empírica de que a etiologia do comportamento anti-social,²² agressão e violência,²³ transtorno de conduta (Grupo de Pesquisa de Prevenção de Problemas de Conduta, 2013), transtorno de personalidade

limítrofe,²⁴ transtornos por uso de álcool²⁵ e os transtornos de apego podem estar fundamentados em dinâmicas organizacionais que aparecem pela primeira vez na infância e na primeira infância¹³.

Com relação as AUDs, a pesquisa das últimas décadas também concentraram a atenção nas origens do desenvolvimento que podem ser atribuídas ao período da primeira infância e infância, com início real do “beber”, começando durante os anos de transição da infância até a adolescência¹³. Longos períodos de consumo de etanol pesado levam à dependência, que é acompanhada por alterações e neuroadaptações no cérebro que podem perpetuar o consumo continuado, apesar de graves consequências pessoais⁷. Outros mediadores potenciais de como os problemas com álcool se desenvolvem em indivíduos com predisposição incluem consumo intenso da substância pelos pares, expectativas positivas exageradas dos efeitos do álcool e formas inadequadas de enfrentamento de estresse, genéticos e fisiológicos.

O transtorno por uso de álcool apresenta um padrão, sendo que 40 a 60% da variação no risco é explicada por influências genéticas¹³. Os problemas médicos relacionados com o álcool podem ser melhorados após uma boa compreensão da patogênese das lesões induzidas pelo álcool. Após seu consumo, o álcool é prontamente distribuído por todo o corpo na corrente sanguínea e atravessa membranas biológicas que afetam praticamente todos os órgãos e processos biológicos no corpo. A maior parte do álcool que entra no corpo é primeiramente oxidado a acetaldeído tóxico, que é catalisado pelo álcool desidrogenase citosólica (ADH)³.

Etanol é uma pequena molécula que interfere com numerosas e diversos alvos moleculares, incluindo receptores de neurotransmissores e canais de ions, e, assim, modula a atividade de circuitos neurais específicos para a produção de efeitos comportamentais agudos de etanol como desenibição, ataxia e sedação^{26,27}. Sistemas de neurotransmissores e neuropeptídeos adicionais são então recrutados durante a aquisição e manutenção do álcool e, finalmente, na transição para a dependência do etanol^{6, 27, 28}.

Apesar da variedade de paradigmas usados para estudar os efeitos transcricionais do etanol, uma conclusão recorrente dos estudos de microarrays é que o etanol afeta uma pequena proporção do transcriptoma (tipicamente ~ 2%)¹⁶. Fatores genéticos respondem por mais de 50% do risco de desenvolver alcoolismo, embora o alcoolismo seja um transtorno mental como outro qualquer, técnicas específicas devem ser utilizadas em sua abordagem. Muitos profissionais de saúde se sentem frustrados, acreditando serem incapazes de tratar destes pacientes. A identificação, avaliação e o planejamento de um tratamento, encaminhando para um profissional especializado, é fundamental para a prática clínica de excelência²⁹. É importante esclarecer que a prescrição exclusiva de um medicamento pode ajudar alguns indivíduos a parar de beber, mas, se acompanhada de técnicas simples para manejo dos pacientes, sua eficácia pode ser muito maior³⁰ (Figura 5).

Tabela 9. Farmacoterapia no transtorno por uso de álcool				
	Dissulfiram (Antietanol®, Sarcoton®)	Naltrexona (ReVia®, Uninaltrex®, Vivitrol®)	Topiramato (Topamax®, Amato®, Égide®, Toptil®, Arasid®)	Gabapentina (Neurontin®, Gabaneurin®, Gamibetal®)
Mecanismo de ação	Inibição aldeído desidrogenase	Antagonista dos receptores opioides	Ativação GABA / Inibição Glutamato / Diminui liberação dopamina no sistema mesocorticolímbico	Ativação GABA / inibição glutamato
Aprovação	FDA/ANVISA	FDA/ANVISA	NÃO	NÃO
Indicação	Manutenção da abstinência	Redução/controle do uso Manutenção da abstinência	Redução/controle do uso SAA Manutenção da abstinência Prevenção de recaída	Redução/controle do uso SAA Manutenção da abstinência Prevenção de recaída
Dosagem	250 mg/dia	50 mg /dia Uso dirigido: 50 mg em situações de risco de "binge"	Inicial: 25 mg/dia Manutenção: 100-300 mg/dia	400 - 2.400 mg/dia (divididos de 2 a 4 vezes ao dia)
Precauções	Necessita abstinência total de álcool antes de iniciar a medicação (12-24h)	Necessita de abstinência de 7-14 dias de opioides antes de iniciar a medicação	Observar lentificação cognitiva, parestesia e diplopia. Risco aumentado para cálculo renal	Observar sonolência

Figura 5 – Farmacoterapia na AUD

Adaptado Gigliotti e Copetti 2013³¹

1.5 Uso do álcool na adolescência

Embora o uso problemático de álcool geralmente comece durante a adolescência, as origens do desenvolvimento do transtorno podem ser rastreadas até a infância e a primeira infância. A identificação de fatores de risco precoces é essencial para entender o transtorno¹³. Na adolescência o consumo de álcool tem aumentado progressivamente.

Vários estudos relatam que 60 a 90% dos alunos no final do ensino médio já ingeriram algum tipo de bebida alcoólica 4-6, e da data da primeira ingestão entre 14 e 15 anos de idade¹⁷. Este fato torna esta questão ainda mais grave, uma vez que se verificou que cerca de 14% das pessoas que

iniciam o consumo quando eram mais jovens do que 14 anos de idade tornaram-se dependentes da droga, enquanto que apenas 2% dos indivíduos cuja primeira ingestão ocorreu quando eles eram mais velhos do que 19 anos de idade tornaram se viciados³¹.

O álcool é a droga recreativa mais utilizada e seu consumo está aumentando em jovens e adolescentes. Um padrão comum de consumo de álcool entre os adolescentes é a exposição intermitente de álcool, que pode levar eventualmente a episódios de ingesta pesado^{32,33}. Athina Markou e seus colegas descobriram mudanças persistentes no comportamento adulto após a exposição na adolescência ao etanol ou nicotina consistente com o aumento do risco de desenvolver dependência. O consumo de álcool na adolescência elevou as opções de alta recompensa, mesmo quando a probabilidade de recompensa e ou resultado eram improváveis (exemplo, ratos expostos ao etanol durante a adolescência mostraram aumento da tomada de decisão de risco na vida adulta^{32,34}).

O consumo excessivo de bebidas alcoólicas emergiu como um fenômeno típico em jovens. Este padrão de beber, repetidamente leva a níveis extremamente elevados de álcool no sangue e no cérebro e intoxicação, levando a graves riscos de neurodegeneração e danos cognitivos. Os mecanismos envolvidos na excitotoxicidade e na neuroinflamação são elementos fundamentais na neurotoxicidade induzida pelo álcool⁵. A exposição ao álcool também causa danos profundos tanto ao adulto quanto ao cérebro em desenvolvimento. O consumo excessivo de álcool induz numerosas respostas ao estresse fisiopatológico, uma das quais

é a resposta ao estresse do retículo endoplasmático (RE) que está diretamente ou indiretamente relacionado ao metabolismo do álcool, que incluem níveis tóxicos de acetaldeído e homocisteína, estresse oxidativo e modificações epigenéticas anormais²⁹.

O consumo de álcool começa tipicamente na adolescência, um tempo em que o cérebro ainda está em fase de maturação e, portanto vulnerável aos seus efeitos neurotóxicos. Uma série de diferenças na estrutura e função do cérebro associados ao consumo precoce de álcool foram identificados ³⁴. O consumo de álcool durante a adolescência é deletério para o cérebro em desenvolvimento e leva a déficits persistentes na vida adulta. Vários resultados fornecem fortes evidências de alterações associadas ao etanol na sinalização glutamatérgica e comprometimento da plasticidade sináptica no hipocampo³⁵. O consumo excessivo de álcool em populações menores de idade é uma das principais questões de saúde pública e questões sociais.

A adolescência é um período crucial para a maturação do cérebro, envolvendo a estabilização da formação de sinapses, integridade da massa cinzenta e projeções axonais. A exposição do adolescente ao álcool afeta a trajetória normal do cérebro em desenvolvimento. O início precoce do consumo de álcool e o consumo compulsivo de adolescentes levam a um aumento do risco de transtornos por uso de álcool e a diagnósticos psiquiátricos comórbidos na vida adulta³⁶. Os processos epigenéticos são os principais reguladores da ação do etanol no cérebro. A epigenética *define* uma ampla classe de mudanças que ocorrem no genoma sem alterar a

sequência de DNA subjacente. Essas alterações incluem modificações químicas covalentes nas caudas terminais de histonas, modificação química direta do DNA, regulação do conteúdo de RNA por RNAs não codificadores e mudanças locais e globais na transcrição ocorrendo em resposta a esses e outros fatores³⁷.

A exposição ao álcool intermitente adolescente (AIE) causa aumento duradouro de comportamentos de ansiedade e consumo de álcool e déficits na acetilação global de histonas H3K9 no hipocampo e amígdala, bem como déficits na neurogênese hipocampal, na vida adulta. O comportamento semelhante à ansiedade induzido pela AIE na idade adulta coincide com a diminuição da densidade da espinha dendrítica e a expressão do fator neurotrópico derivado do cérebro (*Bdnf*) no núcleo central da amígdala (CeA) e no núcleo medial da amígdala (MeA), que estão envolvidos nos estados afetivos negativos do alcoolismo³⁶.

Um histórico familiar (HF) de alcoolismo identificado como positivo, constitui importante fator de risco para o desenvolvimento de transtorno por uso de álcool. Uma série de diferenças neurobiológicas e comportamentais foram identificadas entre jovens que possuem uma história familiar positiva (HF+), como aumento da impulsividade.³⁴ Dificuldade na regulação das ações impulsivas durante a adolescência pode contribuir para a experimentação do álcool, bebedeiras e abuso do álcool na juventude³⁴.

O controle inibitório é destaque entre as habilidades cognitivas mais vulneráveis aos danos gerados pelo consumo do álcool, deixando os

adolescentes que bebem álcool em um maior risco para tomada de decisão imprudente e contínuo abuso de substâncias³⁴. O etilismo além de ser determinado geneticamente, também pode ser influenciado por fatores ambientais de forma precoce. O álcool durante o período pré-natal altera significativamente o crescimento e desenvolvimento normais do feto e tem como consequência alterações fisiológicas e comportamentais a longo prazo.

O consumo materno durante a gravidez aumenta o risco para desenvolvimento do feto. A constelação de anormalidades físicas e comportamentais que são causadas por exposição ao álcool pré-natal (PAE) estão classificadas dentro do termo transtorno do espectro do alcoolismo fetal (FASDs), que varia em gravidade da síndrome alcoólica fetal (FAS) para transtorno neurológico relacionado com o álcool (ARND) ou distúrbio neurocomportamental associado a exposição pré natal ao álcool (ND-PAE).

As características faciais distintas são fundamentais para o diagnóstico de FAS, a grande maioria dos indivíduos com PAE não são facialmente dismórfico, mas pode, no entanto, sofrerem de deficiências persistentes e generalizadas de comportamento, incluindo atenção, memória e déficits de funções executivas, hiperatividade e prejuízo na coordenação motora. Os indivíduos expostos no período pré-natal ao álcool, são mais susceptíveis ao desenvolvimento de distúrbios de comportamento e de humor relacionados à ansiedade, depressão e abuso de substâncias do uso e abuso de álcool³⁸.

A grande variedade de manifestações físicas e comportamentais de FASDs ocorre provavelmente em função da interação entre fatores genéticos, nutrição materna e a quantidade padrão de tempo e exposição ao álcool³⁸. E também para o aparecimento precoce de transtornos relacionados ao uso do álcool³¹.

1.6 Aspecto neurobiológico da dependência do álcool

Todas as drogas, desde a nicotina até a heroína, agem no circuito da recompensa cerebral, que envolve a área tegmentar ventral, o núcleo accumbens e o córtex pré-frontal (Figura 6). Estas substâncias agem inibindo ou ativando mecanismos que liberam dopamina no núcleo accumbens (levando a uma sensação de prazer) e desconectando o córtex pré-frontal, que é responsável pelo controle decisório.

O álcool é considerado uma droga por atuar em vários sistemas, como o excitatório (glutamato), inibitório (GABA), no prazer e analgesia (opioide) e também no sistema de neurotransmissão relacionado com o controle de impulsos e humor (serotonina). A ativação e inibição desses sistemas promove o relaxamento e bem estar³⁰. O consumo crônico e excessivo de álcool resulta em modificações significativas de sistemas neuronais seletivos da estrutura do cérebro, em sua fisiologia e funções³⁹. Havendo vários efeitos negativos sobre o cérebro, contribuindo para a neurodegeneração, disfunção neuronal e várias outras patologias¹⁵.

O alcoolismo e abuso do álcool são caracterizados por causar um estado emocional positivo e negativo. O interruptor entre o estado emocional

positivo (procura do fármaco para seus efeitos de recompensa) e reforço negativo (busca pela droga, a fim de remover o estado emocional negativo, associado com a retirada) é um aspecto importante do ciclo de dependência do álcool. Os estados afetivos negativos (ansiedade, estresse e disforia) que conduz o reforço negativo da dependência, juntamente com a manifestação da retirada da droga, são referidos como o “lado negro do vício”.

O lado escuro do vício representa uma disfunção de recompensa do cérebro e sistemas de emoções. Em particular, a amígdala estendida (consistindo no núcleo central da amígdala [CeA], leito do núcleo terminal estriado [NLET], e a zona de transição do núcleo accumbens [NAc], é responsável por integrar sinais de estresse no cérebro com o processamento de recompensa através da dinâmica molecular de regulação, levando a mudanças na plasticidade sináptica e arborização dendríticas. Vários substratos moleculares e celulares em regiões importantes do cérebro desempenham um papel crucial no desenvolvimento e manutenção do abuso de drogas e comportamentos de dependência⁴⁰.

Figura 6 - Circuitos de Recompensa e Sistemas de Neurotransmissores

Fonte modificado de: Neurociência em benefício da educação - 2013

A exposição crônica de álcool pode causar degeneração neuronal no sistema nervoso periférico e central, resultando em pequenas fibras dolorosas e neuropatia periférica⁴¹. As marcas da dor neuropática são alodinia (respostas da dor a estímulos normalmente inócuos) e hiperalgesia (respostas elevadas a estímulos nocivos). A automedicação com o álcool para alívio da dor não é incomum e está associado a dependência⁴¹. A combinação do desejo de consumir o álcool, aumento da dor e ansiedade durante períodos de abstinência é conhecido como síndrome da abstinência alcoólica e é um fator negativo que contribui para recaída.

A síndrome de abstinência é o quadro que pode ser observado quando há redução ou interrupção do uso do álcool em pacientes dependentes. Após seis horas da diminuição ou da interrupção começam a aparecer os

primeiros sinais e sintomas.^{30, 42} Podemos, a partir disso, classificar o comprometimento do usuário crônico de álcool em dois níveis: leve/moderado e grave. É possível avaliar a gravidade da SAA através de um instrumento prático e de fácil aplicação com 10 itens (CIWA-AR) em que o escore final classifica a gravidade em leve, moderado e grave. A classificação tem como objetivo auxiliar no planejamento terapêutico e na conduta a ser tomada^{30,44}.

Atualmente, os tratamentos com drogas para AUD raramente combatem as complexidades da síndrome de abstinência⁴³. Os mecanismos subjacentes aos sintomas de abstinência especialmente alodinia ainda não são bem compreendidos, o que limita o desenvolvimento de novos tratamentos e possam inibir vários componentes da síndrome de abstinência do álcool⁴³. Evidências recentes têm implicado tanto os mecanismos genéticos e epigenéticos, no controle da plasticidade sináptica, no particular no que se refere ao consumo de álcool e a dependência⁴⁰. As pesquisas sugerem que o excesso de álcool altera o cérebro para promover o consumo¹⁵.

Essas mudanças neuropáticas são pensadas para ser um dos mecanismos subjacentes que levam a transtornos do uso do álcool (AUD)¹⁰. Um desses sistemas alterados pelo abuso do álcool que emergiu recentemente como uma área de interesse é o sistema neuroimune. Estudo de cérebros de pessoas com histórico de abuso de álcool, mostraram aumento da ativação microglial e citocinas pró inflamatórias, como IL-1 β . Em particular a IL-1 β mostrou ser regulada positivamente no SNC após vários

modelos de AUD. No entanto, as contribuições de respostas neuroimunes para a modulação do consumo de etanol foram relativamente ignoradas, especialmente na transição entre abuso do álcool e dependência do álcool¹⁰. O vício é uma desordem psiquiátrica caracterizada por prejuízo na função executiva, perda de interesse em outros alvos do prazer e comportamento compulsivo por busca de drogas.

O neurotransmissor envolvido na regulação da suscetibilidade ao abuso de drogas é a dopamina. A dopamina cortical pré-frontal modula funções executivas, tais como atenção, memória de trabalho, e o risco/recompensa de tomada de decisão, que são prejudicados no alcoolismo³⁹. A dopamina sinaliza para o sistema de recompensa, para formação da memória, função executiva e motivação²⁹. O etanol é um fator de risco importante para a ocorrência de vários distúrbios cerebrais que dependem da quantidade, período e frequência de seu consumo⁴⁵. O abuso de etanol leva a neuroadaptações dramáticas no cérebro, que contribuem para tolerância, dependência e alterações comportamentais⁴¹. A exposição crônica ao álcool reduz a atividade endocanabinóide e interrompe a neurogênese em roedores adultos, o que resulta em alterações estruturais e funcionais⁴⁶.

O alcoolismo pode emergir como uma estratégia de enfrentamento adaptativo em indivíduos estressados, destacando a importância dos sistemas biológicos do estresse em manter o vício⁴⁵. A exposição crônica ao álcool induz mudanças nos circuitos neurais que controlam os processos motivacionais, incluindo excitação, recompensa e estresse. Estas alterações

afetam sistemas que utilizam as moléculas de sinalização de dopamina, peptídeos opióides, ácido gama aminobutírico (GABA), glutamato e serotonina, bem como sistemas que modulam a resposta ao estresse do cérebro⁶.

Estas neuroadaptações produzem alterações na sensibilidade aos efeitos do álcool após exposição repetida (sensibilização e tolerância) e um estado de abstinência após a interrupção do consumo de álcool⁶. O uso crônico de etanol, muitas vezes leva ao desenvolvimento de síndromes neurodegenerativas, que causam prejuízos morfológicos e funcionais⁴⁵.

Segundo Lezak, as funções executivas incluem a capacidade de iniciar ações, planejar e prever meios de resolver problemas, antecipar consequências e mudar as estratégias de modo flexível, monitorando o comportamento passo a passo e comparando os resultados parciais com o plano original²⁴. Parsons delineou os principais déficits cognitivos encontrados nos dependentes do álcool. As alterações mais comuns são aquelas relacionadas com os problemas de memória, aprendizagem, abstração, resolução de problemas, análise e síntese viso-espacial, velocidade psicomotora, velocidade do processamento de informações e eficiência cognitiva.

São ainda encontrados déficits nas funções executivas (inibição do comportamento) e na memória de trabalho, que se refere a um sistema envolvendo a memória de curto prazo, responsável pela manutenção e manipulação de informações na mente para a realização de tarefas cognitivas complexas³. Estresse responsivo em populações neuronais

liberaram moduladores de peptídeos para facilitar uma resposta apropriada aos desafios ambientais, mas a desregulação desses circuitos podem ter consequências profundas no comportamento.

Após ciclos repetidos de intoxicação por álcool e retirada, sistemas neurais sensíveis ao estresse podem perpetuar o ciclo de dependência através de adaptações persistentes, conhecida como mudanças alostática⁴⁵. A exposição crônica ao álcool induz mudanças nos circuitos neurais que controlam os processos motivacionais, incluindo excitação, recompensa e estresse.

Estas neuroadaptações produzem alterações na sensibilidade aos efeitos do álcool após exposição repetida (sensibilização e tolerância) e um estado de abstinência após a interrupção do consumo de álcool⁶. O uso crônico de etanol, muitas vezes leva ao desenvolvimento de síndromes neurodegenerativas, que causam prejuízos morfológicos e funcionais⁴⁵.

Uma região ligada ao circuito da dependência é o estriatum dorsal (caudado putâmen), uma estrutura cerebral chave para o hábito de estímulo resposta aprendizagem. Quando a dependência de drogas progride de uso recreativo ocasional para uso impulsivo, para uso compulsivo habitual, ele se correlaciona com uma progressão de um comportamento impulsionado por recompensas para o hábito de buscar drogas²⁹.

O álcool interage com vários sistemas de neurotransmissores em circuitos de recompensa e estresse do cérebro. Essas interações produzem efeitos de reforço agudo do álcool. Após a exposição crônica, essas interações resultam em mudanças na função neuronal que estão

subjacentes ao desenvolvimento de sensibilização, tolerância, retirada e dependência⁶. Tem sido demonstrado que o etanol influencia a liberação dos principais neurotransmissores presentes no SNC: dopamina, serotonina (5-HT), noradrenalina e peptídeos opióides³. Álcool e outras drogas de abuso induzem alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) que podem levar a comportamentos patológicos relacionados ao vício⁴¹. A preferência por escolha de risco correlacionou-se com a perda de neurônios colinérgicos no cérebro anterior basal⁶.

1.7 Plasticidade sináptica e álcool

A dependência de drogas e de álcool é muitas vezes caracterizada como uma disfunção dos circuitos de aprendizagem e memória normais dentro do cérebro^{47,48,49}. Estes processos complexos são regulados pela formação rápida e reformação de estruturas sinápticas em regiões particulares do cérebro que ocorrem em simultâneo com as alterações na sinalização das sinapses, conhecidos coletivamente como plasticidade sináptica⁵⁰.

Uma única transmissão sináptica em uma sinapse em particular, aumenta a eficácia de sinalização subsequente nessa mesma sinapse em um processo conhecido como potenciação de longo termo (LPT)⁵¹. Por outro lado o arrefecimento da futura transmissão sináptica é chamado de depressão de longo prazo (LTD)⁵². Além de LPT e LTD, alterações nestas estruturas de sinapses desempenham um papel na patogênese da

dependência através da ação de vários sistemas diferentes de neurotransmissores, em particular o sistema mesolímbico da dopamina^{53,54}.

Os sistemas Glutamatérgicos e GABAérgicos também estão implicados na remodelação sináptica e são afetados pela exposição ao abuso de álcool e drogas^{40, 54,55}. A modulação da sinalização e eventos em uma única sinapse são acompanhados pela reorganização estrutural das espinhas dendríticas neuronais⁵⁶, algumas vezes referida como metaplasticidade⁵³. O álcool exerce efeitos sobre a morfologia das espinhas dendríticas. Em particular, a administração aguda de álcool está associada a um aumento das espinhas dendríticas no núcleo central da amígdala (CeA) e no núcleo medial da amígdala (MeA) de ratos⁵⁷.

Esses efeitos estruturais coincidem com a ansiólise induzida pelo álcool e um aumento na expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e núcleo arqueado do hipotálamo (Arc), produtos gênicos conhecidos por desempenharem um papel na plasticidade sináptica⁵⁷. Curiosamente, a retirada da exposição crônica ao álcool diminui as espinhas dendríticas e a expressão de Arc e BDNF no CeA e MeA^{58,59}. Retirada da exposição crônica ao álcool também diminui a arborização dendrítica no hipocampo e na NAc^{60,61}. A exposição aguda ao álcool provoca a ansiólise e aumento das espinhas dendríticas na amígdala, enquanto a exposição continuada normaliza a arborização dendrítica e atenua o comportamento ansiolítico.

No entanto, a retirada do consumo crônico ou compulsivo de etanol e, especialmente, a retirada repetida, causa uma diminuição acentuada no número de espinhas dendríticas na amígdala e em outras regiões cerebrais importantes, acompanhadas por um aumento dos comportamentos parecidos com a ansiedade⁴³. Sabe-se que o receptor glutamatérgico de N-metil-D-aspartato (NMDA) desempenha um papel essencial tanto na plasticidade sináptica dependente de atividade a curto como a longo prazo^{62,63}. Esses receptores atuam como moduladores da transmissão de impulsos excitatórios para o terminal nervoso pós sináptico.

Curiosamente, a exposição aguda ao álcool inibe potencialmente as correntes mediadas por NMDA, resultando em menor despolarização nos neurônios pós-sinápticos^{64,65}. A exposição crônica ao etanol, por outro lado, aumenta a sensibilidade dos receptores NMDA ao glutamato, potencializando a despolarização neuronal e subsequente ativação^{65,66}. O sistema glutamatérgico e os receptores NMDA são pelo menos parcialmente responsáveis pelo comportamento semelhante à ansiedade observado durante a abstinência alcoólica⁴⁰.

1.8 Neuroadaptação

O etanol é um fator de risco importante para a ocorrência de vários distúrbios cerebrais que dependem da quantidade, período e frequência de seu consumo⁶⁷. O abuso de etanol leva a neuroadaptações dramáticas no cérebro, que contribuem para tolerância, dependência e alterações

comportamentais⁶⁸. Alcoolismo pode emergir como uma estratégia de enfrentamento adaptativo em indivíduos estressados, destacando a importância dos sistemas biológicos do estresse em manter o vício. Estresse responsivo em populações neuronais liberaram moduladores de peptídeos para facilitar uma resposta apropriada aos desafios ambientais, mas a desregulação desses circuitos podem ter consequências profundas no comportamento.

O uso crônico de etanol, pode levar ao desenvolvimento de síndromes neurodegenerativas, que causam prejuízos morfológicos e funcionais⁶⁷. A neurodegeneração induzida pelo álcool e déficits cognitivos ocorrem devido à morte celular neuronal e a perda de neurogênese em intoxicação aguda e crônica de álcool⁴⁶. Consequentemente, os indivíduos com dependência de álcool apresentam perda significativa de volume em estruturas cerebrais corticais e subcorticais⁴⁶.

A adicção envolve vários circuitos cerebrais que interagem e mudam durante o curso do uso das drogas⁶. A recompensa do álcool parece ser principalmente mediada pela resposta à dopamina induzida pelo álcool na NAc. O álcool aumenta o disparo de dopamina na área tegmental ventral (VTA), que se projecta para a NAc, e isso está associado à percepção da recompensa do álcool⁶⁹. As mudanças no valor de reforço do álcool durante a transição do uso e abuso de álcool para a dependência refletem mudanças neurológicas adaptativas decorrentes da exposição crônica a altas doses de álcool. Durante os estágios iniciais do consumo de álcool não dependente, o comportamento de beber é motivado, em grande parte, pelos efeitos de

reforço positivo do álcool, enquanto que no estado dependente provavelmente é impulsionado pelos efeitos de reforço positivo e negativo da droga³⁴.

Múltiplos processos contribuem para o aumento da motivação para buscar drogas durante o desenvolvimento da dependência. Sensibilização refere-se a um aumento no valor de reforço das drogas após exposições repetidas. Tolerância refere-se a uma diminuição na eficácia de reforço de fármacos após exposições repetidas. Uma vez que a neuroadaptação ocorreu, a remoção do álcool do organismo leva a uma síndrome de abstinência³⁴. A recompensa do álcool parece ser principalmente mediada pela resposta à dopamina induzida pelo álcool no NAc. O álcool aumenta o disparo da VTA, que se projeta para o NAc, e isso está associado à percepção da recompensa do álcool⁶⁹ (Figura 7).

Figura 7 – Reforço positivo e negativo ligado ao uso de álcool

FONTE: Modificado de Nature Neuroscience (Nestler 2005)

Alterações na atividade do circuito de recompensa mediado por efeitos de reforço positivo agudo do álcool e o circuito de estresse mediando o reforço negativo da dependência durante a transição do consumo de álcool de não dependente para consumo dependente. Os elementos-chave do circuito de recompensa são a dopamina (DA) e os neurônios peptídicos opióides que atuam tanto na VTA como no núcleo accumbens e que são ativados durante o consumo inicial de álcool e os estágios iniciais da progressão para a dependência.

Elementos-chave do circuito de estresse são neurônios liberadores de corticotropina (CRF) e norepinefrina (NE) que convergem em interneurônios de ácido γ -aminobutírico (GABA) no núcleo central da amígdala e que são

ativados durante o desenvolvimento da dependência^{30,33}, bem como os mecanismos de transdução do receptor, tais como a adenilato-ciclase, proteína quinase A, CREB, e delta FosB. A ativação dos sistemas de stress do cérebro, notavelmente do hormônio libertador de corticotropina (CRH), mas também a noradrenalina, a dinorfina, e o sistema de neuropeptídeo Y anti-estresse na amígdala expandida, são considerados os mecanismos de anti-retorno associados com a desregulação emocional observada em vício³⁰.

1.9 Sistemas dopaminérgico

A dopamina é um neurotransmissor envolvido principalmente em um circuito chamado sistema mesolímbico, que projeta da área tegmental ventral (ATV) do cérebro ao núcleo accumbens (Figura 8). Esse circuito influencia a forma como os organismos se orientam para mudanças de incentivo no ambiente⁷⁰. A dopamina tem também um papel na motivação e incentivo associada a intoxicação alcoólica aguda.

A ingestão de álcool e até mesmo a expectativa de que o álcool estará disponível produz liberação de dopamina no núcleo accumbens como determinado pelo aumento dos níveis de dopamina no líquido fora dos neurônios³⁴. No entanto, as lesões do sistema da dopamina mesolímbica não eliminam completamente o comportamento reforçado com álcool, indicando que a dopamina é um componente importante, mas não essencial,

do reforço do álcool. A retirada do álcool diminui a função da dopamina em indivíduos dependentes, contribuindo para sintomas de abstinência e recaída de álcool⁷¹. O consumo de álcool pode suprimir sentimentos de disforia e ansiedade, o que pode aumentar ainda mais o consumo de álcool. A amígdala parece regular os efeitos negativos relacionados à abstinência de álcool⁴⁷. O glutamato excessivo no CPF e estriado também tem sido associado a sintomas de abstinência⁶.

Figura 8 – Vias dopaminérgicas
Fonte modificado: Antônio Carlos Schwiderski

1.10 Neuropeptídeos

Os neuropeptídeos coexistem com neurotransmissores clássicos, exercendo função de modulação sobre eles⁷². Neuropeptídeos exercem sua ação através da ligação a específicos receptores acoplados à proteína³². Genericamente, a ação dos neuropeptídeos é mais sutil, porém mais duradoura, além de estes interagirem com células e mediadores alérgicos e inflamatórios, tendo, portanto, uma função mais complexa quando comparados aos neurotransmissores clássicos³¹.

Os neuropeptídeos são encontrados e distribuídos de forma heterogênea por todo o cérebro e podem ser expressos nos corpos celulares, dendritos e axônios terminais³². Muitos neuropeptídeos e hormônios peptídicos são muito semelhantes aos peptídeos antimicrobianos em sua composição aminoácido, design anfipática, carga e tamanho catiônica. Suas atividades antimicrobianas sugerem que eles também podem estar diretamente envolvidos na defesa inata⁴⁵.

Os neuropeptídeos regulam uma grande variedade de processos fisiológicos em animais³¹. Holmgren e Jensen (2001), na tentativa de dar um significado mais restrito à palavra, definem os NPs como sendo peptídeos que podem ser liberados por um neurônio como moléculas sinalizadoras, que apresentarão efeitos como neurotransmissores ou moduladores em outras células excitáveis e algumas vezes na própria célula que o libera. Existem várias diferenças entre os NPs e os transmissores clássicos no sistema nervoso em relação à síntese, armazenamento e sinalização⁴⁵.

1.11 Orexina

Orexina, também conhecida como hipocretina, está firmemente estabelecida como reguladora da busca de recompensas (Figura 9). Orexina-A e -B (hipocretina-1 e -2) são peptídeos produzidos em neurônios residentes no hipotálamo lateral e dorsomedial e na área periférica. Os neurônios contendo orexina projetam-se a partir do hipotálamo lateral (HL) para muitas áreas da "via de recompensa" mesolímbica, incluindo a área tegmentar ventral (VTA) e o núcleo accumbens (NAc). As fibras de orexina codistribuem com as fibras de dopamina no córtex pré-frontal mediano (CPFm) e na concha mediana do NAc sugerindo que a orexina e a dopamina podem interagir em vários níveis no sistema de recompensa. A inervação de Orexina está presente em toda a VTA⁷³. Orexina é sintetizada exclusivamente em neurônios localizados no hipotálamo lateral (HL), periférico (PEF), e dorsal medial (HMD)^{72,73,74,75}.

Estes neurônios projetam-se extensamente através dos neurônios com papéis reguladores em uma larga escala de respostas comportamentais e fisiológicas incluindo a regulação neuroendócrina do ciclo do sono-vigília, ansiedade, comportamento de alimentação, e a procura da recompensa⁷⁶. A função de muitos neuropeptídeos, incluindo a orexina, é a modulação da sinalização de neurotransmissores de aminoácidos rápidos.

A liberação de neuropeptídeos não se limita a especializações sinápticas. A baixa incidência sináptica no VTA provavelmente não é

relevante para a capacidade da orexina para modular a atividade dos neurônios dopaminérgicos e GABAérgicos VTA⁷². Drogas de abuso podem agir localmente no HL e em terminais de orexina na VTA. Na VTA a orexina pode afetar a liberação de glutamato dopaminérgicos, bem como estimulá-los diretamente via receptores OX 1 pós-sináptica.

Figura 9 – Via da Orexina

Fonte modificado de: May 2015 por Kliver Isidro

Evidências recentes sugerem um papel dicotômico dos receptores OX 1 e OX 2 no cérebro. Os receptores OX 1 são importantes para os efeitos neurobiológicos que impulsionam a procura de drogas, a cocaína, a nicotina e álcool. Em contraste, os receptores OX 2 foram implicados mais fortemente na regulação do ciclo sono/vigília e excitação⁷³.

1.12 Neurotensina

A neurotensina tem potencial para reduzir o consumo de linha de base através do aumento da sensibilidade aos efeitos intoxicantes do álcool e possivelmente reduzindo a recompensa de álcool. Inicialmente, os circuitos ventrais e o córtex pré-frontal (CPF) desempenham um papel mais importante, nos estágios posteriores do AUD o striatum dorsal é recrutado.

O estriado dorsal pode ser dividido em dorsomedial (DMS, caudado) e dorsolateral (DLS, putamen) striatum. O DMS tem sido associado a um comportamento dirigido a metas, enquanto o DLS tem sido associado ao comportamento habitual. Durante o desenvolvimento de AUD pode haver uma mudança de controle do DMS para DLS quando o beber torna-se mais compulsivo. Alguns péptidos do cérebro-intestino ou seus receptores são encontrados no estriado dorsal, mas se eles influenciam comportamentos viciantes através da alteração da função estriatal dorsal é uma área que precisa ser explorada.

Regulação do consumo de álcool por neurotensina (A). A neurotensina (NT) tem efeitos adversos pré-sinápticos e pós-sinápticos na

sinalização dopaminérgica no núcleo accumbens (NAc)²⁴. Presinápticamente, NT pode aumentar a libertação de dopamina (DA) através do receptor de neurotensina tipo 1 (NTS1) - ou possivelmente mesmo inibição mediada por receptor de neurotensina tipo 2 (NTS2) de receptores D2 de dopamina (D2R) na zona tegmental ventral (VTA) dopaminérgica (DAergic). Postsynaptically, NTS1 ou mesmo NTS2 dimerizes com D2R e atenua D2R que sinaliza.

Estudos funcionais sugerem que o efeito do NT sobre a inibição da sinalização pós-sináptica D2R pode predominar no núcleo accumbens (NAc). (B) O álcool aumenta a libertação de dopamina na NAc²⁴. O álcool pode excitar neurónios dopaminérgicos de VTA inibindo os interneurónios GABAérgicos na VTA, o que resulta na redução da activação dos receptores GABA (GABAR) nos neurónios dopaminérgicos VTA. O aumento da dopamina mediada por VTA na NAc pode promover o consumo de álcool e mediar a recompensa do álcool.

Os agonistas do receptor NT podem reduzir o consumo de álcool atuando sobre os receptores NT pós-sinápticos que podem inibir a sinalização de dopamina mediada por álcool na NAc²⁴. Evidências recentes sugerem um papel dicotômico dos receptores OX 1 e OX 2 no cérebro. Os receptores OX 1 são importantes para os efeitos neurobiológicos que impulsionam a procura de drogas pela morfina, a cocaína, a nicotina e álcool. Em contraste, os receptores OX 2 foram implicados mais fortemente na regulação do ciclo sono/vigília e excitação^{69,73,74,77,78}.

Existe extensa literatura demonstrando que a ativação de neurônios contendo orexina e receptores de orexina modula o consumo de álcool e a recidiva induzida por ele. Embora o seu mecanismo de ação permaneça pouco claro, estes receptores podem ser alvos promissores para o tratamento de desordem do uso de álcool⁶⁹. Um estudo recente mostrou que a orexina-A injetada no LH ou núcleo paraventricular (mas não NAc) induziu seletivamente a ingestão de etanol⁷⁷.

Existe evidência consistente para sugerir que a AD pode regular o sono via neurônios orexínicos⁷⁴. O sistema hipocretina/orexinérgico desempenha um papel importante em vários processos neurobiológicos envolvidos na manutenção de mecanismos homeostáticos no corpo⁷⁸. Deficiências nos genes que codificam a orexina ou o receptor OX-R2 resultam em narcolepsia⁷⁹. Para compreender o papel dos neurônios OX no controle da ingestão de etanol, é importante examinar o impacto que o próprio etanol tem sobre a expressão e produção deste peptídeo na PFLH, onde os neurônios OX se originam.

Considerando que pouco se sabe sobre a relação do etanol com o OX endógeno, estudos recentes de outros peptídeos orexigênicos no hipotálamo mostraram que o etanol tem um forte efeito estimulador sobre sua expressão^{67,72,75}.

1.13 Substância P

SP é um undecapéptido do SNC e do SNP e pertence a uma família de neuropeptídeos quimicamente referidos como as taquiquininas (TKs). A SP participa na neurotransmissão como um neuromodulador na monoamina, acetilcolina e sistemas de GABA e nos terminais nervosos. O sistema SP-NK1 está localizado nas regiões da amígdala estendida e sua atividade na via taquicinérgica está relacionada a condições psiquiátricas como depressão e de ansiedade. Heilig e seus colegas demonstraram que a administração de um LY686017, um antagonista do receptor NK1, suprimiu o desejo da ingesta de álcool e liberou o cortisol, dando mais suporte à ligação entre Sistemas de estresse neuronal e dependência de álcool⁷¹. A eliminação seletiva dos neurónios NK1R com a neurotoxina SP-saporina mostra que eles desempenham um papel chave na nocicepção inflamatória e neuropática, como foi previamente indicado pelo efeito dos antagonistas de NK1R.⁸⁰

A libertação de SP e a ativação do receptor NK1 esultante contribuem para a dor persistente⁸⁰. Regulação do consumo de álcool por substância P. (A): Os níveis aumentados de substância P (SP) liberados pelos neurônios ou por microinjeção de SP na área tegmental ventral (VTA) interagem com o receptor de neuroquinina 1 (NK1R) em neurônios dopaminérgicos (DAérgicos) VTA. Resultando em aumento da liberação de dopamina (DA) para áreas como o núcleo accumbens (NAc). O aumento da liberação de

dopamina na NAc, como resultado do aumento da SP na VTA, seria esperado para aumentar o consumo de álcool uma vez que o álcool é conhecido por desinibir VTA dopaminérgica neurônios. Acredita-se que o álcool inibe os interneurônios GABAérgicos na VTA, o que resulta na redução da ativação dos receptores GABA (GABAR) nos neurônios dopaminérgicos VTA. (B) NK1R também é encontrado no pálido ventral (PV) e na amígdala (AMG). SP pode aumentar a administração de substâncias gratificantes como o álcool, aumentando a excitabilidade dos neurônios no PV e AMG²⁴.

1.14 Hormônio estimulante de alfa melanócitos (α MSH)

Recentemente, moléculas relacionadas ao estresse, como as envolvidas na sinalização da melanocortina, surgiram como um novo alvo dos efeitos do álcool no cérebro. As melanocortinas são derivadas de um mRNA de pró-hormônio, pró-opiomelanocortina (*Pomc*), que é processado para produzir produtos proteicos maduros, incluindo o hormônio estimulante alfa-melanócito (α -MSH), juntamente com β -MSH, γ -MSH e hormônio adrenocorticotrófico. O α -MSH exerce seus efeitos ligando-se e ativando os receptores de melanocortina, como o receptor da melanocortina 3 (MC3R) e o MC4R. Esses receptores são receptores acoplados à proteína G que apresentam ampla distribuição nas principais áreas do cérebro, incluindo a amígdala e o hipotálamo. O α -MSH induz comportamento ansiogênico em roedores, e o comportamento semelhante à ansiedade induzido por

abstinência de álcool é atenuado pela administração central de um antagonista específico de MC4R em ratos adultos.

A retirada do álcool aumenta a imunorreatividade do α -MSH em neurocircuitos específicos, incluindo o núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo central da amígdala (CeA). Esses circuitos cerebrais estão implicados em processos aditivos. O sistema de melanocortina cerebral, incluindo o hipotálamo lateral e a área tegmentar ventral, demonstrou estar envolvido na regulação do consumo de etanol. Por outro lado, o neuropeptídeo Y (NPY) é uma molécula anti-estresse, e vários estudos sugerem que níveis mais baixos de NPY na amígdala estão associados a comportamentos ansiosos durante a abstinência após a exposição crônica ao etanol e promovem a ingestão de álcool em ratos adultos. De fato, α -MSH e NPY interagem de formas opostas na amígdala para regular comportamentos relacionados ao álcool³⁶. Hormônio alfa-melanócito estimulante, ou α -MSH.

Esta sequência tridecapeptídica da família da melanocortina é produzida por muitos tipos de células diferentes e é conhecida por ter potentes propriedades antiinflamatórias. A α -MSH exerce a sua atividade através de um grupo de receptores de melanocortina (MC-R) pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G. Além do sistema nervoso central e melanócitos, MC-R foram detectados recentemente em adipócitos, queratinócitos, imunocompetentes, bem como células inflamatórias, fibroblastos e, principalmente, as células endoteliais. Dada a ação antiinflamatória da α -MSH solúvel in vitro e que foi demonstrado que a α -

MSH permaneceu ativa na redução da resposta inflamatória dos neurônios.⁸¹

1.15 Ocitocina

OXT é um neuropeptídeo muito antigo, conservado em muitas espécies que variam dos invertebrados aos mamíferos. Sendo um importante modulador de processos sociais e emocionais em muitas espécies. Durante a última década, uma grande quantidade de literatura revelou seus efeitos sobre diferentes aspectos do comportamento social, incluindo estresse social e ansiedade, memória social, afiliação e vínculo, reconhecimento de emoção, mentalização, empatia e confiança interpessoal.

Além disso, como as deficiências nestes domínios sociais podem ser observadas em uma série de distúrbios neuropsiquiátricos, como autismo, transtorno de ansiedade social, depressão, esquizofrenia e transtorno de personalidade borderline, o papel da OXT em transtornos mentais e seu tratamento tem sido intensamente estudado. A OXT atua como um neuropeptídeo, estes se projetam do hipotálamo para um grande número de regiões cerebrais relacionadas ao processamento social e emocional, regiões cerebrais com locais de ligação a OXT. Em mamíferos, a OXT, juntamente com a sua irmã neuropeptídica arginina vasopressina (AVP), é sintetizada em neurônios magnocelulares localizados nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo.

A partir daí, através do processamento axonal, o OXT é transportado para a hipófise posterior, onde é armazenado em vesículas secretoras para liberação no sistema vascular portal para exercer seus efeitos periféricos nos órgãos-alvo, nas glândulas uterina e mamária, através da circulação sanguínea geral, incluindo a amígdala, o hipocampo e o córtex cingulado anterior (CAC)⁴, altamente consistente com o papel sugerido de OXT no processamento social e emocional^{82,83}. O sistema central de oxitocina emergiu como um alvo terapêutico potencialmente importante para a toxicodependência do álcool.⁸⁴

Estudos suportam a hipótese de que a ocitocina reduz o consumo de etanol. A oxitocina (0, 0,3, 1, 3 ou 10 mg/kg) reduziu o consumo de etanol (redução máxima de 45%), dependente da dose, no modelo de consumo excessivo⁸⁴. Pesquisas indicam a Oxitocina (OTX) como um potencial tratamento para o álcool e outras desordens de uso de substância. OTX é um neuropeptídeo que modula os processos adaptativos associados à dependência, incluindo recompensa, tolerância, aprendizagem associativa, memória e respostas ao estresse^{84,85}. O OTX exerce seus efeitos através de interações com o eixo hipotálamo-hipófiseadrenal e sistemas de neurotransmissores múltiplos, incluindo a recompensa mesolímbica da dopamina e os sistemas de estresse do fator de liberação de corticotrofina.

Os efeitos do OTX sobre os sistemas de estresse são de grande interesse, dada a forte ligação entre estresse, uso de drogas e recidiva, e a desregulação conhecida da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal associada a distúrbios por uso de substâncias. Ao mesmo tempo, o sistema

OTX é alterado pela exposição aguda ou crônica ao fármaco^{70,86}. A atividade dos neurônios dopaminérgicos nas vias mesolímbicas determina o valor de recompensa de reforçadores naturais e relacionados à substância, tais como atividade sexual, ligação de pares e consumo de alimentos de alto teor calórico e drogas de abuso como o etanol. O neuropeptídeo ocitocina causa impacto sobre os neurônios na via mesolímbica, proporcionando assim a possibilidade de oxitocina regular estes comportamentos^{86,87}.

1.16 β Endorfina

Numerosos estudos demonstram que os péptidos opióides possuem um papel importante na etiologia de alcoolismo, especialmente a beta-endorfina, uma deficiência pode ser a causa do abuso de álcool. Consumo de elevado teor de gordura em alimentos ou etanol pode aumentar o nível destes neuropeptídeos, que por sua vez, pode estimular o comer demais ou beber muito álcool. Os peptídeos opióides endógenos incluem, a beta-endorfina, encefalina e dinorfina. Eles ocorrem na região central sistema nervoso, glândula pituitária, trato gastrointestinal, nos nervos autônomos, a medula suprarrenal, células do pâncreas da mucosa gástrica, fígado, coração, do pulmão e do plasma.

O papel fisiológico dos péptidos opióides não foram ainda completamente compreendidos, embora seja de conhecimento que eles estão envolvidos em muitos processos fisiológicos. O álcool causa a ativação do sistema opióide, cuja consequência é direta ou indiretamente

induzida por um aumento da liberação de dopamina no núcleo accumbens, a estrutura do sistema de recompensa do sistema mesolímbico, realiza o papel mais importante no desenvolvimento do vício de drogas.

Numerosos estudos, experimentais e desenvolvimento clínico da dependência de álcool ligados a doenças congênitas no sistema mesolímbico mostra mudanças adaptativas induzida pelo abuso crônico de álcool. O mais importante péptido endógeno envolvido no desenvolvimento do alcoolismo é a beta-endorfina⁸⁸.

1.17 CRAMP

Os peptídeos antimicrobianos são componentes-chave do sistema imune inato. Eles atuam como agentes antimicrobianos de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e negativas, protozoários, vírus e fungos que estão presentes tanto no reino animal quanto no reino vegetal, tornando a imunidade inata desses organismos competentes contra invasores. São moléculas muito antigas que persistiram ao longo da evolução até o presente momento por sua capacidade de tornar a imunidade inata competente contra invasores^{91,92,93}.

Mais recentemente, os peptídeos antimicrobianos foram atribuídos às funções imunomoduladoras, incluindo um papel na cicatrização de feridas, indução de citocinas e alteração da expressão do gene hospedeiro.

As catelicidinas são uma classe de péptideos antimicrobianos encontrados em seres humanos, camundongos e ratos, dentre outros. Conhecido como LL-37 em humanos e peptídeo antimicrobiano relacionado com catelina (CRAMP) em roedores, catelicidinas são produzidas por muitos tipos celulares, incluindo macrófagos, neutrófilos e células epiteliais⁶⁸. O peptídeo antimicrobiano LL-37 é um peptídeo multifuncional com um amplo espectro de atividades antimicrobianas, tais como quimiotaxia e neutralização de endotoxinas.

Estudos anteriores demonstraram que o LL-37 desempenha um papel funcional no desenvolvimento de numerosos tipos de câncer, incluindo câncer de ovário, mama, próstata e pulmão⁸⁹. Embora o peptídeo antimicrobiano humano LL37 tenha um amplo espectro de atividades antimicrobianas, ele facilmente danifica as células hospedeiras após administração exógena⁹⁰. Peptídeos antimicrobianos, também chamados na literatura de AMPs (Antimicrobial Peptides), são agrupamentos de 12 a 50 aminoácidos que possuem funções antimicrobianas e imunorregulatórias.^{89,90}

1.18 Alcoolismo, infecção e sistema neuroimune

Um desses sistemas alterados pelo abuso do álcool que emergiu recentemente como uma área de interesse é o sistema neuroimune. Estudo de cérebros de pessoas com histórico de abuso de álcool, mostraram aumento da ativação microglial e citocinas pró inflamatórias, como IL-1 β . Em

particular a IL-1 β mostrou ser regulada positivamente no SNC após vários modelos de AUD. No entanto, as contribuições de respostas neuroimunes para a modulação do consumo de etanol foram relativamente ignoradas, especialmente na transição entre abuso do álcool e dependência do álcool³⁵.

Vários estudos têm demonstrado que os alcoólicos crônicos têm maior susceptibilidade a infecções devido à maior exposição a agentes infecciosos, bem como a repartição das suas defesas imunológicas. As infecções são mais frequentes e graves entre os alcoólicos, provavelmente devido à função mental embotada, à quebra das barreiras protetoras locais, à aspiração, à exposição a patógenos e à desnutrição⁹⁴.

Ao longo dos últimos anos, numerosos estudos confirmaram que a inflamação pode ser importante para o desenvolvimento de desordens psicológicas, tais como a depressão, ansiedade, compulsão por álcool, bem como disfunção cognitiva, que caracteriza a face psicopatológica da dependência do álcool⁹⁵. É interessante observar que vários estudos demonstraram que a inflamação afeta múltiplos sistemas de neurotransmissores⁹⁶. A origem da inflamação na dependência de álcool e outras doenças psiquiátricas ainda não está clara. Vários fatores, tais como estresse psicológico, estresse precoce, obesidade, dieta, estresse oxidativo ligado ao metabolismo do etanol e esteatose hepática induzida pelo álcool poderiam estar envolvidos.

Outra fonte potencial de inflamação é a microbiota intestinal, uma enorme comunidade de microrganismos que colonizam o intestino, que interage com o hospedeiro e influencia muitos aspectos de processos

fisiológicos como homeostase corporal, metabolismo e imunidade^{97,98}. Evidências recentes sugerem que a microbiota intestinal é um novo fator importante na saúde e na doença, incluindo distúrbios neuropsiquiátricos⁹⁹, vias complexas, envolvendo endócrina, neural e sinalização imune, mediar a comunicação entre as bactérias intestinais e do sistema nervoso central (SNC), influenciando assim a função do cérebro, humor e comportamento¹⁰⁰.

As alterações na composição da microbiota intestinal têm sido observadas em vários transtornos psiquiátricos, como o autismo^{101,102}, depressão¹⁰³, Doença de Parkinson¹⁰⁴ e dependência de álcool^{105,106}. O consumo de álcool é conhecido por alterar as respostas imunes inatas e adaptativas¹⁰⁷. No entanto, os efeitos do álcool sobre a resposta imune são amplamente influenciados pela dose e pelo tempo de exposição (aguda versus compulsão vs crônica). Embora numerosos estudos tenham demonstrado que a exposição aguda ao álcool inibe a resposta próinflamatória *in vitro* e *in vivo*^{96,106}, o abuso crônico do álcool resulta na ativação da resposta imunitária.

Os pacientes alcoólicos mostram uma desregulação geral do sistema imunológico, o que os torna mais suscetíveis a infecções bacterianas (pneumonia e tuberculose) ou virais (HIV e hepatite C)^{96,108}. A indução de sintomas comportamentais por inflamação periférica é um elemento fundamental da teoria do comportamento da doença¹⁰³. Em resumo, esta teoria apoia que as infecções periféricas levam à ativação do sistema imune inato, através do reconhecimento de compostos bacterianos ou virais por

Toll like receptor (TLRs) e consequentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias.

As citocinas são capazes de atingir o cérebro e, subsequentemente, induzir os três componentes geralmente observadas durante a doença, isto é, febre, uma resposta neuroendócrina e alterações comportamentais, tais como fadiga, lassidão, incapacidade de concentração, irritabilidade, perda de apetite e retirada das atividades sociais normais⁹⁶. Microglia são células imunes inatas do sistema nervoso central. Microglia expressam uma infinidade de receptores de sinalização no sistema imune inato. Um sistema de receptores associado à microglia, a superfamília do receptor tipo toll (TLR) (ie receptor de interleucina1/receptor tipo toll), monta respostas pró-inflamatórias a patógenos detectando moléculas grandes contendo lipídios, açúcares, proteínas e componentes de ácido nucleico. Estudos iniciais sugeriram que apenas microglia estão envolvidos na sinalização TLR, mas estudos mais recentes sugerem que todos os tipos de células cerebrais estão envolvidos nesta sinalização³².

Grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) é ativamente e/ou passivamente liberado por neurônios e outras células levando à ativação de múltiplas vias de sinalização imune inatas. Extracelularmente, o HMGB1 pode interagir diretamente com receptores tipo toll (TLR) ou formar complexos com várias ligações complexos para aumentar as respostas imunitárias em vários receptores de reconhecimento de padrões (PPRs). A ativação de TLRs e outros PRRs leva à ativação do fator de transcrição fator nuclear kappa intensificador de cadeia leve de células B ativadas (NF-κB) e subsequente

indução de citocinas pró-inflamatórias e oxidases que são liberadas para o espaço extracelular. As evidências implicam estas cascatas contribuam para a progressão dos estágios do vício³².

2 Objetivos

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo avaliar a diferença de ingestão de etanol entre os camundongos C57 Bl/6 WT e C57 Bl/6 KO Cramp, verificando as possíveis diferenças na modulação da secreção de neuropeptídeos, proteínas e citocinas envolvidas no encéfalo, fígado e íleo de camundongos KO Cramp, jovens, submetidos ao modelo de etilismo por livre escolha.

Como a pesquisa focou no período da adolescência, buscamos compreender se as possíveis alterações influenciam na gravidade da doença e se causam alterações no encéfalo dos camundongos adolescentes. Foram analisados os neuropeptídeos: CRAMP; Substância P (SP); Oxitocina; Orexina; β -Endorfina; α -MSH e Neurotensina, assim como citocinas pró e anti-inflamatórias: $\text{TNF}\alpha$; IL-6; IL-10; MCP-1 e IL-1 β .

3 Justificativa

A dependência do álcool e uso nocivo do álcool são reconhecidos como doença mental pela OMS. Pesquisas epidemiológicas demonstram altas incidências de doença psiquiátrica entre indivíduos diagnosticados com consumo abusivo ou dependência de álcool. Entre as manifestações clínicas, observadas em alcoolistas, encontramos as disfunções neurológicas e psiquiátricas.

As alterações encontradas nos dependentes de álcool parecem representar danos cerebrais difusos. As alterações cognitivas variam, desde as alterações leves, encontradas nos abusadores da substância, passando por prejuízos moderados nos dependentes de álcool, chegando até os déficits neuropsicológicos nos casos mais severos, como os encontrados na Síndrome de Korsakoff.

Nesse contexto, a análise da expressão gênica de larga escala em diferentes regiões do encéfalo de camundongos submetidos a modelos de etilismo se torna útil, para monitorar possíveis modificações visando uma maior compreensão das alterações neuropsiquiátricas. Bem como a análise das alterações das citocinas pró e anti-inflamatórias podem colaborar para uma maior compreensão da influência do álcool sobre o sistema imune. A busca por uma maior compreensão destes fatores motivaram nossa pesquisa.

4 Metodologia

O presente estudo foi realizado em conformidade com a Diretiva do Conselho para o cuidado de animais de laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo A). Foram utilizados 100 animais C57/Bl 6 machos. Foram realizados todos os esforços para minimizar o número de animais utilizados.

4.1 Local de Realização dos Experimentos

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Emergências Clínicas (LIM-51) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Biotério de Experimentação do Departamento de Clínica Médica.

4.2 Animais

Para o experimento utilizamos camundongos C57/Bl 6 jovens, machos. Os camundongos Cramp e seus controles correspondentes WT foram obtidos em um fundo genético C57Bl/6 sendo que estes foram comprados do laboratório Jackson (Estados Unidos). No início do experimento os animais contavam com 5 semanas de idade (correspondente ao período da adolescência) e com um peso médio de 20g a 25g. Estes

foram retirados do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em gaiolas no Biotério do Departamento de Clínica médica. Receberam água e ração “ad libidum” e foram mantidos em temperatura ambiente controlada.

Após 5 semanas, os animais Cramp e WT submetidos ao modelo de etilismo e controles saudáveis (6 a 16 animais por grupo) foram sacrificados e amostras do córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo, fígado e íleo terminal foram coletados para análise. Os animais foram decapitados sob efeito de anestesia, a fim de amenizar o sofrimento.

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- Animais selvagens submetidos ao etilismo agudo (n=16)
- Animais selvagens controles (n=16)
- Animais CRAMP submetidos ao etilismo agudo (n=16)
- Animais CRAMP controle (n=16)

4.3 Modelo de intoxicação alcoólica

Utilizamos o modelo de etilismo experimental para camundongos a fim de avaliar a ingestão de etanol e para obter as amostras de tecido, Cramp-Knockout e WT que foram obtidos através do modelo de intoxicação alcoólica, descrito por Griffin, 2014⁷. Existem muitos modelos de intoxicação alcoólica para animais, entretanto, este modelo nos pareceu se aproximar mais do que ocorre com o ser humano, porém, não foi utilizado nada que

induzisse o animal ao vício do álcool. Neste modelo de dependência os camundongos tiveram uma livre escolha para beber o etanol. Neste modelo de consumo de livre escolha, os camundongos são normalmente apresentados a 2 garrafas uma contendo a solução de etanol e uma outra contendo água, durante o período de acesso de etanol. Ou seja, uma com solução diluída de etanol (por exemplo, 10% v/v) e a outra contendo água, proporcionando uma escolha para os camundongos⁷. Os animais foram colocados individualmente nas gaiolas. A primeira semana foi de adaptação, onde foi permitido aos animais lidarem com a ausência dos outros animais, permitindo adequação do modelo, já nesta semana colocamos dois falcons de 50ml com o bico do bebedouro convencional, contendo 40ml de água em cada um. Na segunda semana os animais receberam uma solução alcoólica a 4% em uma das garrafas do bebedouro devidamente identificadas com o número do animal e com o tipo de solução que deveria conter no falcon.

Desta forma, buscamos viabilizar a eficácia da técnica. Na segunda semana os animais receberam uma solução alcoólica à 8% e da terceira a quinta semana solução alcoólica a 10%. A quantidade de solução de etanol e água consumida foi determinada pela comparação da quantidade de líquido nos frascos, antes e após o período de acesso. Após 5 semanas, os animais Cramp e WT submetidos ao modelo de etilismo e controles saudáveis (6 a 16 animais por grupo) foram sacrificados e amostras do córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo, fígado e íleo terminal foram coletados para análise.

A quantidade de solução de etanol ou água consumida foi determinada pela diferença entre a quantidade de líquido nos frascos antes e após o período de acesso⁸⁴. Esta verificação ocorreu duas vezes por semana, os animais foram pesados uma vez por semana. O período de acesso à solução de etanol foi contínuo.

4.4 Coleta do material biológico

Os animais foram levados para sala específica no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Emergências Clínicas (LIM-51) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. No referido local os animais foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg de peso do animal) e Xilazina (10 mg/kg de peso do animal) e realizado procedimento cirúrgico para coleta de órgãos. A retirada da calota craniana foi feita cuidadosamente para obtermos a exposição do encéfalo. Os encéfalos foram removidos e dissecados. As áreas de interesse (hipocampo, cerebelo e córtex pré frontal) sob microscópio cirúrgico. Após coleta, os materiais foram colocados em ependorff e imersos no hidrogênio até o término das coletas. Em seguida as amostras de tecido e órgãos foram levados para o freezer 80°C para análise posterior.

4.5 Técnicas Moleculares e de Histologia

Níveis proteicos dos neuropeptídeos (α -MSH, β -endorfina, neurotensina, ocitocina, orexina e a substância P) e as citocinas TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e MCP-1 foram medidas no córtex pré-frontal, hipocampo, e cerebelo de camundongos deficientes em Cramp e WT, após a intoxicação por etanol e em controles saudáveis, usando o imuno ensaio.

Foi utilizado o Milliplex Map Rat/Mouse Neuropeptide Magnetic Bead Panel Cat#RMNPMAG-83K, para a quantificação simultânea dos seguintes analitos: α MSH, β Endorfina, Neurotensina, Orexina A, Ocitocina e Substância P. O procedimento foi realizado segundo as orientações do Kit. magnético Kit Milliplex® eo sistema MAGPIX® (Merck 112 millipore, e.u.a.). Usando um kit ELISA (sistemas de pesquisa e desenvolvimento, EUA), para analisar os níveis de IL-1 β no fígado e no íleo dos mesmos camundongos.

4.6 Análise Estatística

Análise estatística variáveis contínuas foram analisadas usando o Kruskal – Wallis ou o teste t, conforme apropriado. A análise pós-hoc foi realizada utilizando o teste U Mann-Whitney. Um valor de $p \leq 0, 5$ foi considerado estatisticamente significativo. As características dos casos e controles foram comparadas por intermédio do teste ANOVA - Mann Whitney. Foi calculado o respectivo intervalo de confiança de 95% (IC95%); e um valor de P bi-caudado de 0,05 considerado estatisticamente significativo.

5 Resultados

Os resultados que obtivemos foram divididos em três categorias a saber:

1. Resultado da ingesta de álcool (Modelo de intoxicação alcoólica);
2. Secreção de neuropeptídeos (Realizamos a dosagem dos neuropeptídeos por Miliplex)
3. Análise de citocinas, por Miliplex e Elisa

5.1 Resultado da ingesta de álcool

Figura 10 - Ingesta de etanol entre os grupos de animais KO Eth e WT Eth (ingesta de etanol ml/grupo)

O Estudo da ingesta de álcool entre os grupos KO Eth e WT Eth, mostrou que houve uma diferença significativa entre os grupos conforme mostra a Figura 10.

Os animais foram submetidos a concentrações crescentes de álcool a 4,8 e 10% em um período de uma semana para as concentrações de 4 e 8%

e 3 semanas na concentração de 10%. Período total de exposição ao álcool de 5 semanas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e $n = 16$ animais $p < 0,05$ *KO vs WT Eth. Utilizamos nesta fase do experimento 16 animais em cada grupo, que foram acompanhados por 5 semanas e eutanasiados.

5.2 Resultado dos neuropeptídeos

Dosagem dos neuropeptídeos por Milliplex no encefalo de camundongos C57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp (Figura 11 de A a I).

■ Wild-type

□ Cramp KO

Figura 11 - Análise dos neuropeptídeos no encefalo de camundongos Wild type vs KO Cramp

Os camundongos Wild Type e CRAMP deficientes não mostram diferença estatisticamente significativos nos níveis de α -MSH, β -endorfina e neurotensina, no córtex pré-frontal, hipocampo, e cerebello dos animais, após 5 semanas de exposição ao consumo de álcool.

Dosagem dos neuropeptídeos por Milliplex no encefalo de camundongos C57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp (Figura 12 de A a I).

■ Wild-type
□ Cramp KO

Figura 12 - Dosagem dos neuropeptídeos por Milliplex no encefalo de camundongos C57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp

Houve diferença significativa entre os grupos KO Eth e WT Eth na secreção de Ocitocina. $P = 0,045$, no CPF, sugerindo que ocitocina elevou sua secreção provavelmente na tentativa de reduzir o consumo de álcool, conforme suportado pela literatura.

O resultado mostra que não houve uma diferença significativa entre os grupos KO Eth e WT Eth na secreção da orexina e substância P no cerebelo, Hipocampo.

5.3 Resultado das citocinas

Dosagem de citocinas por Milliplex no encefalo de camundongos C57

Bl/6 Wild type vs KO Cramp (Figura 13 de A a I).

■ Wild-type

□ Cramp KO

Figura 13- Dosagem de citocinas por Milliplex no encefalo de camundongos C57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp

Os camundongos do tipo selvagem e CRAMP deficientes mostram níveis semelhantes de citocinas no cérebro após 5 semanas de exposição ao consumo de álcool, não houve diferença em $TNF\alpha$, IL-6, IL-10, no CPF, hipocampo e cerebelo dos camundongos avaliados, conforme observado na Figura 13.

Dosagem de citocinas por Milliplex no encefalo de camundongos C57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp (Figura 14 de A a F).

■ Wild-type

□ Cramp KO

Figura 14- Dosagem por Milliplex no encefalo de camundongos C57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp

A análise de IL-1 β no cerebelo dos animais (Figura 14), mostrou uma diferença significativa entre os grupos WT vs KO, havendo uma elevação na expressão da IL-1 β no grupo WT, demonstrando que o grupo KO tem sua manifestação reduzida. Não houve significância entre os níveis de MCP-1 no córtex pré-frontal, hipocampo, e cerebelo de camundongos do tipo selvagem e CRAMP deficientes após exposição ao álcool.

Dosagem de IL1 β por ELISA no fígado e íleo de camundongos C57 Bl/6 Wild type vs KO Cramp (Figura 15 A e B).

■ Wild-type

□ Cramp KO

Figura 15 – Níveis de IL-1 beta no fígado e íleo de camundongos selvagens e deficientes em CRAMP

A análise da IL-1 β por meio da técnica de Elisa no fígado dos camundongos Wild-Type vs Cramp mostrou que o grupo WT exibiu um aumento significativo nos níveis da IL-1 β em comparação com os camundongos Cramp deficientes, sugerindo que o etanol afeta a via IL-1 β . Entretanto, o mesmo não foi observado no íleo terminal, onde não houve diferença significativa entre os grupos após a exposição de 5 semanas ao álcool.

6 DISCUSSÃO

O estresse normalmente se refere a um evento interno ou externo (ambiental) que interrompe a homeostase normal. O alcoolismo pode se projetar como uma estratégia de enfrentamento adaptativo relacionado ao estresse. A relação entre estresse e consumo de álcool é complexa e mal compreendida. Sistemas biológicos estão diretamente ligados a este tipo de resposta. Eles geram uma resposta neuronal que libera moduladores de peptídeos que intermedeiam uma resposta de enfrentamento apropriada aos desafios ambientais. Vários fatores, tais como estresse psicológico, estresse precoce, obesidade, dieta (rica em gordura, desequilíbrio de ácidos graxos poliinsaturados), estresse oxidativo ligado ao metabolismo do etanol e esteatose hepática induzida pelo álcool podem estar envolvidos.

O uso agudo e crônico de álcool pode levar a alterações no SNC e até provocar o desenvolvimento de síndromes neurodegenerativas, que causam prejuízos morfológicos e funcionais. O Transtorno por uso de álcool é considerado um transtorno neurológico que altera a transmissão de neurotransmissores e seus receptores, como o circuito de recompensa que desempenha importante papel no desenvolvimento do vício.

Sistemas de neurotransmissores como a dopamina, serotonina, os péptidos opióides, glutamato e γ ácido aminobutírico (GABA), estão envolvidos em processos de reforço positivo e negativo que participam na

motivação para a procura da droga e a manutenção do consumo de álcool após o desenvolvimento da dependência.

Vários estudos têm demonstrado que os alcoólicos crônicos têm maior susceptibilidade a infecções devido à maior exposição a agentes infecciosos, bem como a repartição das suas defesas imunológicas. As infecções são mais frequentes e graves entre os alcoólicos, provavelmente devido à função mental embotada, à quebra das barreiras protetoras locais, à aspiração, à exposição a patógenos e à desnutrição⁹⁴.

Ao longo dos últimos anos, numerosos estudos confirmaram que a inflamação pode ser importante para o desenvolvimento de desordens psicológicas, tais como a depressão, ansiedade, compulsão por álcool, bem como disfunção cognitiva, que caracteriza a face psicopatológica da dependência do álcool⁹⁶. É interessante observar que vários estudos demonstraram que a inflamação afeta múltiplos sistemas de neurotransmissores¹¹⁰. Inflamação e respostas imune inatas alteradas são marcas registradas de danos em órgãos induzida pelo álcool, afetando o fígado, sistema cardiovascular e cérebro. Ingestão de álcool a longo prazo resulta em neuroinflamação³⁵ e neurodegeneração em humanos e em modelos animais.

O sistema imune inato surgiu como um componente crítico no desenvolvimento de transtornos de uso de álcool e outros vícios¹⁰⁹. Estresse repetido e ciclos de abuso de álcool e drogas sensibilizam a microglia, fator consistente com a hipótese de que a indução de vias de sinalização imune

inata contribui para o aumento progressivo do desejo, disfunção de humor e deficiências cognitivas observadas no vício. Por um lado, sabe-se que o álcool é um ansiolítico eficaz e, portanto, a motivação para beber pode ser guiada por sua capacidade de aliviar o estresse.

O eixo intestino cérebro possui um importante papel nas doenças mentais. A microbiota intestinal, uma enorme comunidade de microrganismos que colonizam o intestino, interage com o hospedeiro e influencia muitos aspectos de processos fisiológicos como homeostase corporal, metabolismo e imunidade^{96,97}. Evidências recentes sugerem que a microbiota intestinal é um fator importante na saúde e na doença, incluindo distúrbios neuropsiquiátricos⁹⁸. Vias complexas, envolvendo a via endócrina, neural e sinalização imune, medeiam a comunicação entre as bactérias intestinais e do sistema nervoso central (SNC), influenciando assim a função do cérebro, humor e comportamento⁵⁷. As alterações na composição da microbiota intestinal têm sido observadas em vários transtornos psiquiátricos, como o autismo^{58,59}, depressão⁶⁰, Doença de Parkinson⁶¹ e dependência de álcool^{62,64}.

O consumo de álcool é conhecido por alterar as respostas imunes inatas e adaptativas⁶³. No entanto, os efeitos do álcool sobre a resposta imune são amplamente influenciados pela dose e pelo tempo de exposição (aguda versus compulsão vs crônica). O abuso crônico do álcool resulta na ativação da resposta imune. Os pacientes alcoólicos mostram uma desregulação geral do sistema imunológico, o que os torna mais suscetíveis a infecções bacterianas (pneumonia e tuberculose) ou virais (HIV e hepatite

C)^{52,65}. A indução de sintomas comportamentais por inflamação periférica é um elemento fundamental da teoria do comportamento da doença⁷³. A origem da inflamação na dependência de álcool e outras doenças psiquiátricas ainda não estão clara.

Em resumo, as infecções periféricas levam à ativação do sistema imune inato, através do reconhecimento de compostos bacterianos ou virais por TLRs e consequentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias. Os efeitos nocivos do álcool no SNC são principalmente uma consequência de sua interação com receptores Toll like receptor (TLRs) e outras vias inflamatórias presentes nas células gliais, especialmente astroglia e microglia. Vias de sinalização imunes inatas que desempenham um papel crucial na patogênese de doenças neurodegenerativas e neuroinfecção. Citocinas inflamatórias e mediadores, incluindo TNF- α , IL-1 β e HMGB1 afetam os neurônios e estão associados com sintomas do etilismo em modelos animais. O etanol pode ativar inflamassomos, que induzem a produção de IL-1 β , citocinas proinflamatórias que contribuem para alterações patológicas em muitos órgãos.

O aspecto imunológico de dano cerebelar induzido por etanol não tem sido estudado extensivamente e a alta densidade celular e a fácil acessibilidade do cerebelo fornecem um candidato preferível para pesquisa. A ingestão de álcool prejudica a integração da percepção sensorial, coordenação e controle motor, que são funções do cerebelo. A longo prazo, o consumo de álcool pode levar a atrofia cerebelar, qual é, em parte, resultado da desnutrição gerada pelo álcool.

Nossos resultados mostraram que os animais submetidos ao modelo de alcoolismo por livre escolha, tiveram uma significância uma vez que o grupo deficiente em Cramp teve uma ingesta de etanol elevada comparada ao grupo selvagem. Estes animais adolescentes foram mais receptivos ao etanol desde o primeiro contato com a droga, sugerindo uma susceptibilidade maior deste grupo a aquisição do vício do álcool. Portanto, podemos supor que a catalecidina (Cramp, LL37) pode conferir uma alteração na resposta ao vício do álcool inibindo sua ingesta.

Neste estudo, relatamos que camundongos adolescentes alimentados com álcool sem qualquer estímulo adicional apresentam uma alteração de IL-1 β (um peptídeo antimicrobiano), no encefalo. Mostramos que a produção IL-1 β no cerebelo do grupo CRAMP deficiente apresenta uma alteração na sua produção. Obsevamos tal fato quando comparamos o grupo saldável com o grupo álcool e quando comparamos o grupo selvagem com o grupo Cramp deficiente submetidos a ingesta de álcool. Portanto a supressão do Cramp diminui significativamente os níveis cerebelares de IL-1 β neste modelo experimental de intoxicação alcoólica.

Estudo recente mostrou ataxia cerebelar em aproximadamente dois terços de alcoólatras bem nutridos¹⁰⁸ juntamente com a nossa observação de inflamação sugerimos que vias imunológicas podem estar envolvidas nesta resposta a intoxicação alcoólica. Além disso, os pesquisadores encontraram uma alta frequência de degeneração cerebelar alcoólica sem encefalopatia de Wernicke e sugeriram que uma intervenção precoce pode prevenir a progressão da doença¹⁰⁶.

O alcoolismo causa perda de células de Purkinje distintiva e alterações celulares na camada molecular no cerebelo¹⁰⁹. Da mesma forma para as alterações no cerebelo, pro-inflamação induzida por mediadores (IL-1 β). Mostram que há um aumento da produção de IL-1 β após uma dieta alcoólica e que amplifica expressão de mediadores inflamatórios no cérebro.

No neuropeptídeo Ocitocina o resultado no CPF mostrou que houve uma significância entre os grupos saudável e grupo álcool sugerindo que a ocitocina elevada pode ser uma tentativa do cérebro para proteção e subsequente redução do consumo de etanol.

Estudos mostram que o sistema central de oxitocina emergiu como um alvo terapêutico potencialmente importante para a toxicodependência do álcool. Nenhuma outra diferença foi encontrada nos níveis proteína, citocinas e outros neuropeptídeos investigados no encéfalo dos camundongos.

Nosso estudo mostrou uma diferença significativa no fígado entre os animais do grupo álcool e o grupo saudável. Observamos que a expressão de IL-1 β está mais elevada no grupo álcool, sugerindo que o fígado dos animais foram afetados mesmo havendo um curto período de exposição ao álcool.

7 Conclusão

Detectamos em nosso estudo níveis de IL-1 β diminuídos no cerebelo de camundongos adolescentes com deficiência em Cramp em comparação com camundongos de tipo selvagem. Esta diferença, foi associada a um aumento significativo na ingestão de etanol pelo grupo Cramp-deficiente. O etilismo altera a barreira intestinal, a infecção pode ser por translocação bacteriana, mecanismo pelo qual o Cramp está causando infecção. Portanto, o álcool altera a resposta imune. Havendo uma exacerbação nos animais Cramp deficientes. Os peptídeos antimicrobianos podem ter um papel importante na resposta imunoinflamatória que ocorre durante o etilismo agudo. Nosso estudo mostrou ainda que a ocitocina apresenta-se elevada no grupo álcool, possivelmente uma ação do organismo para tentar diminuir o consumo. Mostrando uma possível ação terapêutica contra os danos do etilismo.

Existem varios modelos de intoxicação alcoólica em camundongos, porém, nenhum modelo reproduz de forma integral o aspecto total da doença. Sendo esta uma limitação importante para nosso estudo. É difícil reproduzir o alcoolismo em roedores. Usando o modelo de intoxicação alcoólica proposto por Griffin, observamos danos a órgãos como fígado e encefalo.

Acreditamos que um período prolongado de intoxicação por etanol, provocaria danos em outras regiões cerebrais, como o córtex pré-frontal, região frequentemente afetada pela ingestão pesada de álcool.

8 Anexo

Anexo A – Aprovação pelo Comitê de Ética

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NEUROPEPTÍDEOS EM CAMUNDONGOS JOVENS SUBMETIDOS AO MODELO DE ALCOOLISMO AGUDO**” protocolo nº **167/15** sob a responsabilidade de **Fabiano Pinheiro da Silva e Neusa Maria Nascimento Pimentel**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 09.03.16

Vigência do Projeto	Agosto/2016
Espécie/linhagem	Camundongo SPF – C57Bl/6 e Camundongo Knockout-CRAMP KO C57Bl/6
Nº de animais	120 e 120
Peso/Idade	5 e 7 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central FMUSP

CEUA-FMUSP, 09 de Março de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

9 Referências

1. Wong, D.V.T ; Ferreira J.R.O. ; Fonteles M.M.F. et al. Alcohol and Neurodevelopment: pharmacologics and genetics aspects. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 1: 8-23, 2008.
2. Lino TAL. Alcoolismo: da causa a doença. Disponível em www.psicologia.pt/artigos/textos/TL0054.pdf. Acessado em 14.11.2006
3. Sabino KR, Petroianu A, Alberti LR. Influence of the acute alcoholism on the phagocytic function of the mononuclear phagocytic system. *J Med Life*. 2011 Nov 14;4(4):421-3.
4. Heckmann W, Silveira CM. Alcohol dependence: clinical and diagnostic aspects 2009. 5. Contet C. Gene expression under influence: transcriptional profile of ethanol in the brain. Disponível em www.cisa.org.br/UserFiles/.../alcoolesuasconsequencias-en-cap3.p.
5. Contet C. Gene Expression Under the Influence: Transcriptional Profiling of Ethanol in the Brain. Author: Contet C. Source: Current Psychopharmacology, Volume 1, Number 4, November 2012, pp. 301-314(14) Publisher: Bentham Science Publishers.
6. Gilpin NW, Koob GF. Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. *Alcohol Res Health*. 2008;31(3):185-95.
7. Griffin WC 3rd. Alcohol dependence and free-choice drinking in mice. *Alcohol*. 2014 May;48(3):287-93.
8. O'Connor PG. Alcohol abuse and dependency. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2012; 38 (3): 187-99.
9. Ji, C. Mechanisms of Alcohol-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Organ Injuries. *Biochem Res Int*. 2012;2012:216450.
10. Marshall SA, Casachahua JD, Rinker JA, Blose AK, Lysle DT, Thiele TE. IL-1 receptor signaling in the basolateral amygdala modulates binge-like ethanol consumption in male C57BL/6J mice. *Brain Behav Immun*. 2016 Jan;51:258-67.
11. Cunha PJ, Novaes MA. Neurocognitive evaluation in alcohol abuse and dependence: implications for treatment. *Rev Bras Psiquiatr*. 2004 May; 26 Suppl 1:S23-7. Epub 2005 Jan 4

12. Dázio EM, Zago MM, Fava SM. Use of alcohol and other drugs among male college students and their meanings. *Rev. esc. enferm. USP*. 2016; 50(5):785-791.
13. Puttler LI, Fitzgerald HE, Heitzeg MM, Zucker RA. Boys, Early Risk
14. DSM-5 American Psychiatric Association, tradução. Corrêa MIN, et al.; revisão técnica: Cordioli AV, et al. 2014. Porto Alegre: Artmed, 2014. XLIV, 948 p.
15. Jordan WT, Fulton T. Microglial depletion alters the brain's neuroimmune response to acute withdrawal from compulsive ethanol *Journal of Neuroinflammation* 2017, 14:86.
16. Pereira RS, Hasimoto CN, Pelafsky L, Llanos JC, Cataneo DC, Spadella CT, Minossi JG. Intestinal healing in rats submitted to ethanol ingestion. *Acta Cir Bras*. 2012 Mar;27(3):236-43.
17. Drummond C; Pilling S, Brown A, Copello A, et al. Nice Clinical Guidelines, nº. 115. -Alcohol Use Disorders: diagnosis, evaluation and management of harmful consumption and alcohol dependence. Commissioned by the National Institute for Health & Clinical Excellence. Published by The British Psychological Society and The Royal College of Psychiatrists, 2011.
18. Miczek KA, DeBold JF, Hwa LS, Newman EL, de Almeida RM. Alcohol and violence: neuropeptidergic modulation of monoamine systems. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Sep;1349:96-118.
19. Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry*. 2016 Aug;3(8):760-73.
20. Milne BJ, Caspi A, Harrington H, Poulton R, Rutter M, Moffitt TE. Predictive value of family history on severity of illness: the case for depression, anxiety, alcohol dependence, and drug dependence. *Arch Gen Psychiatry*. 2009 Jul;66(7):738-47.
21. Shaw DS, Gilliam M. Early childhood predictors of low-income boy's pathways to antisocial behavior in childhood, adolescence, and early adulthood. *Infant Ment Health J*. 2017 Jan;38(1):68-82.
22. Fonagy P, Luyten P, Strathearn L. Borderline personality disorder, mentalization, and the neurobiology of attachment. *Infant Ment Health J*. 2011 Jan;32(1):47-69.
23. Eiden RD, Edwards EP, Leonard KE. A conceptual model for the development of externalizing behavior problems among kindergarten children of alcoholic families: role of parenting and children's self-regulation. *Infant Ment Health J*. 2011 Jan;32(1):47-69.

24. Vadnie CA, Park JH, Abdel Gawad N, Ho AM, Hinton DJ, Choi DS. Gut-brain peptides in corticostriatal-limbic circuitry and alcohol use disorders. *Front Neurosci*. 2014 Sep 18;8:288.
25. Vitali M, Napolitano C, Berman MO, Minuto SF, Battagliese G, Attilia ML, Braverman ER, Romeo M, Blum K, Ceccanti M. Neurophysiological Measures and Alcohol Use Disorder (AUD): Hypothesizing Links between Clinical Severity Index and Neurobiological Molecular Patterns. *J Addict Res Ther*. 2016 Apr;5(2).
26. Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, Qin L, Szabo G, Wheeler M, Zou J. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30:720-30.
27. Chiappelli F, Kung M, Lee P, Pham L, Manfrini E, Villanueva P. Alcohol modulation of human normal T-cell activation, maturation and migration. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995;19:539-44.
28. Meloni JN, Laranjeira R. Social cost of alcohol consumption. *Rev Psiquiatr*. 2004; 26, 1: 7-10.
29. Cippitelli A, Domi E, Ubaldi M, Douglas JC, Li HW, Demopoulos G, Gaitanaris G, Roberto M, Drew PD, Kane CJM, Ciccocioppo R. Protection against neuronal and cognitive damage induced by alcohol by the PPAR γ receptor agonist pioglitazone. *Brain Behav Immun*. 2017 Aug;64:320-329.
30. Gigliotti A, Copetti J. Como Diagnosticar e Tratar: Transtorno por uso de álcool. *RBM*, 70(12): 32-38, 2013.
31. Zaleski M, Morato GS, Silva VA, Lemos T. Neuropharmacological aspects of chronic alcohol use and withdrawal syndrome. *Rev Bras Psiquiatr*. 2004 May;26 Suppl 1:S40-2. Epub 2005 Jan 4. Portuguese.
32. Sarmiento X, Guardiola JJ, Soler M. Alcohol and acute respiratory distress syndrome: casualty or causality? *Med Clin (Barc)*. 2013 Jun 18;140(12):546-53
33. Pereira RS, Hasimoto CN, Pelafsky L, Llanos JC, Cataneo DC, Spadella CT, Minossi JG. Intestinal healing in rats submitted to ethanol ingestion. *Acta Cir Bras*. 2012 Mar;27(3):236-43.
34. Cohen-Gilbert JE, Sneider JT, Crowley DJ, Rosso IM, Jensen JE, Silveri MM. Impact of Family History of Alcoholism on Glutamine/Glutamate Ratio in Anterior Cingulate Cortex. *Dev Cogn Neurosci*. 2015 Dec;16:147-154.
35. Contreras A, Morales L, Tebourbi A, Miguéns M, Olmo ND, Pérez-García C. Age Dependent Effects of Acute Alcohol Administration on

- Hippocampus Phosphoproteate. *Chem Res Toxicol*. 2017 Dec 18;30(12):2165-2173.
36. Kokare DM, Kyzar EJ, Zhang H, Sakharkar AJ, Pandey SC. Adolescent Alcohol Exposure-Induced Changes in Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone and Neuropeptide Y Pathways via Histone Acetylation in the Brain During Adulthood. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017 Sep 1;20(9):758-768.
 37. Kyzar EJ, Banerjee R. Targeted Epigenetic Modulation of Gene Expression in the Brain. *J Neurosci*. 2016 Sep 7;36(36):9283-5.
 38. Fish EW, Holloway HT, Rumple A, Baker LK, Wiczorek LA, Moy SS, Paniagua B, Parnell SE. Acute alcohol exposure during neurulation: Behavioral and brain structural consequences in adolescent C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*. 2016 Sep 15;311:70-80.
 39. Narendran R, Mason NS, Paris J, Himes ML, Douaihy AB, Frankle WG. Decreased prefrontal cortical dopamine transmission in alcoholism. *Am J Psychiatry*. 2014 Aug;171(8):881-8.
 40. Kyzar EJ, Pandey SC. Molecular mechanisms of synaptic remodeling in alcoholism. *Neurosci Lett*. 2015 Aug 5;601:11-9.
 41. Fernandes LMP, Bezerra FR, Monteiro MC, Silva ML, de Oliveira FR, Lima RR, Fontes-Júnior EA, Maia CSF. Thiamine deficiency, oxidative metabolic pathways and ethanol-induced neurotoxicity: how poor nutrition contributes to the alcoholic syndrome, as Marchiafava-Bignami disease. *Eur J Clin Nutr*. 2017 May;71(5):580-586.
 42. Marques AC, Ribeiro M, Laranjeira R, Zaleski M, Gigliotti A, Salgado C. Guidelines of the Brazilian Association of Studies on Alcohol and Other Drugs (ABEAD) for diagnosis and treatment of psychiatric comorbidity with alcohol and other substance and dependence. 2017; 29(3):254-262.
 43. Alongkronrasmee D, Chiang T, van Rijn RM. Involvement of delta opioid receptors in alcohol withdrawal-induced mechanical allodynia in male C57BL/6 mice. *Drug Alcohol Depend*. 2016 Oct 1;167:190-8.
 44. Sullivan JT, Sykora K, Schneiderman J, Naranjo CA, Sallers EM. Assessment of alcohol Withdrawal: The revised Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol scale (CIWA-Ar). *British Journal of Addiction* 1989; 84: 1353-1357
 45. Nennig SE, Schank JR. The Role of NFkB in Drug Addiction: Beyond Inflammation. *Alcohol Alcohol*. 2017 Mar 9;52(2):172-179.
 46. Adermark L, Jonsson S, Söderpalm B, Ericson M. Region-specific depression of striatal activity in Wistar rat by modest ethanol

- consumption over a ten-month period. *Alcohol*. 2013 Jun;47(4):289-98.
47. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35:217–238.
 48. Maze I, Nestler EJ. The epigenetic landscape of addiction. *Ann NY Acad. Sci.* 2011; 1216:99–113.
 49. Dong Y, Nestler EJ. The neural rejuvenation hypothesis of cocaine addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* 2014;35:374–383.
 50. Abbott LF, Nelson SB. Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat. Neurosci.* 2000;3(Suppl):1178–1183.
 51. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361:31–39.
 52. Yoon B-J, Smith GB, Heynen AJ, Neve RL, Bear MF. Essential role for a long-term depression mechanism in ocular dominance plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106:9860–9865.
 53. Creed MC, Lüscher C. Drug-evoked synaptic plasticity: beyond metaplasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2013; 23:553–558.
 54. Lüscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*. 2011;69:650–663.
 55. McCool BA. Ethanol modulation of synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. 2011;61:1097–1108.
 56. Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic Plasticity. *Nature*. 1999;399:66–70.
 57. Pandey SC, Zhang H, Ugale R, Prakash A, Xu T, Misra K. Effector immediate-early gene arc in the Amygdala plays a critical role in alcoholism. *J. Neurosci.* 2008;28:2589–2600.
 58. You C, Zhang H, Sakharkar AJ, Teppen T, Pandey SC. Reversal of deficits in dendritic spines, BDNF and Arc expression in the amygdala during alcohol dependence by HDAC inhibitor treatment. *Int. Neuropsychopharmacol.* 2014;17:313–22.
 59. Zhou FC, Anthony B, Dunn KW, Lindquist WB, Xu ZC, Deng P. Chronic alcohol drinking alters neuronal dendritic spines in the brain reward center nucleus accumbens. *Brain Res.* 2007;1134:148–161
 60. Riley JN, Walker DW. Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice. *Science*. 1978;201:646–648.

61. Ferrer I, Fabregues I, Rairiz J, Galofre E. Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in human chronic alcoholism. *Neurosci Lett*. 1986;69:115–9.
62. Malenka RC, Nicoll RA. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: Multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci*. 1993;16:521–527.
63. Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci*. 2007;8:413–426.
64. Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*. 1989;243:1721–1724.
65. Roberto M, Schweitzer P, Madamba SG, Stouffer DG, Parsons LH, Siggins GR. Acute and chronic ethanol alter glutamatergic transmission in rat central amygdala: an in vitro and in vivo analysis. *J. Neurosci*. 2004;24:1594–1603.
66. Roberto M, Bajo M, Crawford E, Madamba SG, Siggins GR. Chronic ethanol exposure and protracted abstinence alter NMDA receptors in central amygdala. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:988–996.
67. Morganstern I, Chang GQ, Barson JR, Ye Z, Karatayev O, Leibowitz SF. Differential effects of acute and chronic ethanol exposure on orexin expression in the perifornical lateral hypothalamus. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010 May;34(5):886-96..
68. Rudzińska U, Zalewska-Kaszuńska J. Role of endogenous neuropeptides in the pathomechanism of alcohol addiction. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2009 Dec 22;63:643-52.
69. Walker LC, Lawrence AJ. The Role of Orexins/Hypocretins in Alcohol Use and Abuse. *Curr Top Behav Neurosci*. 2017;33:221-246.
70. Sullivan EV, Pfefferbaum A. Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Aug;180(4):583-94.
71. Mayannavar S, Rashmi KS, Rao YD, Yadav S, Ganaraja B. Effect of Orexin A antagonist (SB-334867) infusion into the nucleus accumbens on consummatory behavior and alcohol preference in Wistar rats. *Indian J Pharmacol*. 2016 Jan-Feb;48(1):53-8.
72. Srinivasan S, Simms JA, Nielsen CK, Lieske SP, Bito-Onon JJ, Yi H, Hopf FW, Bonci A, Bartlett SE. The dual orexin/hypocretin receptor antagonist, almorexant, in the ventral tegmental area attenuates ethanol self-administration. *PLoS One*. 2012;7(9):e44726.
73. Rivera P, Blanco E, Bindila L, Alen F, Vargas A, Rubio L, Pavón FJ, Serrano A, Lutz B, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J.

- Pharmacological activation of CB2 receptors counteracts the deleterious effect of ethanol on cell proliferation in the main neurogenic zones of the adult rat brain. *Front Cell Neurosci.* 2015 Sep 29;9:379.
74. Mahler SV, Smith RJ, Moorman DE, Sartor GC, Aston-Jones G. Multiple roles for orexin/hypocretin in addiction. *Prog Brain Res.* 2012;198:79-121.
75. Sharma R, Bradshaw K, Sahota P, Thakkar MM. Acute binge alcohol administration reverses sleep-wake cycle in Sprague Dawley rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014 Jul;38(7):1941-6.
76. Gorini G, Roberts AJ, Mayfield RD. Neurobiological signatures of alcohol dependence revealed by protein profiling. *PLoS One.* 2013 Dec 16;8(12):e82656.
77. Baimel C, Bartlett SE, Chiou LC, Lawrence AJ, Muschamp JW, Patkar O, Tung LW, Borgland SL. Orexin/hypocretin role in reward: implications for opioid and other addictions. *Br J Pharmacol.* 2015 Jan;172(2):334-48.
78. Voorhees CM, Cunningham CL. Involvement of the orexin/hypocretin system in ethanol conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl).* 2011 Apr;214(4):805-18.
79. Sharma R, Sahota P, Thakkar MM. Role of adenosine and the orexinergic perifornical hypothalamus in sleep-promoting effects of ethanol. *Sleep.* 2014 Mar 1;37(3):525-33.
80. Kim AK, Brown RM, Lawrence AJ. The role of orexins/hypocretins in alcohol use and abuse: an appetitive-reward relationship. *Front Behav Neurosci.* 2012 Nov 22;6:78.
81. Yang AR, Yi HS, Mamczarz J, et al. Deficits in substance P mRNA levels in the CeA are inversely associated with alcohol-motivated responding. *Synapse.* 2009 Nov;63(11):972-81.
82. Taylor BK, Fu W, Kuphal KE, Stiller CO, Winter MK, Chen W, Corder GF, Urban JH, McCarson KE, Marvizon JC. Inflammation increases the receptor signal Y1, inhibition of hyperalgesia mediated by neuropeptide Y and the release of substance P from primary afferent neurons. *Neuroscience.* 2014 Jan 3;256:178-94.
83. Le Saux G, Plawinski L, Nlate S, Ripoché J, Buffeteau T, Durrieu MC. Beneficial Effect of Covalently Grafted α -MSH on Endothelial Release of Inflammatory Mediators for Applications in Implantable Devices. *PLoS One.* 2016 Mar 3;11(3):e0150706.

84. King CE, Griffin WC, Luderman LN, Kates MM, McGinty JF, Becker HC. Oxytocin Reduces Ethanol SelfAdministration in Mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017 May;41(5):955-964.
85. Kirsch P. Oxytocin in the socioemotional brain: implications for psychiatric disorders. *Dialogues Clin Neurosci*. 2015 Dec;17(4):463-76.
86. Lee MR, Weerts EM. Oxytocin for the treatment of drug and alcohol use disorders. *Behav Pharmacol*. 2016 Dec;27(8):640-648.
87. Peters ST, Bowen MT, Bohrer K, McGregor IS, Neumann ID. Oxytocin inhibits ethanol consumption and ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Addict Biol*. 2017 May;22(3):702-711.
88. Silva, FP, Machado MC. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*. 2012;36(2):308-14.
89. Pinheiro da Silva F, Machado MC. The dual role of cathelicidins in systemic inflammation. *Immunol Lett*. 2017 Feb;182:57-60.
90. Jia J, Zheng Y, Wang W, Shao Y, Li Z, Wang Q, Wang Y, Yan H. Antimicrobial peptide LL-37 promotes YB-1 expression, and the viability, migration and invasion of malignant melanoma cells. *Mol Med Rep*. 2017 Jan;15(1):240-248.
91. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol*. 2017 Feb 6;8:81.
92. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002; 415(6870):389-95.
93. Pinheiro da Silva F, Machado MC. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*. 2012 Aug;36(2):308-14.
94. Wei XB, Wu RJ, Si DY, et al. - Novel Hybrid Peptide Cecropin A (1-8)-LL37 (17-30) with Potential Antibacterial Activity. *Int J Mol Sci*. 2016 Jun 29;17(7).
95. Oliveira LC, Ribeiro CT, Mendes D de M, et al. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Jan;97(1):119-21.
96. Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: Translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacol* 2012; 37 : 13

97. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W et al. Metabolic interactions host-intestinal microbiota. *Ciência* 2012; 336: 1262-1267.
98. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between microbes and the immune system. *Ciência* 2012; 336 : 1268-
99. Rodada JL, Mazmanian SK. The intestinal microbiota way intestinal immune responses during health and illness. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 313-323.
100. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of intestinal microbiota on the brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 701-712.
101. Leclercq S, de Timary P, Delzenne NM, Stärkel P. The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence. *Transl Psychiatry*. 2017 Feb 28;7(2):e1048.
102. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. The microbiota modulates physiological and behavioural Abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 2013; 155 : 1451-1463.
103. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, et al. Pirosequenciação study of fecal microflora of autistic children and control. *Anaerobe* 2010; 16 : 444-453.
104. Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, et al. Correlation between human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26: 1155-1162.
105. Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, et al. The intestinal microbiota is related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 2015; 30: 350-358.
106. Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, Neyrinck AM, Jamar F, Stärkel P, Windey K, Tremaroli V, Bäckhed F, Verbeke K, de Timary P, Delzenne NM. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct 21;111(42):E4485-93.
107. Mutlu EA, Gillevet PM, Rangwala H, et al . The microbioma of colonies changes in alcoholism. *Am J Physiol Gastrointest Fígado Physiol* 2012; 302 : G966-G978.
108. Szabo G, Saha B. The effect of alcohol in host defense host. *Álcool Res* 2015; 37 : 159-170
109. Cook RT. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system-a review. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998 Dec;22(9):1927-42.

110. Giardino WJ, Rodriguez ED, Smith ML, Ford MM, Galili D, Mitchell SH, Chen A, Ryabinin AE. Control of chronic excessive alcohol drinking by genetic manipulation of the Edinger–Westphal nucleus urocortin-1 neuropeptide system. *Transl Psychiatry*. 2017 Jan 31;7(1):e1021.