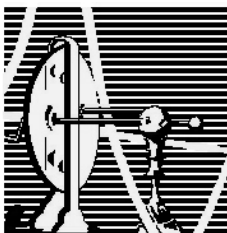


Fernanda Pohl Guimarães

**EFEITOS DO ETANOL NO SISTEMA GABAÉRGICO
DE RETINA EMBRIONÁRIA DE GALINHA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**EFEITOS DO ETANOL NO SISTEMA GABAÉRGICO
DE RETINA EMBRIONÁRIA DE GALINHA**

Fernanda Pohl Guimarães

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), IBCCF, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Dr Ricardo Augusto de Melo Reis

Co-Orientador: Dra Karin da Costa Calaza

Laboratório de Neuroquímica

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Rio de Janeiro

Julho-2007

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Neuroquímica do programa de Neurobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, sob a orientação do Dr. Ricardo Augusto de Melo Reis e Co-orientação da Dra. Karin da Costa Calaza e na vigência de auxílios recebidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e PRONEX.

Ficha Catalográfica

POHL, Fernanda Guimarães

Efeitos do etanol no sistema GABAérgico de retina embrionária de galinha.

Orientador: Ricardo Augusto de Melo Reis

Co-orientadora: Karin da Costa Calaza

Rio de Janeiro, UFRJ/ IBCCF, 2007.

xiv, 102 16f. 1t.

Tese: Mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica). Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ/IBCCF – Programa de Neurobiologia, Laboratório de Neuroquímica.

1. Retina; 2. Etanol; 3. Liberação de GABA; 4. GABA; 5. Glutamato.

Agradecimentos

Inicialmente agradeço minha família e imensamente a minha MÃE, Maria Talita, mais conhecida por “Talitinha”, por todo amor, carinho, compreensão e fé que ela sempre teve por mim. Não é difícil de se imaginar que uma pessoa, querendo sempre o bem dos outros, pode combinar tão bem o papel de ser mãe, amiga, esposa, tia e poder me dar todo o conforto e segurança que um filho necessita. Uma pessoa fantástica que me ensinou a ser quem eu sou atualmente, e com a qual eu aprendi a fazer o que há de mais correto na vida. Sempre ao meu lado, me confortando em momentos de incertezas, ansiedade, medo; tentando sempre distanciar a saudade através de orações, cartas, telefonemas, emails ou torpedos.

Ao meu pai por ter me educado e ensinado o que é amar, em apenas uma frase: “Amar é se orgulhar da pessoa com a qual você está”.

Ao Sr Osmar Pohl, meu segundo pai, por ter dado todo conforto, companheirismo e tranquilidade a minha mãe durante o período de mestrado, no qual estive longe dela, e pela torcida e confiança que ele tem por mim.

Ao Antonio Marcos de Mello Moraes pelo convite feito a mim para fazer a seleção de mestrado no Rio de Janeiro, e claro também pela companhia de sempre, apesar de ter sido por um curto período, ele sempre estava lá, pronto para tudo, inclusive para as festas.

A minha querida irmã que eu adquiri nesse período de mestrado, Eunice Amanda, por ter me recebido em sua casa, da forma mais carinhosa e receptiva possível. Uma pessoa que acima de tudo, sempre torceu e acreditou em mim; assim como minha mãe, ela me confortou em momentos de dúvidas, cuidou de mim e independentemente do assunto que fosse, ela estava sempre disposta a me ouvir quando chegava em casa.

Ao meu orientador Ricardo Reis, pela atenção e disposição de me ajudar, sempre com muita agilidade. E claro, pela paciência que ele teve comigo.

A minha co-orientadora Karin Calaza, pela dedicação, tranquilidade e carisma que ela propiciou a mim durante o mestrado. Além de ser mãe, com sua agenda sempre lotada, sempre sobrava um tempinho para mim.

As minhas queridas amigas “gaúchas” (em ordem alfabética, para não dar briga), Ana Caroline Benedetti, Chimene Lima (Chi), Cristiana Schuch (Cris), Juliana Avieiro (“conhada”), Juliana Franck (Ju), Juliana Lorensi (“afilhada”), Michele Martelet, Patrícia Pozzatti (“mocre”), Taiana Castro, Tatiana Pepe (Tati), pela amizade, longas conversas, (sérias ou não), conselhos, companheirismo. E por serem tão maravilhosas como são, e sem vocês nada da minha vida teria valido a pena.

Aos meus grandes amigos Sr. Giuseppe Guidi e Albano Pepe, que sempre me incentivaram a estudar, estudar e estudar até quando eu pudesse. Gostaria de agradecer também a atenção e respeito que eles tem por mim e pelo ensinamento sobre a vida.

Aos amigos “gaúchos”, Alexandre Augusti, Ismair Betiollo, Marcus Vinícius (“Kinho”), Mario Castro (“codorna”) pela amizade e carinho que eles tem por mim.

Aos meus amigos “cariocas”, (também por ordem alfabética para não dar preferência) Anabela Pestana (Ana), Marcelo Del Negri, Rodolfo Sauer (“Rodolfinho”) e Sara Vinhal (“Saritinha”) pelo companheirismo e carinho que sempre tiveram por mim, em especial ao Rodolfo sempre me protegendo e se preocupando comigo de uma forma absurda e me incentivando a ter autoconfiança.

As crianças que eu vi nascer e/ou crescer, Giulia Lorensi (“Giu”) minha afilhada), Guilherme Castro (“Gui”), Isadora Pepe (“Isinha”), Manoella Felice (“Manu”), Renata Burgos (“Renatinha”) e Victor Vinhal, pelo carinho, atenção, surpresas e aprendizado de vida que me propiciaram.

Aos professores Edna Yamasaki, Regina Kubrusly, Patricia Gardino, Jan Nora, Fernando de Mello, por terem participado de uma forma ou de outra desse processo ou simplesmente pelas discussões científicas e pela agradável convivência.

À família de Clarissa Schitine por terem me recebido em sua casa, sempre de uma forma carinhosa, assim que vim morar no Rio de Janeiro.

Aos colegas dos laboratórios de Neuroquímica e laboratório de Neurobiologia da Retina: Pedro Barros (“Pedrinho”), Cristiano Pêsoa (“Fura”), Maurício Castro (“Mcastro”), Nilson Nunes, pela ótima convivência, pelas piadinhas, pelas ajudas em ciência, informática, inglês, estatística, enfim pela atenção que sempre me deram.

A Rosilane Silva e Aurisete Nunes (“Zetinha”) pelo apoio técnico ao longo de toda a tese.

Aos membros da banca.

E a Deus.

Resumo

Diversas ações do etanol (ETOH) em sinapses GABAérgicas têm sido descritas e mais recentemente um novo mecanismo neuroadaptativo tem sido sugerido, a influência na liberação de GABA. Foi investigada a liberação de GABA, induzida por glutamato, durante o desenvolvimento de retina embrionária de galinha para avaliar os efeitos da exposição ao ETOH *in ovo*. Embriões de onze dias (E11) foram injetados com tampão fosfato salina (PBS) ou 10% de ETOH diluído em PBS e permaneceram na incubadora durante 5 dias. Retinas de E16, de animais tratados em E11 com ETOH, estimuladas com 2mM de glutamato mostraram um aumento na liberação do [³H] GABA exógeno e GABA endógeno comparado com retinas tratadas com PBS. Os níveis de RNAm para as duas isoformas da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) foram identificados por RT-PCR, assim como a expressão da GAD total, GABA e NR1 por imunohistoquímica. Os níveis de RNAm para GAD65 aumentaram em retinas tratadas com ETOH enquanto a expressão da GAD total, GAT1, GABA e NR1 não foram afetadas pelo tratamento com ETOH. Em culturas densas de retina tratadas com ETOH ou 10mM de GABA, mas não 100µM de baclofen, por 48 horas uma redução na expressão da GAD foi observada. O desenvolvimento de um modelo no qual o embrião de galinha é exposto ao ETOH revela ações plásticas dessa droga na modulação do sistema GABAérgico.

Abstract

Several ethanol (ETOH) actions on GABAergic synapses have been described and more recently a novel neuro-adaptative mechanism was suggested, related to the release of GABA. Having this in mind, we have studied GABA release mediated by glutamate stimulation in the embryonic chick retina upon chronic *in ovo* exposure with ETOH. Eleven day-old chick embryos (E11) were injected once with saline buffer (PBS) or 10% ETOH diluted in PBS. E16 retinas, from animals treated in E11 with ETOH, stimulated with 2mM glutamate showed an increase in the endogenous GABA release or in the [³H] GABA exogenous release compared to PBS treated retina. The mRNA levels of two isoforms of glutamic acid decarboxylase (GAD) were investigated by RT-PCR as well as the protein expression contents of total GAD, GABA and NR1 by immunohistochemistry. Although GAD65 mRNA levels were increased in ETOH treated retina, the protein expression of total GAD, GAT1, GABA and NR1 were not affected by treatment with ETOH. Finally, dense retinal cultures treated with ETOH or 10mM GABA, but not with 100µM baclofen, induced a down-regulation on the GAD enzyme after 48h. In conclusion, we developed a model of intoxication of chick embryo and demonstrated that the chronic exposure to ethanol causes modulation of the GABAergic system.

Abreviações

- AAE** - aminoácidos excitatórios
- ABC** - avidina-biotina peroxidase
- ADH** - álcool desidrogenase
- ALDH** - aldeído desidrogenase
- ALDH 1** - aldeído desidrogenase 1
- ALDH 2** - aldeído desidrogenase 2
- AMPA** - ácido alfa amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4-propionico
- APS** - persulfato de amônia
- BSA** - albumina de soro bovina
- BZ** - benzodiazepínicos
- CACA** - ácido cis-4-aminocrotônico
- CCG** - camada de células ganglionares
- cDNA** - DNA complementar
- CFO** - camada de fibras ópticas
- CYP2E1** - citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídeo 1
- CMF** - solução salina sem cálcio e sem magnésio
- CNI** - camada nuclear interna
- CPE** - camada plexiforme externa
- CPI** - camada nuclear interna
- CTR** - controle
- DAB** - 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto
- DAG** - diacilglicerol
- DMEM** - meio de eagle modificado por dulbecco
- DNQX** - 6,7 - dinitroquinoxalina-2,3-diona
- DTT** - ditioneitol
- EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético
- EPSC** - corrente pós sináptica excitatória
- ETOH** - etanol
- ELISA** - do inglês *enzyme linked immuno sorbent assay*
- GABA** - ácido gama-aminobutírico
- GABA-IR** - imunorreatividade para GABA

GABA+ - GABA positivas
GAD - descarboxilase do ácido glutâmico
GATs - transportadores de GABA
Glu - L- glutamato
GPCR - receptores acoplados a proteína G
GPDH - gliceraldeído 3-fosfato
Hepes - ácido N-2-hidroxietil piperazina-N-2-etanosulfônico
[³H] D-Aspartato - D-aspartato tritiado
[³H] GABA - GABA tritiado
H₂O-DEPC - água tratada com dietil pirocarbonato
HRP - peroxidase
iGluR - receptor ionotrópico de glutamato
InsP₃ - inositol trifosfato
INT - cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazolio
IR - imunorreatividade
KA - ácido caínico
LDH - lactato desidrogenase
LTP - potenciação de longa duração
mGluR - receptor metabotrópico de glutamato
MK801 - dibenzociclohepteneimina
NMDA - N-Metil-D-Aspartato
NMDAR - receptor do tipo NMDA
NR1 - subunidade do receptor NMDA R1
PA - paraformaldeído
PCR - reação em cadeia da polimerase
PBS - tampão fosfato salina
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil
POPOP - 2,2-p-fenilenbis-(5-feniloxazol)
PPO - 2,5 difeniloxazol
RNAm - RNA mensageiro
SAF - síndrome alcoólica fetal
SDS - sódio dodecil sulfato

SNC - sistema nervoso central

TEMED - N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminometano

TF - tampão fosfato

THIP - 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo[5,4-c] piridina-3-ol

TRIS - tris-(hidroximetil)-aminometano

TTBS - tampão tris salina

VGAT - transportador vesicular do GABA

WIN - [R(+)-[2,3-dihidro-5-metil-3-[(morfolinil) metil] pirolol [1,2,3-de]-1,4-benzoxazinil-(1-naftalenil) metanona mesilato]

Sumário

Ficha catalográfica	iv
Agradecimentos.....	v
Resumo.....	viii
Abstract	ix
Abreviações	x
Sumário	xiii
INTRODUÇÃO	1
1. Etanol.....	1
2. Síndrome alcoólica fetal.....	5
3. A retina como modelo experimental	8
4. Sistema glutamatérgico	12
5. Sistema GABAérgico.....	20
6. Liberação de neurotransmissores	26
7. Etanol e sistema glutamatérgico	30
8. Etanol e sistema GABAérgico	32
OBJETIVOS.....	35
MATERIAIS E MÉTODOS	37
1. Materiais	37
1.1. Reagentes.....	37
1.2. Soluções	38
2. Métodos	39
2.1 Administração de ETOH.....	39
2.2 Dissecção das retinas	39
2.3 Determinação da liberação de [³ H] GABA e de [³ H] D-Aspartato.....	39
2.4 Estimulação do tecido retiniano	41
2.5 Fixação e obtenção do tecido	42
2.6 Imunohistoquímica	43
2.7 Contagem de Células.....	44
2.8 Análise de RNAm	45
2.9 <i>Western Blot</i>	47
2.9.1 Obtenção das amostras.....	47
2.9.2 Eletroforese e transferência.....	48
2.10 Cultura densa de células retinianas	50
2.11 Imunocitoquímica em cultura densa de células retinianas	51

2.12 Dosagem de LDH.....	51
RESULTADOS.....	53
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

INTRODUÇÃO

1. Etanol

O ETOH, também chamado de álcool etílico, é uma substância comumente utilizada em bebidas sociais e seus efeitos diferem de acordo com o genótipo, fenótipo e fatores ambientais de cada indivíduo. O ETOH é um depressor do SNC e possui efeitos em comum com outros agentes sedativos, hipnóticos e anestésicos.

Quatro aspectos essenciais devem ser considerados no estudo da cinética do álcool: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. O ETOH é absorvido rapidamente a partir do estômago e intestino e é igualmente distribuído por todo o organismo por difusão simples do sangue nos tecidos, sendo capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica e placenta.

O metabolismo ocorre essencialmente no fígado, por 3 enzimas: a álcool desidrogenase (ADH), a citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e a catalase (Figura 1). Praticamente todo o álcool que se transforma no organismo sofre um processo oxidativo que ocorre em duas fases: na primeira fase a ADH cataliza a oxidação a acetaldeído; em uma segunda fase, a enzima aldeído desidrogenase (ALDH), que possui pelo menos duas variantes (ALDH1 e ALDH2) geneticamente controladas, converte o acetaldeído em ácido acético que é finalmente convertido em dióxido de carbono e água, liberando energia. A CYP2E1 é o principal componente do sistema microsomal hepático de oxidação do ETOH, e a catalase, localizada nos

peroxissomas dos hepatócitos é responsável por apenas cerca de 10% do metabolismo do álcool. Quanto à eliminação, o ETOH é um composto cuja excreção se dá pela respiração, urina e suor.

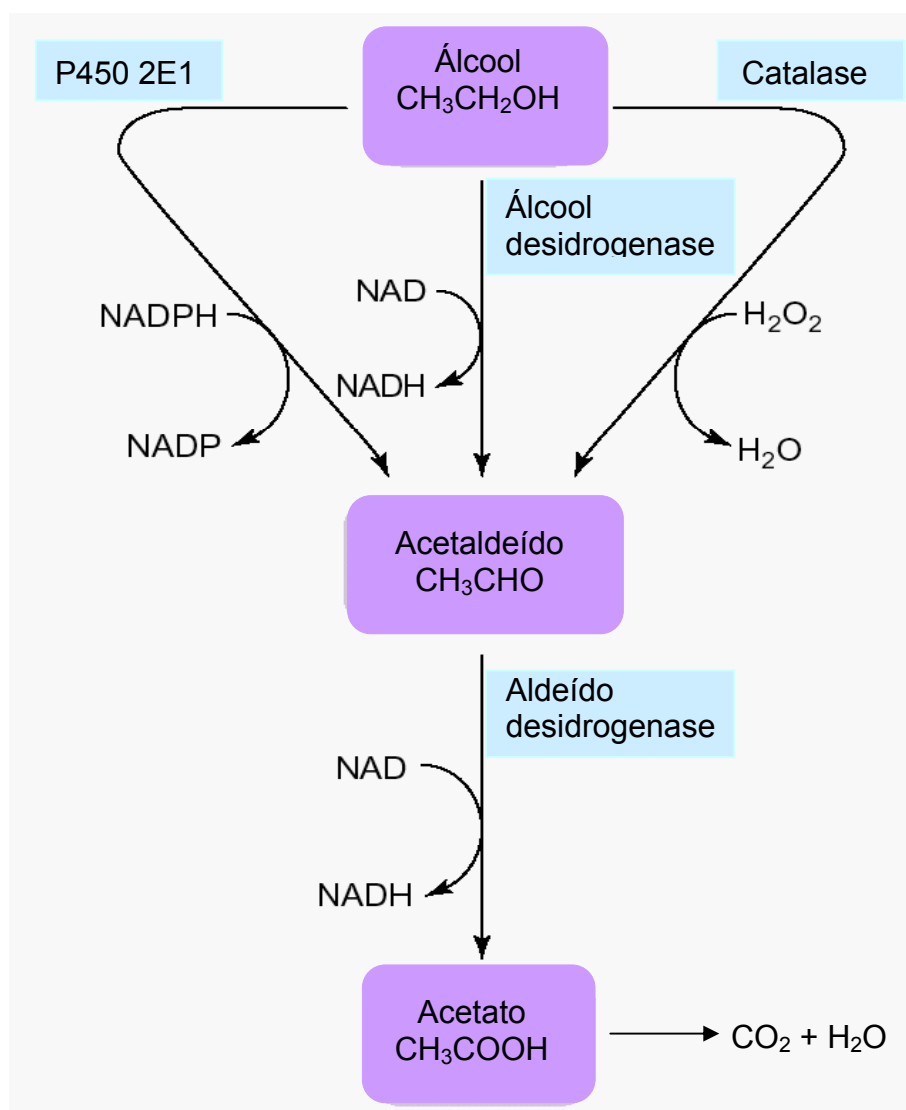


Figura 1. Metabolismo do etanol. O metabolismo ocorre essencialmente no fígado, por 3 enzimas: a álcool desidrogenase (ADH), a P450 2E1 e a catalase. O álcool sofre um processo oxidativo que ocorre em duas fases: na primeira fase a ADH cataliza a oxidação a acetaldeído; em uma segunda fase, a enzima aldeído desidrogenase (ALDH) converte o acetaldeído em ácido acético e este é convertido em CO_2 e H_2O .

Em baixas concentrações sanguíneas, o ETOH causa uma sensação de euforia e desinibição. Quando a concentração sanguínea aumenta, ocorrem alterações motoras e a fala torna-se mais lenta. Em concentrações sanguíneas de ETOH de 20 a 30 mg/dL (4 a 6 mM) pode-se observar um atraso no tempo de reação e alterações no controle motor fino. Um aumento na concentração sanguínea de 200 a 300 mg/dL (43 a 65 mM) resulta em um déficit temporário da capacidade mental e coordenação motora e começam a surgir náuseas e vômitos. Concentrações sanguíneas mais altas que estas podem resultar em coma, e acima de 400 mg/dL, há um potencial enorme de insuficiência respiratória e morte do indivíduo (Grilly, 2002).

Historicamente, as ações do ETOH foram atribuídas a uma alteração não específica da bicamada lipídica das células, resultando numa fluidez da membrana neuronal (Seeman, 1972). Apesar de ser uma substância quimicamente simples, o ETOH apresenta uma farmacologia complexa. Por muitos anos era presumido que o álcool agia somente através de uma depressão geral em funções do cérebro com a desestabilização de membranas neuronais. Isto resultaria em uma alteração inespecífica na transmissão de impulsos elétricos e liberação de neurotransmissores na fenda sináptica.

Há alguns anos foi descrito que o efeito principal do ETOH não era através do rompimento da bicamada lipídica (Peoples e Weight, 1997; Fadda e Rossetti, 1998), mas sobre alvos específicos pós-sinápticos (Peoples e Weight, 1997) através da modificação de enzimas e receptores de neurotransmissores. Mais recentemente, foi descrito a ação do ETOH a nível pré-sináptico, envolvendo a

liberação de neurotransmissores (Roberto *et al.*, 2003, 2004; Criswell e Breese, 2005; Breese *et al.*, 2006). Evidências sugerem que o ETOH pode afetar o SNC nos sistemas de aminoácidos excitatórios e inibitórios (Wite, 2004). Glutamato e aspartato ativam células pré- e pós-sinápticas enquanto GABA e glicina deprimem a atividade dos neurônios, modulando o padrão de atividade neuronal e mantendo a homeostasia do sistema nervoso.

O abuso e a dependência do álcool alteram a função de diversos sistemas de neurotransmissores, incluindo o glutamatérgico (Lovinger *et al.*, 1989; Tsai, 1998; Olney *et al.*, 2001), GABAérgico (Boehm *et al.*, 2006), dopaminérgico (Noble, 2000), serotoninérgico (Lovinger, 1999), colinérgico (Melis *et al.*, 1996) e dos opióides endógenos (Nevo e Hamon, 1995) em diferentes espécies.

O sistema glutamatérgico e o GABAérgico representam mais de 80% dos circuitos neuronais no cérebro dos vertebrados. O glutamato medeia a maior parte da transmissão excitatória, enquanto o GABA é o transmissor inibitório majoritário do cérebro. Alterações na função desses neurotransmissores podem ainda afetar a função dos outros sistemas de neurotransmissores do SNC. Em particular, receptores ionotrópicos do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) e do tipo GABA_A parecem ter um papel central na dependência do álcool e doenças neurológicas induzidas pelo ETOH (Krystal *et al.*, 2003).

A ingestão aguda de álcool altera o equilíbrio da circuitaria neuronal de algumas regiões do SNC (Witte, 2004) através de um processo inibitório exacerbado, enquanto o consumo crônico induz uma neuroadaptação para

contrabalancear a ação inibitória do álcool, provocando ainda neurotoxicidade (Weisse e Porrino, 2002).

Diversos grupos relataram que o sistema glutamatérgico e o GABAérgico são alvos de adaptações no cérebro após exposição crônica ao ETOH (Lovinger *et al.*, 1989; Tsai 1998; Olney *et al.*, 2001; Boehm *et al.*, 2006). Após abstinência ao ETOH, é descrita uma hipofunção de receptores GABA_A e uma potenciação dos receptores do tipo NMDA, os quais são responsáveis pelo aumento da susceptibilidade comportamental na fase de abstinência ao álcool.

A neuroadaptação e outras alterações químicas causadas pelo consumo crônico de ETOH geram déficit cognitivo, tolerância e dependência física que, por sua vez, contribuem para a manutenção do uso da droga. Além disso, o ETOH possui múltiplas conseqüências dose-dependentes, como por exemplo: a Síndrome Alcoólica Fetal, que é um padrão específico de distúrbio em crianças nascidas de mulheres que consumiram bebidas alcoólicas durante a gestação.

2. Síndrome alcoólica fetal

Os efeitos teratogênicos relacionados ao uso de álcool por gestantes causam um padrão específico de malformações no feto, denominado de Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) (Hoyme *et al.*, 2005). A SAF é uma síndrome neurotóxica irreversível caracterizada por anomalias craniofaciais típicas, deficiência de crescimento, disfunções do SNC e várias malformações associadas. O termo "efeitos fetais do álcool" foi proposto para um grupo de crianças expostas ao

álcool intra-útero, mas que não possuíam o quadro clínico completo de SAF (Hanson *et al.*, 1978).

O álcool ingerido pela gestante ultrapassa facilmente a barreira placentária, o que faz com que o feto esteja exposto a concentrações de ETOH próximas ao do sangue materno. Porém, a exposição fetal é maior, devido ao metabolismo e eliminação serem mais lentos, fazendo com que o líquido amniótico permaneça impregnado pelo álcool e por acetaldeído (Chaudhuri, 2000).

Os efeitos do álcool afetam praticamente todos os órgãos e sistemas do feto, mas o mecanismo exato envolvido neste processo ainda é desconhecido. O ETOH e o acetaldeído podem comprometer o desenvolvimento fetal alterando a diferenciação e crescimento celular, síntese protéica e inibindo a migração celular.

Deficiências cardíacas, hepáticas e renais também são comuns, assim como problemas visuais e auditivos. Os indivíduos com esta síndrome têm dificuldades de aprendizado, atenção, memória e resolução de problemas. Acredita-se que o fato da exposição pré-natal ao ETOH envolver tanto iGluRs quanto mGluRs, existiria um grande impacto na LTP interferindo nos processos de aprendizado e memória e no desenvolvimento do SNC embrionário.

A visão é um indicador sensível dos efeitos adversos de agentes tóxicos ambientais e teratogênicos. Modelos experimentais de SAF reproduzem características próximas de SAF humana e isto tem contribuído para o entendimento da base molecular e celular da ação do álcool no desenvolvimento do sistema visual (Stromland e Pinazo-Duran, 2002).

A visão freqüentemente é afetada na Síndrome Alcoólica Fetal (Stromland e Pinazo-Duran, 2002), mas os efeitos do etanol (ETOH) na retina em desenvolvimento são ainda pouco conhecidos. Alguns estudos têm mostrado que o ETOH produz hipoplasia do nervo óptico (Parson *et al.*, 1995; Tufan *et al.*, 2007) e Chmielewski e colaboradores (1997), mostraram que uma única injeção de ETOH *in ovo*, administrada em E6, ou seja, no início da diferenciação celular da retina embrionária de galinha retarda a sinaptogênese na CPI, produzindo uma abundante morte de células ganglionares e uma diminuição de axônios mielínicos.

Existe uma vasta literatura sobre os efeitos do álcool durante o desenvolvimento do SNC cujos efeitos podem ser relacionados com o período em que ocorreu a ingestão alcoólica, com os níveis de álcool circulantes e com o tipo de ingestão, se crônica ou aguda. Esses efeitos variam e podem ser discretos, resultado de uma regulação local sobre sistemas neuroquímicos ou sobre sinapses e até um efeito mais dramático onde observa-se morte neuronal com perda de função.

Os receptores de NMDA ajudam a entender os mecanismos pelo qual o ETOH altera o desenvolvimento do SNC fetal. A transmissão glutamatérgica mediada por receptores de NMDA é essencial para o neurodesenvolvimento. Exposição crônica ao ETOH no período pré-natal e nas primeiras semanas pós-natal inibe a transmissão mediada por receptores de NMDA (Diaz *et al.*, 1997). Através da inibição de receptores de NMDA, o ETOH promove apoptose neuronal pela inibição dos efeitos tróficos do NMDA (Bhave e Hoffman, 1997).

Em resumo, a perda neuronal, devido à exposição crônica ao ETOH, pode não somente explicar o déficit de aprendizado e memória no hipocampo, mas também fornecer uma base neural plausível de dano cognitivo que é freqüentemente encontrado na demência alcóolica. Todos esses estudos demonstram mais uma vez a importância da caracterização dos efeitos do ETOH sobre o desenvolvimento do SNC.

3. A retina como modelo experimental

A retina de pinto é um excelente modelo para estudos da biologia e bioquímica do desenvolvimento neuronal. Originário do neuroectoderma, o tecido retiniano faz parte do SNC e por isto, pode ser considerado como modelo de estudo das interações dos neurônios centrais. Vários neurotransmissores estão presentes na retina de pinto. Entre eles, como no restante do SNC, GABA e glutamato são os mais abundantes tendo papel crucial no processamento e transmissão das informações visuais.

A retina possui uma organização laminar (Dowling, 1987) (Figura 2) composta por três camadas de corpos celulares intercaladas por camadas de plexos, nas quais os axônios e prolongamentos dendríticos de seus neurônios fazem contatos sinápticos entre si. Externamente e adjacente ao epitélio pigmentado do olho, localizam-se os segmentos externos dos fotorreceptores que contém pigmentos visuais responsáveis pela detecção do estímulo luminoso que

será transduzido em sinal neural. Seguem-se os segmentos internos dos fotorreceptores que contém os corpos celulares destes neurônios sensoriais, formando a camada nuclear externa (CNE). Os dois tipos celulares encontrados nesta camada são os cones e os bastonetes que respondem pela visão fotóptica e escotóptica, respectivamente. A primeira refere-se a ambientes com alta intensidade luminosa e a segunda a ambientes com baixa luminosidade (penumbra).

Justaposta a CNE, encontra-se a camada plexiforme externa (CPE), na qual ocorrem os contatos sinápticos entre cones e bastonetes com alguns interneurônios da camada nuclear interna (CNI): células bipolares e horizontais na retina de galinha e, em algumas espécies de animais vertebrados, células interplexiformes. Além das células bipolares e horizontais, os corpos celulares que compõem esta camada nuclear são os das células amácrinas. Logo em seguida a CNI encontra-se a camada plexiforme interna (CPI) (Dowling, 1998), a segunda estação de processamento da informação visual e na qual o sinal neural é transmitido através das células bipolares aos dendritos das células ganglionares, cujos corpos celulares formam a camada de células ganglionares (CCG). Os axônios destas células se organizam em feixes formando a camada de fibras ópticas (CFO) e saem da retina para compor o nervo óptico, conduzindo a informação visual inicialmente processada no tecido retiniano até os centros cerebrais superiores.

Além dos neurônios descritos acima, a retina possui células gliais denominadas de células de Müller, que se encontram radialmente dispostas ao longo de toda a sua espessura e apresentam inúmeras funções, como suporte neuronal e controle do meio extracelular, além de uma dinâmica comunicação bidirecional com os neurônios retinianos (Sarthy e Ripps, 2001).

Culturas de células retinianas de pinto demonstram muitas propriedades neuroquímicas do tecido *in vivo* (Paes-de-Carvalho e de Mello, 1982; Paes-de-Carvalho *et al.*, 1990). GABA e L-glutamato são respectivamente, neurotransmissores inibitório e excitatório que estão distribuídos no SNC. Esses dois compostos atuam na modulação da excitabilidade de células retinianas através da liberação por transportadores de membrana específicos de alta afinidade (do Nascimento e de Mello, 1985). L-glutamato é utilizado como transmissor pelos fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares participando assim da transmissão da informação pela via radial da retina (Barnstable, 1993; Yang, 2004). Em galinha, o GABA está presente nas células horizontais e nas células amácrinas regulando finamente os circuitos retinianos (Barnstable, 1993; Yang, 2004; Calaza *et al.*, 2006a).

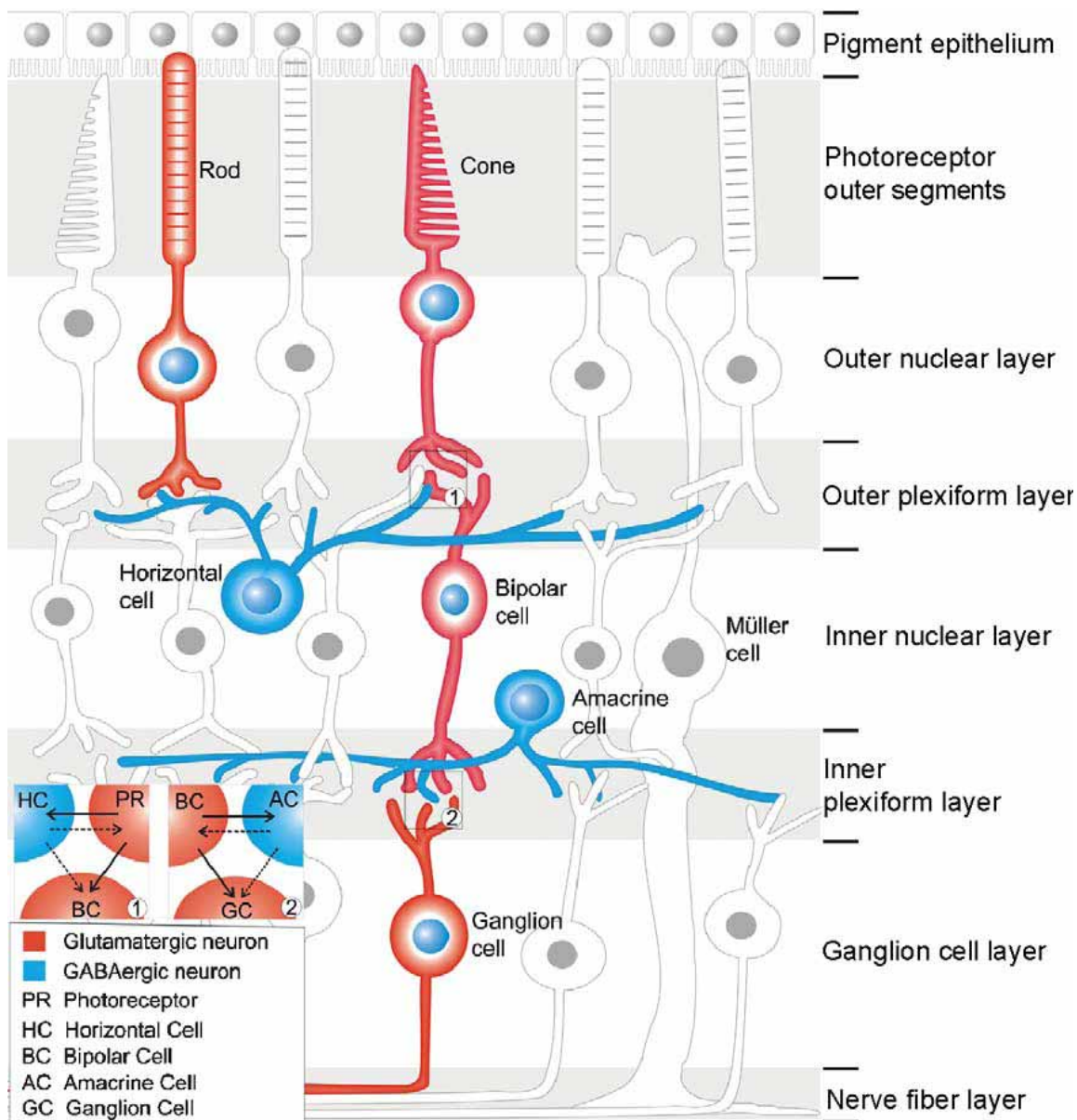


Figura 2. Representação esquemática da retina de vertebrados, evidenciando os tipos celulares e sua organização em camada. Sinais elétricos gerados nos fotorreceptores (cones e bastonetes) são passados através das células bipolares às células ganglionares, que enviam sinais elétricos da retina aos centros visuais superiores. Esse fluxo direto de informação é modulado por células horizontais e amácrinas. Glutamato (excitatório) e GABA (inibitório) são os principais neurotransmissores da retina. Os neurônios glutamatérgicos estão representados em vermelho (fotorreceptores, bipolares e ganglionares) enquanto neurônios GABAérgicos estão representados em azul (horizontais e amácrinas). Células de Müller estão presentes em toda a extensão da retina (Yang, 2004).

4. Sistema glutamatérgico

Os aminoácidos excitatórios desempenham papéis importantes na transmissão sináptica dentro do SNC. Parte dos seus efeitos vem sendo correlacionada a processos de aprendizagem e memória, plasticidade sináptica e a excitotoxicidade mediada pelo excesso da liberação de glutamato promovida pelas células em condições patológicas.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e pode ser sintetizado a partir de várias fontes tais como glicose e glutamina, sendo produto e também substrato para muitas enzimas. Este aminoácido está envolvido na modulação neuronal como agente trófico, migração neuronal, formação de sinapses, controle da diferenciação celular e divisão celular. O glutamato participa da informação da transmissão na via vertical da retina (Yang, 2004) e está amplamente distribuído no SNC. Ele é sintetizado nos terminais nervosos via ciclo de Krebs, sendo estocado em vesículas sinápticas onde é liberado por exocitose dependente de íons cálcio. O término da ação do glutamato no espaço extracelular é realizado via sua recaptação por neurônios e células gliais através de carreadores de alta e baixa afinidade. A energia necessária para o transporte é conseguida através do gradiente eletroquímico de íons sódio.

A Figura 3 representa uma sinapse glutamatérgica, na qual, o glutamato uma vez liberado das vesículas sinápticas poderá atuar em receptores pós-sinápticos ou então ser recaptado. Os receptores glutamatérgicos são divididos em duas grandes famílias, denominados ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos

(mGluR) (Collingridge e Lester, 1989) (Figura 4). Os iGluR são compostos de proteínas com múltiplas subunidades, com estruturas tetraméricas. Diferentes combinações destas subunidades apresentam propriedades cinéticas, farmacológicas e moleculares que definem a sua diversidade funcional. Além disso, as funções dos diferentes tipos de receptores glutamatérgicos são importantes para a transmissão e eficácia sináptica. A família dos iGluR é formada a partir de 4 subunidades que podem ser agrupadas em 3 famílias distintas de acordo com a homologia e característica de ligação dos agonistas. Estas subunidades, por sua vez, formam canais iônicos que na presença do agonista determinará a abertura do poro iônico.

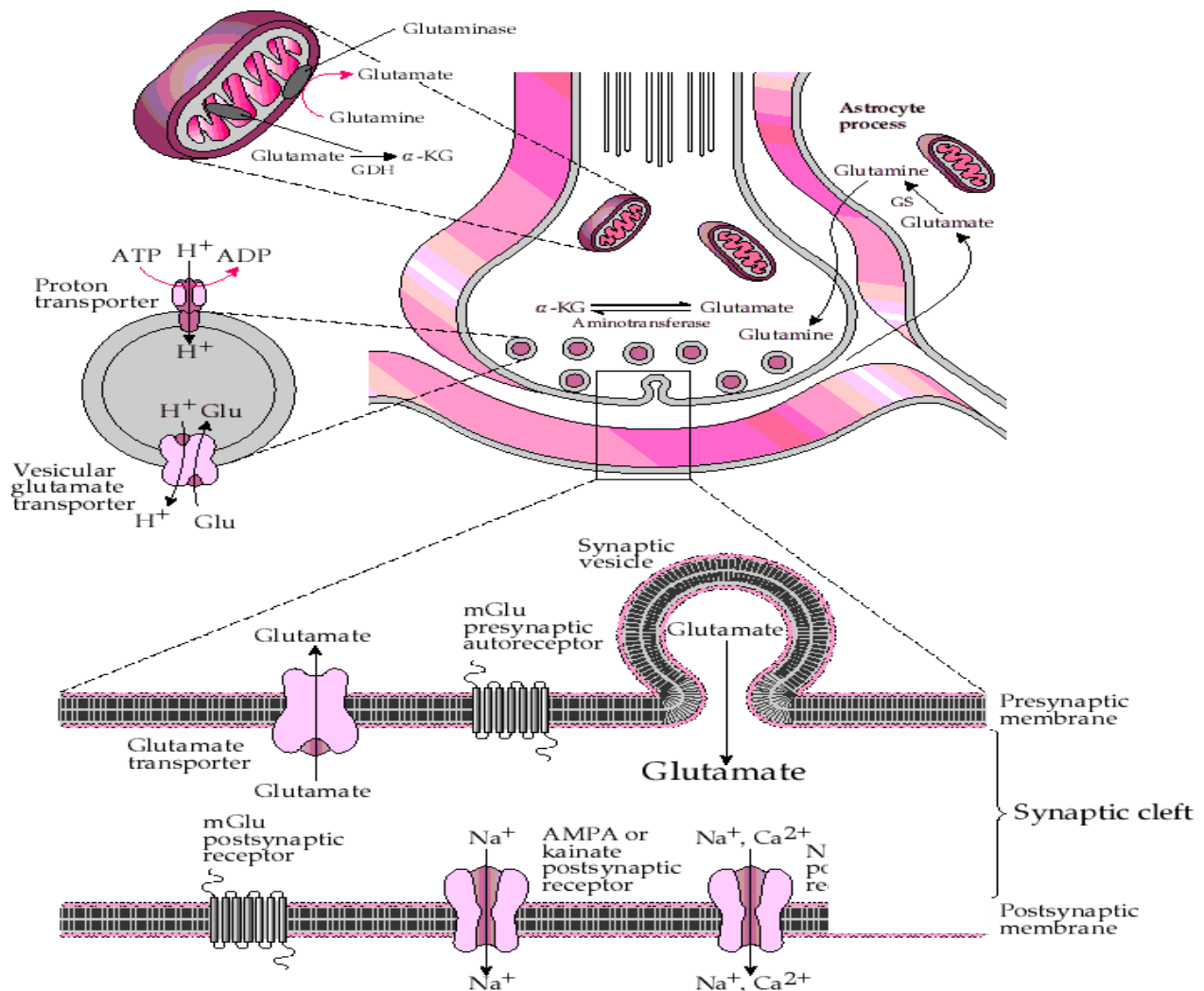


Figura 3. Sinapse Glutamatérgica. Ilustração do processo de síntese e metabolismo do glutamato, captação neuronal e glial de glutamato, captação e liberação vesicular de glutamato. Receptores pré e pós-sinápticos e transportadores do glutamato também são representados (Feldman & Quenzer, 1984).

Atualmente existem três subtipos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos descritos e bem estudados: o receptor do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), do tipo KA (cainato) de alta e baixa afinidade e do tipo AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico)/quisqualato. Devido à semelhança

na seletividade a íons e a superposição de efeitos fisiológicos do KA e do AMPA, os receptores para estes agentes são genericamente denominados de receptores do tipo não-NMDA.

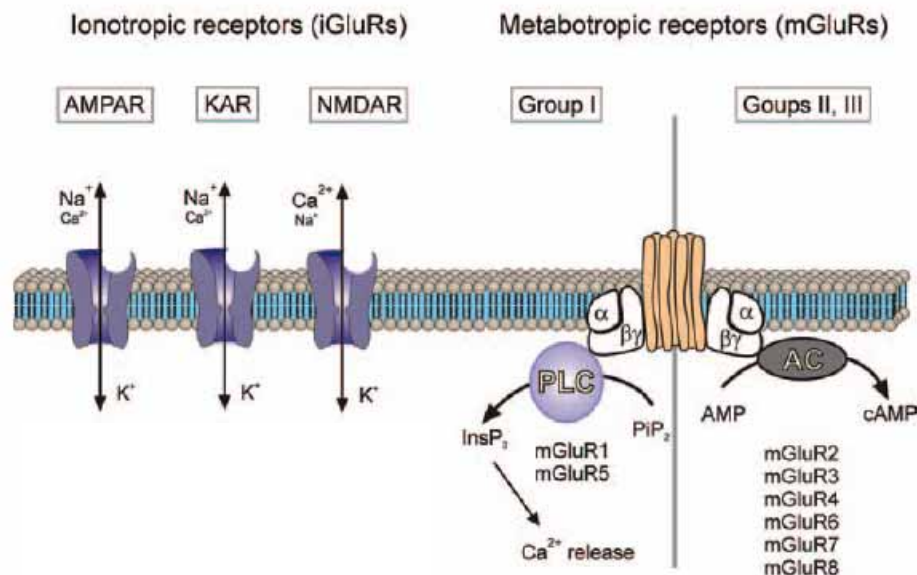


Figura 4. Classes de receptores glutamatérgicos representados por subtipos ionotrópicos de glutamato (iGluR) e metabotrópicos de glutamato (mGluR). Os iGluR são subdivididos em AMPA, KA e NMDA. Receptores AMPA (AMPA) e KA (KAR) são permeáveis ao Na^+ e K^+ , podendo ter uma certa permeabilidade ao Ca^{2+} . Receptores NMDA (NMDAR) são altamente permeáveis ao Ca^{2+} . Os mGluR são acoplados a segundos mensageiros representados pela cascata da InsP_3/DAG (mGluRs do Grupo I, ligado a fosfolipase C (PLC) e cascata do cAMP (mGluRs dos grupos II e III, ligados a adenilciclase (AC)). InsP_3 - inositol trifosfato. (modificado de Verkhratsky e Kirchhoff, 2007).

Os receptores do tipo NMDA (Figura 5) são proteínas oligoméricas formadas por diversas subunidades e formam canais iônicos sensíveis à voltagem, sendo permeáveis ao cálcio e a cátions monovalentes (Na^+ e K^+), possuindo sítios de reconhecimento para ligantes fora do canal (glutamato/aspartato, glicina/D-serina, poliaminas e íons zinco) e dentro do canal (íons magnésio e um sítio onde

fenciclicos se ligam). Cada um destes sítios desempenha um papel específico na regulação da permeabilidade iônica do canal.

Uma das características mais importantes do receptor do tipo NMDA é que este só pode ser ativado em condições fisiológicas normais mediante uma pré-despolarização da membrana. Esta condição é necessária porque o canal do receptor de NMDA é estritamente controlado pelos íons magnésio. Sob concentrações fisiológicas o receptor fica completamente inativo devido à ocupação do sítio de magnésio no lúmen do canal. Devido a esta peculiaridade, a pré-despolarização da célula pode ser feita por estimulação simultânea do glutamato nos receptores do tipo não-NMDA na mesma célula alvo, ou por outros estímulos despolarizantes. Uma das conseqüências mais importantes discutidas a respeito deste bloqueio seria a presença de um mecanismo protetor intrínseco da célula prevenindo a entrada excessiva de íons cálcio na célula, o que causaria efeitos neurotóxicos (Deupree *et al.*, 1996). A resposta de receptores do tipo-NMDA resulta na entrada de grande quantidade de Ca^{+2} que é importante em processos de plasticidade sináptica, como a memória e aprendizagem (Jensen e Lisman, 1996).

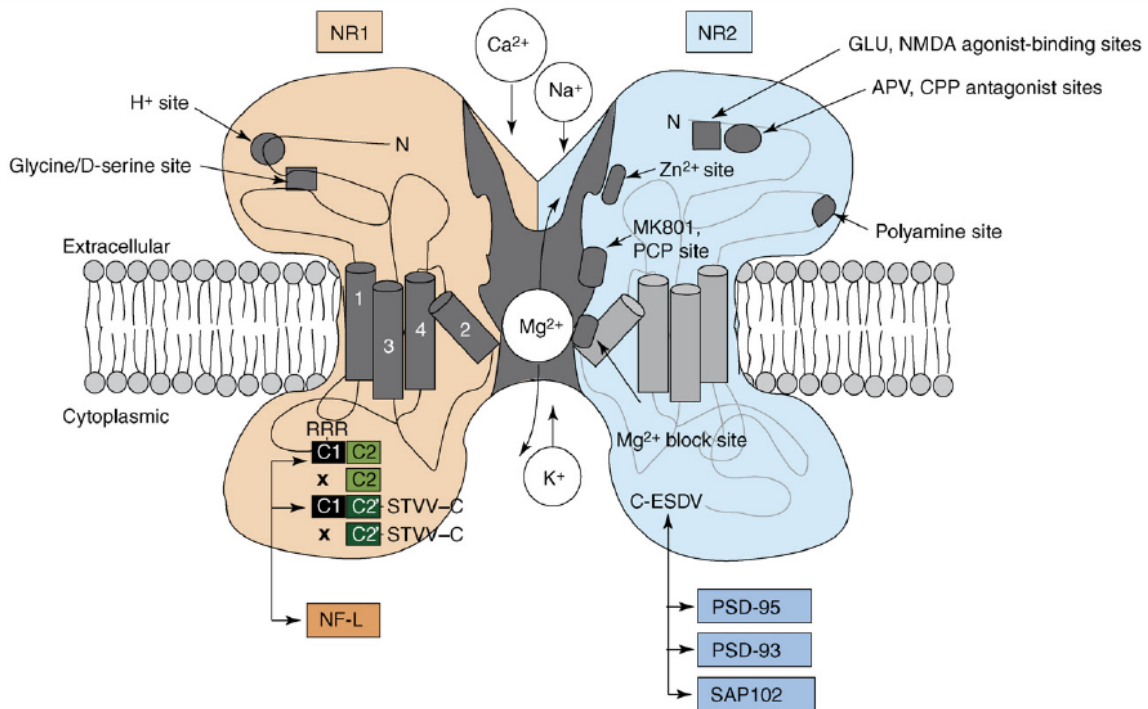


Figura 5. Organização do receptor de NMDA com suas estruturas terciárias para as subunidades NR1 e NR2, demonstrando o sítio de ligação N-terminal para os agonistas glicina/D-serina, bem como os sítios de ligação para moduladores endógenos e ligantes exógenos (Kristiansen *et al.*, 2007).

Em paralelo aos efeitos inibitórios promovidos pelos sítios dos íons zinco e magnésio, dois outros sítios distintos se destacam promovendo a ativação do canal que são o das poliaminas e o de glicina/D-serina. Embora nenhum destes dois sítios afete isoladamente a abertura do canal, ambos potenciam a resposta do receptor de NMDA caracterizando um efeito co-agonístico e facilitatório (Lerma, 1992).

O inibidor mais potente não-competitivo descrito para o canal de NMDA é o composto denominado MK 801 (dibenzociclohepteneimina) (Kemp *et al.*, 1987).

Existem ainda outros compostos que antagonizam a resposta do receptor NMDA, dentre eles estão o AP5 (ácido 2-aminofosfonovalérico) ou APV e o AP7 (ácido 2-amino 7-fosfonoheptanóico). Em 1988, Honoré e colaboradores, descreveram antagonistas competitivos para o receptor glutamatérgico do tipo não-NMDA. Estes antagonistas são análogos do ácido quinurênico, CNQX e DNQX, que fazem parte das quinoxalinas.

Os receptores ionotrópicos apresentam uma distribuição diferenciada dentro do SNC. Receptores do tipo AMPA se localizam principalmente em regiões telencefálicas, como na área CA1 do hipocampo, caudato, putamen e amígdala, apresentando alto grau de co-localização com os receptores do subtipo NMDA (Cotman *et al.*, 1987). Esta incidência de distribuição sugere que os dois subtipos de receptores glutamatérgicos atuem em conjunto, o que corrobora à idéia de que o canal de NMDA para ser ativado necessita de uma pré-despolarização rápida, permitindo a retirada dos íons magnésio do lúmen do canal.

Na retina de rato os receptores NMDA localizam-se particularmente na CPI e possuem um importante papel na transmissão sináptica da retina (Fletcher *et al.*, 2000). Ambos os receptores AMPA e NMDA estão localizados pós-sinápticamente, sendo que os receptores AMPA estão relacionados com o componente rápido da corrente pós-sináptica excitatória (EPSC) enquanto os receptores NMDA estão relacionados com o componente lento da EPSC. A função dos receptores de KA na transmissão sináptica ainda não está esclarecida, mas eles encontram-se localizados pré-sinápticamente podendo regular a liberação de neurotransmissores (Cunha *et al.*, 1997; Kamiya, 2002).

Os receptores do tipo NMDA são formados por 4 subunidades que podem ser NR1, NR2A-D, NR3A e B, os quais são produtos de genes diferentes. Há oito subunidades funcionais de NR1 e uma variante não-funcional (McBain e Mayer, 1994), sendo que, para ser funcional deve conter pelo menos uma subunidade NR1 juntamente com uma ou mais subunidades NR2 ou com ambas NR2 e NR3. A subunidade NR1 contém o sítio de potencialização pelo co-agonista glicina/D-serina e é crucial para formação de um receptor funcional. Por outro lado a subunidade NR2 contém o sítio de interação para o glutamato e modula as propriedades do canal (Monyer *et al.*, 1994) sendo expressa diferentemente em diversas regiões do SNC. A família da subunidade NR3 tem sido descrita, mas sua função ainda não está bem definida (Chatterton *et al.*, 2002). Recentemente foi descrita uma função para a subunidade NR3 que seria de regulação da atividade das subunidades heteroméricas NR1/NR2 (Das *et al.*, 1998).

A expressão de subunidades de receptores do tipo NMDA tem sido estudada em retina de mamíferos utilizando-se hibridização *in situ* de mRNA (Watanabe *et al.*, 1994) e imunohistoquímica (Fletcher *et al.*, 2000; Gründer *et al.*, 2000). O padrão de marcação da expressão para NR1 encontra-se em neurônios da CNI e na CCG, enquanto a distribuição dos transcritos para subunidade NR2 (A-D) foi observada na CCG. NR2B tem sido identificada em células horizontais e CCG; e NR2C está presente em células bipolares e glia de Müller (Gründer *et al.*, 2000). A subunidade NR1 encontra-se na maioria dos neurônios centrais. Há duas variantes de NR1, NR1A e NR1B. A isoforma NR1A está presente na maioria dos receptores de NMDA e a variante NR1B está presente no córtex e no *giro dentado*

do hipocampo (Meoni *et al.*, 1998). As subunidades NR2 são glicoproteínas que apresentam perfis específicos no cérebro em desenvolvimento (Laurie *et al.*, 1997). As subunidades NR2A-D e 3A mostram um padrão distinto de expressão em cérebro de mamíferos, sugerindo que a composição de receptores NMDA é única para cada região do cérebro (Rafiki *et al.*, 2000).

Os mGluR pertencem à superfamília dos receptores acoplados a proteína G (GPCR), mas eles possuem pequena similaridade estrutural com outros membros desta família. Enquanto os iGluRs atuam nas respostas glutamatérgicas excitatórias rápidas, o mGluRs atuam nas respostas lentas via acoplamento a vias de sinalização intracelulares.

A família de mGluRs (Figura 3) consiste de oito subtipos de receptores que são classificados em três diferentes subclasses, baseados na seqüência de homologia, acoplamento a segundos mensageiros e farmacologia (Meldrum, 2000).

5. Sistema GABAérgico

A neurotransmissão inibitória no SNC é mediada principalmente pelos neurotransmissores GABA e glicina. A glicina é utilizada predominantemente na medula e no tronco cerebral enquanto o GABA é encontrado predominantemente no cérebro. A síntese e liberação de GABA no SNC é um processo altamente regulado, podendo ser estimulado ou suprimido por manipulações fisiológicas e

farmacológicas, através de mecanismos regulatórios que, em condições normais, mantêm o GABA em níveis constantes.

O GABA é um aminoácido, que assim como o glutamato, também participa da modulação neuronal como agente trófico, crescimento neurítico, formação das sinapses, direcionamento dos prolongamentos neurais, divisão celular e expressão gênica, além de participar do processamento lateral da informação na retina. O GABA é sintetizado em duas regiões distintas do neurônio: (1) nos terminais nervosos ou (2) no soma e dendritos. Nos terminais sinápticos, a regulação de GABA seria responsável pela manutenção dos níveis do neurotransmissor frente à demanda causada pela atividade neuronal, enquanto em regiões não sinápticas, a regulação estaria ligada às necessidades do metabolismo energético do neurônio ou a liberação não sináptica do GABA (Kanaani, *et al.* 1999).

A via clássica de síntese do GABA é mediada pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) que sintetiza o GABA a partir da remoção do grupo carboxila do glutamato. Dessa forma, a concentração de glutamato no SNC é determinada pelo balanço de fluxos metabólicos e, no final, irá regular a síntese de GABA.

Há duas isoformas bem caracterizadas da GAD, uma com 65 kDa e outra com 67 kDa, as quais são codificadas por 2 genes distintos (Martin e Rimvall, 1993). As duas formas diferem em suas propriedades cinéticas (Martin e Rimvall, 1993) e na distribuição intracelular (Kanaani *et al.*, 1999).

A GAD67 é uma proteína solúvel e está distribuída no soma da célula, enquanto a GAD65 está concentrada nos terminais nervosos associados a vesículas sinápticas (Kanaani *et al.*, 1999). A distribuição preferencial da GAD65 nos terminais nervosos e sua associação com vesículas sinápticas sugerem que ela esteja envolvida com a síntese do GABA vesicular que será usado pela sinapse GABAérgica (Figura 6) (Sheikh e Martin, 1996). Por outro lado, a distribuição, principalmente citoplasmática, da GAD67, sugere que ela seja responsável pela síntese de um GABA não-sináptico, mas sim metabólico (Soghomonian e Martin, 1998; Waagepetersen *et al.*, 1999), ou de um “pool” de GABA utilizado para liberação não-vesicular (Andrade da Costa, *et al.*, 2000).

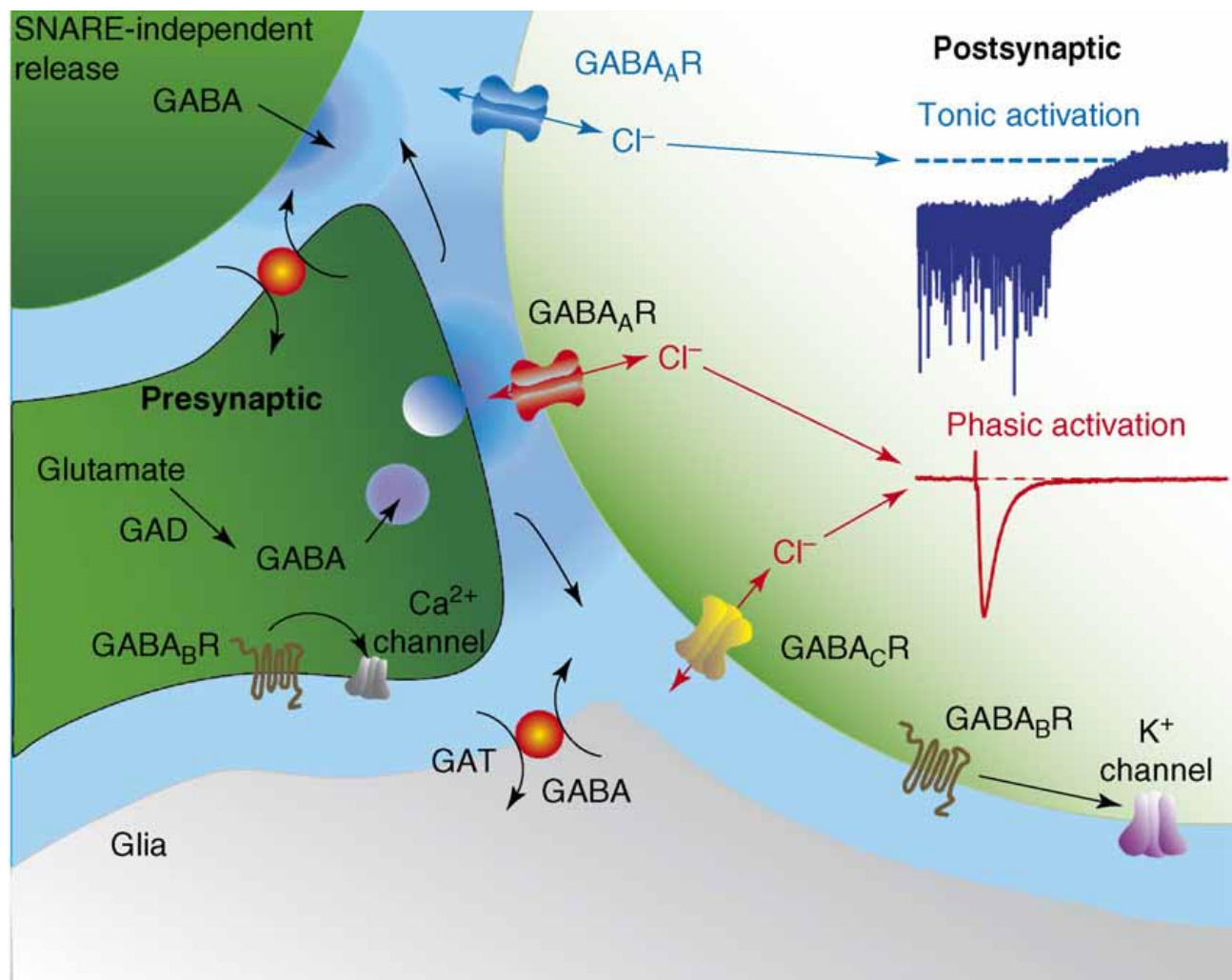


Figura 6. Sinapse GABAérgica. Ilustração do processo e síntese do GABA, captação neuronal e glial do GABA, captação e liberação vesicular do GABA. Receptores pré e pós-sinápticos e transportadores do GABA também estão representados (Ge *et al.*, 2007).

Na retina de galinha a expressão de GAD pode ser observada a partir de E10 (Hokoç *et al.*, 1990) e embora ambas as isoformas GAD65 e GAD67 estejam presentes no tecido neural adulto, na retina de primata, elas apresentam expressão temporal distinta, com a marcação para GAD67 sendo anterior a da GAD65 (Hendrickson e Erickson, 1993).

Na retina de galinha, o aparecimento de GABA é precoce (E6), quando a atividade e a expressão de GAD (E10) ainda não são detectadas, indicando que, em períodos iniciais do desenvolvimento, o GABA possa estar sendo sintetizado por vias alternativas. Numa dessas vias não clássicas, o GABA tem como precursor a putrescina, cuja síntese é mediada pela ornitina descarboxilase (de Mello *et al.*, 1976; Hokoç *et al.*, 1990).

Na retina de galinha, o GABA é encontrado em células amácrinas, horizontais e em células na CCG (Barnstable, 1993). A GAD por sua vez é encontrada exclusivamente em células amácrinas e horizontais GABAérgicas (Hokoç *et al.*, 1990).

O sistema GABAérgico é comprometido em várias doenças que acometem o SNC, tais como a epilepsia, esquizofrenia e a doença de Huntington e entre os moduladores mais comuns de seus receptores encontram-se os benzodiazepínicos (BZ), barbitúricos e o álcool. Os receptores GABAérgicos também são alvos de diversos medicamentos, incluindo agentes anticonvulsivantes, ansiolíticos, sedativos, hipnóticos, relaxantes musculares e anestésicos (Jentsch *et al.*, 2002).

Assim como os receptores glutamatérgicos, os receptores GABAérgicos também são classificados como receptores ionotrópicos e metabotrópicos, sendo GABA_A e GABA_C receptores ionotrópicos e GABA_B um receptor metabotrópico.

O GABA_A (Figura 7) foi o primeiro receptor GABAérgico identificado e suas primeiras subunidades clonadas foram as α_1 e β_1 (Schofield *et al.*, 1987). O

receptor apresenta um canal de cloreto hetero-oligomérico seletivamente bloqueado pelo alcalóide bicuculina e modulado por esteróides, barbitúricos, BZ, penicilina, picrotoxina e álcool (McKernan e Whiting, 1996). Estruturalmente, é uma glicoproteína hetero-pentamérica composta pela combinação de cinco entre dezesseis subunidades polipeptídicas de sete classes diferentes (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π e θ) e com massa molecular de 230-270 kDa (Jentsch *et al.*, 2002). A ligação do GABA é feita em sítios entre as subunidades alfa e beta (Siegel *et al.*, 1999). O arranjo dessas subunidades poderia levar a milhares de combinações pentaméricas de subunidades, mas um receptor GABA_A funcional precisa de pelo menos uma subunidade α e uma β , o que reduz o número de combinações (Pritchett *et al.*, 1989). Foram identificadas também, duas subunidades (β_4 , γ_4) do receptor GABA_A no cérebro de galinha (Bateson *et al.*, 1991).

O canal de Cl⁻ é formado pelo conjunto das diversas subunidades e seus diferentes arranjos vão determinar as características elétricas e estruturais. Portanto, como consequência da expressão gênica das diferentes subunidades, existe uma considerável diversidade de receptores GABA_A. Cada um desses receptores compostos por combinações diferentes de subunidades, apresenta diferenças em sua sensibilidade ao GABA e às drogas que modulam a transmissão GABAérgica. Esta diversidade segue um padrão de expressão temporal e espacial em diversas regiões do SNC e diferentes combinações são expressas em estágios distintos do desenvolvimento, o que provavelmente reflete as diferentes necessidades fisiológicas do SNC (Luddens *et al.*, 1995).

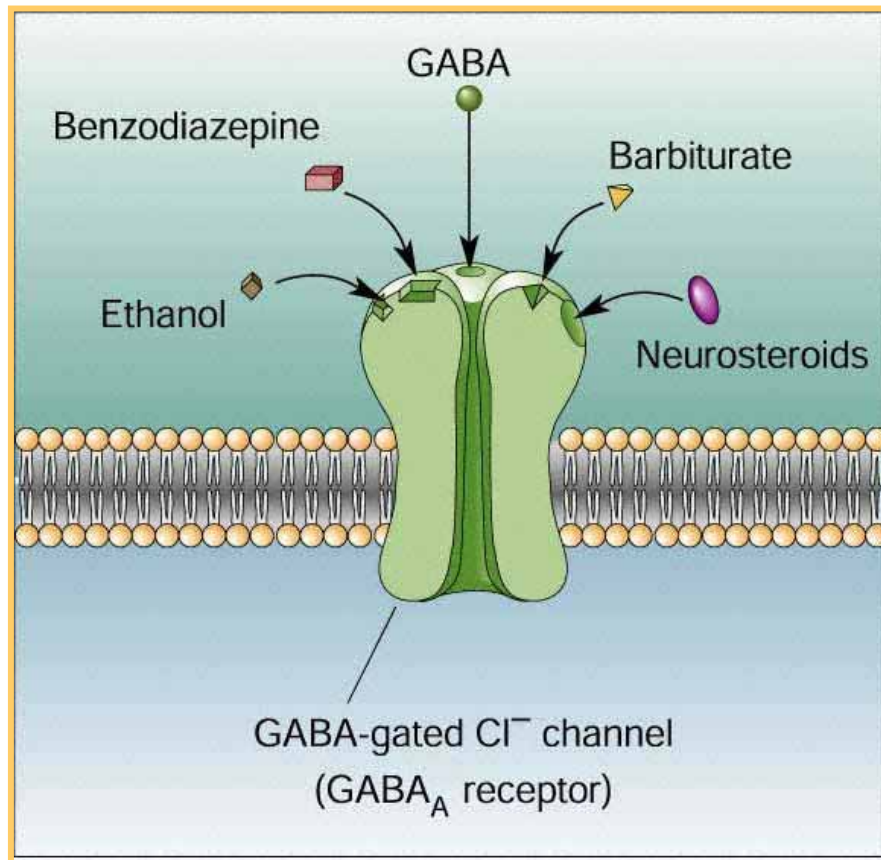


Figura 7. Organização do receptor $GABA_A$. Representação esquemática do receptor $GABA_A$ com suas subunidades demonstrando os diferentes sítios de ligação para ligantes exógenos (Bear *et al.*, 1996).

6. Liberação de neurotransmissores

Na retina, assim como em qualquer outra estrutura do SNC, os sistemas de sinalização e os mecanismos para transmissão de mensagens intercelulares são realizados através de contatos especializados denominados sinapses, que podem ser elétricas ou químicas.

Em geral, a transmissão de um impulso nervoso através das sinapses químicas é resultado da chegada de um potencial de ação a um terminal pré-sináptico, que determina a liberação de neurotransmissores, substâncias sintetizadas e liberadas pelo terminal pré-sináptico que se difundem através da fenda sináptica, ligando-se a receptores específicos e que são posteriormente inativados por recaptação neural ou por degradação enzimática.

A liberação clássica de neurotransmissores é realizada por exocitose que é mediada pelo influxo de íons cálcio. Contudo, existem vários exemplos nos quais os transmissores podem ser liberados sem requerer a presença de Ca^{+2} extracelular, como por exemplo, através da reversão dos transportadores específicos da membrana pré-sináptica (Bernath, 1992).

A interação das moléculas transmissoras com receptores específicos situados na membrana da célula alvo, que pode ser um neurônio adjacente, uma célula glial ou o próprio neurônio pré-sináptico (autorreceptores), determina a ocorrência de efeitos e por último, a passagem da informação. Esta ligação com o receptor pode provocar alterações elétricas pela abertura de canais iônicos ou ativar vias de sinalização intracelulares através da ação de mensageiros secundários.

A maioria dos neurônios retinianos liberam em seus terminais pré-sinápticos mais de uma substância fisiologicamente ativa. A ativação de receptores induz a liberação de substâncias neuroativas como: glicina (Bernath, 1992), dopamina (Gustincich, *et al.*, 1997) e GABA em retinas de várias espécies (Tapia e Arias,

1982; Hofmann e Mockel, 1991; López-Costa, *et al.*, 1999), entre outros mediadores químicos.

A liberação de GABA no SNC ocorre basicamente através de dois mecanismos distintos. Um requer a entrada de cálcio durante a despolarização e provavelmente ocorre através da exocitose. O outro responde à despolarização, mas necessita de sódio, sendo realizado por transportadores de membrana (Calaza *et al.*, 2006b). A liberação de neurotransmissores por carreadores de membrana é explicada através de um mecanismo de reversão do próprio transportador, visto que estes carreadores são dependentes de voltagem e do gradiente iônico que pode ser de sódio, cloreto, entre outros. A entrada de sódio, por exemplo para os transportadores de GABA, inverte o sentido do fluxo do neurotransmissor e permite a liberação de estoques endógenos.

O término da ação do GABA depende de transportadores de membrana presentes no terminal pré-sináptico neuronal e/ou em células gliais (Kanner, 1994). A captação da maioria do GABA é realizada por transportadores gliais que exercem uma ação modulatória em diversas atividades de sinapses GABAérgicas constituindo alvos potenciais para aplicações terapêuticas (Borden, 1996; Schousboe, 2000). Há 4 tipos de transportadores de GABA (GAT1-4). Entretanto, a nomenclatura relacionada aos GATs pode ser confusa dependendo da espécie estudada. Como discutido por Wu e colaboradores (2006), GAT1 é o mesmo para camundongo, rato e humano. GAT2 em camundongo é denominado de BGT1. GAT3 em camundongo é relatado ser GAT2 em rato e humano. Finalmente, GAT4 em camundongo é relatado ser GAT3 em rato.

A influência do potencial de membrana sobre o mecanismo de liberação de GABA começou a ser melhor investigada a partir das observações de Blaustein e King (1976) que perceberam que a recaptação do neurotransmissor ocorre em função de um gradiente eletroquímico de sódio. Trabalhos posteriores demonstraram que a liberação de GABA poderia ser estimulada pela adição extracelular de potássio, GABA ou glutamato. Estes efeitos poderiam ser explicados através da liberação de GABA mediada por um carreador ativado por despolarização, ou por uma homotroca, quando o estímulo era realizado com GABA exógeno (Schwartz, 1982).

Em 1985, do Nascimento e de Mello, utilizando culturas mistas (neurônio e glia) de retina de galinha, verificaram que a liberação de [³H] GABA induzida por baixas concentrações de L-glutamato era dependente de íons sódio e independente da presença de cálcio no meio extracelular.

Nas últimas três décadas diversos autores investigaram o padrão de conteúdo de GABA nos neurônios e os mecanismos de liberação em diferentes partes do SNC, inclusive na retina. A maioria dos estudos relacionados com a liberação de GABA foi relatada com técnicas de perfusão usando radiomarcagem com GABA, usualmente trítio. Entretanto, esta técnica não leva em consideração os tipos de células ou a circuitaria envolvida na atividade GABAérgica do tecido retiniano. Nos últimos anos, alguns autores usaram uma estratégia, que utiliza metodologia farmacológica juntamente com imunohistoquímica, na qual é permitido estudar a liberação de GABA endógeno a partir de diferentes populações de

células da retina *in situ* (Andrade da Costa *et al.*, 2000, 2001; Calaza *et al.*, 2001, 2003, 2006a).

7. Etanol e sistema glutamatérgico

Novos conceitos sobre as ações específicas do ETOH nos sistemas excitatórios e inibitório têm sido relatados. Considerando os receptores glutamatérgicos, Hoffman e Tabakoff (1993) observaram que o ETOH é um potente e seletivo inibidor dos receptores NMDA e poderia exercer sua ação inibitória através do decaimento da frequência de abertura de canais iônicos.

Nenhum sítio específico de ação para o ETOH em receptores de NMDA foi encontrado até o momento. Estudos eletrofisiológicos, utilizando a técnica de *patch-clamp* em ovócitos de *Xenopus*, mostraram a interação direta da proteína com o ETOH em receptores NMDA (Wright *et al.*, 1996). Trabalhos sugerem que o ETOH pode interagir com um sítio alostérico reduzindo a eficácia do agonista pela modulação da cinética de ligação ao canal (Wright *et al.*, 1996). Isso afetaria a cinética de abertura e o fechamento do canal (Crews *et al.*, 1996). Diversos estudos sugerem que o ETOH pode atuar no sítio da glicina/D-serina dos receptores ionotrópicos do tipo NMDA (Kemp e Leeson, 1993; Mothet *et al.*, 2000).

O ETOH também pode levar a diminuição de glutamato extracelular no cérebro de animais, pela diminuição de sua liberação pré-sináptica (Yan *et al.*, 1998). Neste caso, o ETOH poderia afetar a transmissão pré-sináptica através da alteração dos níveis extracelulares de glutamato. Já foi previamente descrito este

tipo de ação do NMDA inibindo a liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos (Sequeira *et al.*, 2001).

Vários estudos de *binding* evidenciaram que, após a administração crônica de ETOH em cultura de células ou abuso crônico de ETOH, há um aumento do número de receptores do glutamato, mas nenhuma mudança na sua afinidade (Hoffman, 1995; Freund e Anderson, 1996). Já outros achados sugerem uma complexa alteração da função do receptor NMDA em neurônios em cultura tratados com ETOH, que pode envolver outras mudanças, além de um aumento na densidade dos receptores, como, por exemplo, via liberação de glutamato nos terminais pré-sinápticos (Lovinger, 1993).

Em baixas doses, o ETOH está associado com o aumento da atividade motora e em altas doses causa uma diminuição na atividade seguida de sedação e hipnose, devido à inibição do sistema glutamatérgico. Efeitos agudos do ETOH interrompem a transmissão glutamatérgica pela inibição da resposta de receptores NMDA (Hoffman *et al.*, 1989).

O ETOH, em concentrações correspondentes àquelas encontradas no sangue após ingestão moderada, reduz a atividade da corrente iônica de receptores NMDA e diminui a ligação específica de glutamato no córtex e no hipocampo, agindo como um antagonista de NMDA (Kozlowski *et al.*, 1997).

Em roedores, a exposição crônica ao ETOH leva a um aumento na expressão de RNAm (Follesa e Ticku, 1995) e de subunidades de receptores do tipo NMDA em áreas cerebrais (Hoffman *et al.*, 1990; Hoffman e Tabakoff, 1996), mas nem sempre o aumento da expressão do RNAm de alguma subunidade vem

acompanhado do aumento de sua respectiva proteína. Tem sido relatado também que a ingestão crônica de ETOH resulta em um aumento da expressão da subunidade NR1 no hipocampo e no cerebelo, além de um aumento da subunidade NR2A no hipocampo e no córtex (Snell *et al.*, 1996). O ETOH aumenta ainda a expressão de RNAm de NR2B e aumenta os níveis da subunidade NR1 através de modulação pós-transcricional (Kumari e Ticku, 1998).

O consumo crônico de bebidas alcoólicas provoca um aumento na densidade dos receptores de NMDA. Com a remoção da droga, em consequência desse aumento, ocorre uma resposta aumentada ao neurotransmissor liberado. Acontece, portanto, uma hiperatividade de receptores NMDA, responsáveis pelo aparecimento das crises convulsivas características do período de abstinência e possivelmente também pela morte neuronal (Witte, 2004).

Enfim, a exposição prolongada ao ETOH leva a muitas adaptações neuronais através de mudanças na cascata de sinalização na célula, sendo um de seus alvos, a inibição de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

8. Etanol e sistema GABAérgico

A maioria dos estudos sobre os efeitos do ETOH tem focado no receptor GABA_A. Recentemente foram identificadas subunidades de receptores GABA_A recombinantes sensíveis a baixas concentrações de ETOH (Sundstrom-Poromaa *et al.*, 2002; Wallner *et al.*, 2003). Poucos estudos têm investigado a expressão de transportadores de GABA (GATs). É descrito que tratamentos agudo e crônico

com ETOH provoca uma indução do GAT1 em cérebro de ratos adultos (Hu *et al.*, 2004). Além disso, o ETOH induz um aumento da GAD67 e do transportador vesicular do GABA (VGAT) em culturas de córtex cerebral de ratos embrionários (Zink e Spanagel, 2005).

É descrito que a atividade glutamatérgica mediada por NMDA pode regular a expressão da subunidade dos receptores de GABA_A (Matthews *et al.*, 2000). Entretanto, a alteração na função GABAérgica, precedida pela exposição crônica ao ETOH, pode ser uma resposta compensatória secundária a mudanças na transmissão glutamatérgica (Fadda e Rossetti, 1998).

Há trabalhos demonstrando que o ETOH pode potenciar receptores GABA_A (Aguayo e Pancetti, 1994; Weiner *et al.*, 1994). Porém, outros estudos não relatam o mesmo (Shefner, 1990). Estas discrepâncias provavelmente resultam de diferenças na composição das subunidades dos receptores em várias regiões cerebrais (Grobin *et al.*, 2000). Enquanto a exposição aguda ao ETOH potencia a transmissão GABAérgica, o tratamento crônico pode reduzir o número ou a função dos receptores, levando a tolerância, dependência e síndrome de abstinência ao ETOH (Lovinger, 1993). De fato, a exposição crônica ao ETOH altera a expressão de subunidades do receptor GABA_A levando a redução da densidade de receptores, o que durante a remoção do ETOH contribui para aumentar a excitabilidade neuronal (Montpied *et al.*, 1991).

O aumento de excitabilidade do SNC deve-se, também, à hipoatividade GABAérgica. No período de abstinência do álcool, receptores GABAérgicos

deixam de exercer sua atividade inibitória, especialmente através de receptores GABA_A.

Alguns autores demonstraram que o ETOH aumenta a liberação de GABA (Roberto *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2000, Criswell e Breese, 2005; Breese *et al.*, 2006). Entretanto, o ETOH também pode inibir a liberação de GABA e de outros neurotransmissores em diferentes regiões do cérebro (Fink e Gothert, 1996), Dessa forma, o efeito do ETOH sobre a liberação do GABA é ainda assunto complexo e controverso, pois envolve diversas variáveis como: modelo experimental, estágio do desenvolvimento, região estudada, condições *in vivo* ou *in vitro* e ainda, dose e duração da exposição ao ETOH.

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo geral estudar os efeitos do ETOH em retina de embrião de galinha com 16 dias (E16) injetado *in ovo* em embriões de galinha com 11 dias (E11), um período no qual as sinapses estão sendo elaboradas na retina embrionária.

Estudamos o efeito do ETOH na modulação da liberação de [³H] GABA exógeno e GABA endógeno, induzida por AAE, e os possíveis mediadores envolvidos nesta modulação. Com base em trabalhos que sugerem a possibilidade do ETOH aumentar a liberação de GABA (Roberto *et al.*, 2003, 2004; Criswell e Breese, 2005; Breese *et al.*, 2006), decidimos avaliar a modulação da liberação de GABA em células retinianas embrionárias de galinha, mediante tratamento com ETOH. Os pontos específicos analisados neste estudo foram:

- 1) Verificar a liberação de [³H] GABA e [³H] D-Aspartato exógeno, induzida por glutamato, no tecido retiniano de embriões tratados com ETOH.
- 2) Verificar a liberação de GABA endógeno, induzida por glutamato, NMDA e/ou KA, no tecido retiniano intacto de embriões tratados com ETOH, através de imunohistoquímica para GABA, identificando as populações amácrinas e horizontais.
- 3) Investigar o padrão de expressão do RNAm para GAD, através de RT-PCR, em retinas obtidas de embriões tratados com ETOH.

- 4) Investigar o padrão de expressão da GAD, NR1 e do GAT1, através de *Western Blot*, em retinas de embriões tratados com ETOH.
- 5) Investigar o padrão de expressão imunohistoquímica de GABA, GAD e NR1 em retinas obtidas de embriões tratados com ETOH.
- 6) Investigar o padrão de expressão imunocitoquímica da GAD em células de cultura retiniana tratadas com diferentes concentrações de ETOH.
- 7) Avaliar morte celular a partir da dosagem da LDH liberada por células de cultura retiniana tratada com diferentes concentrações de ETOH.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

Utilizamos retinas de embriões de galinha, da raça White Leghorn, em idade embrionária E16 estagiados de acordo com Hamburger & Hamilton (1951). Os ovos fertilizados eram obtidos de uma granja local da cidade do Rio de Janeiro. Os animais eram sacrificados por decapitação, seguindo-se a enucleação dos olhos. A retina era utilizada em diferentes protocolos experimentais. Os procedimentos para uso de animais estavam de acordo com o guia para manipulação e uso de animais do *National Institute of Health* (Bethesda, EUA) e aprovado pela comissão de manipulação de animais do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

1.1 Reagentes

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizamos os seguintes reagentes:

Sigma: HEPES, L-Glutamato, Glicina, GABA, PPO, POPOP, KA, leupeptina, aprotinina, gelatina, PMSF, Tris base, DAB, NMDA.

Amersham Biosciences: [³H] GABA, [³H] D-Aspartato.

Research Biochemical Inc.: DNQX, MK 801.

VETEC: ETOH

1.2 Soluções

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizamos as seguintes soluções:

CMF (solução salina sem cálcio e sem magnésio): NaCl 128mM, KCl 4mM, Na₂HPO₄ 0,92mM, Glicose 12mM, NaHCO₃ 9,4mM, KH₂PO₄ 0,45mM, pH 7,4.

Solução Fisiológica de Hank's: NaCl 128mM, KCl 4mM, CaCl₂ 3mM, MgCl₂ 1mM, Hepes 20mM, pH 7,4.

Solução Fisiológica de Hank's sem Mg⁺²: NaCl 128mM, KCl 4mM, CaCl₂ 3mM, EDTA 2mM, Hepes 20mM, glicina 2 mM, pH 7,4.

Solução cintiladora: 0,004% PPO e 100 mg POPOP/1 L de tolueno.

Solução de Ringer Locke: KCl 5,6mM, NaCl 147,8mM, NaHCO₃ 3,6mM, HEPES 5,0mM, glicose 5,6mM e CaCl₂ 2,3mM.

PBS: KCl 2,7mM, KH₂PO₄ 1,47mM, NaCl 136mM, Na₂HPO₄.7H₂O 8mM, pH 7,4.

Solução/Meio de cultura:

Utilizou-se CMF, tripsina 0,05%, meio DMEM (Gibco) e soro fetal bovino (Gibco) 5%.

2. Métodos

2.1 Administração de ETOH

Ovos de galinha (E11) fertilizados eram injetados na câmara de ar com 300 µL de PBS estéril (CTR) ou ETOH (10%, v/v em PBS estéril) e retornados a incubadora (37,8°C com umidade relativa de 80-90%) na qual permaneciam por 5 dias até serem sacrificados.

2.2 Dissecção das retinas

Os ovos eram retirados da incubadora e abertos numa placa de petri. Os embriões de galinha com 16 dias (E16) eram retirados dos ovos, decapitados e o globo ocular rapidamente removido por pinçamento do nervo óptico. Em seguida, os olhos eram transferidos para placa de Petri contendo 1 mL de CMF. A lente e a porção da córnea eram retiradas com uma pinça de modo que o humor vítreo ficasse exposto. Após a remoção do vítreo, a esclera era rasgada em 3 partes e com uma pinça a retina era removida do epitélio pigmentar.

2.3 Determinação da liberação de [³H] GABA e de [³H] D-Aspartato

Após obtenção das retinas de embriões tratados com PSB e/ou ETOH em E11, em CMF, os explantes eram incubados em placa de cultura (35 mm) sem

tratamento com 1 mL de DMEM acrescido de 0,2 μ Ci de um dos aminoácidos ($[^3\text{H}]$ GABA ou $[^3\text{H}]$ D-Aspartato) durante 90 minutos a 37°C. Após o período de incorporação, os explantes eram lavados 6 vezes com uma solução de Hank's à 37°C, contendo 12 mM de glicose com a finalidade de se retirar o excesso de radioatividade não captada pelos explantes. A perfusão era realizada com trocas sucessivas de 0,5 mL de Hank's contendo 4 mM de glicose a cada 6 minutos e o estímulo era realizado com glutamato 2mM em Hank's 4 mM, na presença ou não de antagonistas (MK-801 5 μ M e DNQX 100 μ M). As frações eram coletadas em tubos de ensaio dos quais retiravam-se amostras de 150 μ L que eram secas em filtros de fibra de vidro a 100°C por 40 minutos, para determinação da radioatividade liberada a cada troca de solução. No final da perfusão, os explantes eram lisados com 1 mL de água destilada a fim de liberar todo o conteúdo radioativo que não foi liberado. Os explantes eram finalmente submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento, centrifugados em uma microcentrífuga por 1 minuto. Em seguida, uma alíquota de 150 μ L deste sobrenadante também era colocada em filtro de fibra de vidro (293mm, Millipore) à 100°C por 40 minutos. As amostras eram quantificadas num cintilador Packard para a determinação de radioatividade. Os dados eram analisados usando tratamento estatístico de análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Bonferroni, no programa *Graph Pad Prism*, Versão 4.0.

2.4 Estimulação do tecido retiniano

Para verificação do efluxo de GABA endógeno, eram obtidos dois fragmentos de uma retina cortados ao longo do eixo dorso-ventral. Na obtenção destes fragmentos privilegamos a retina central de modo a reduzir possíveis diferenças ao longo das excentricidades horizontais e verticais. Além disso, os fragmentos de retina eram escolhidos como controle ou como um determinado grupo experimental de modo aleatório. As retinas dos diferentes grupos experimentais eram imersas em Solução de Ringer Locke (controle) ou contendo um dos vários agonistas glutamatérgicos estudados nas seguintes concentrações: Glu 2mM, NMDA 100 μ M ou KA 100 μ M. As retinas eram incubadas a 37°C sob agitação constante por tempos variáveis de acordo com o experimento. Antes da incubação do tecido, a Solução de Ringer Locke era oxigenada numa mistura carbogênica de 95%O₂ e 5%CO₂ por no mínimo 30 minutos. O pH era verificado e ajustado para 7,2-7,4 com solução de NaOH 1N.

Em alguns experimentos era preciso realizar uma pré-incubação com diferentes drogas na ausência dos agonistas glutamatérgicos a serem estudados. Assim, a duração da pré-incubação era de 20 minutos onde o tecido era pré-tratado com um dos seguintes antagonistas: MK-801 5 μ M e DNQX 100 μ M. Em seguida, os fragmentos de retina eram incubados com os agonistas glutamatérgicos ainda na presença das drogas usadas no pré-tratamento por 30 minutos. Finalmente, os fragmentos de retina do grupo controle e do grupo

experimental a ser tratado com o aminoácido excitatório (Glu, NMDA ou KA) eram pré-incubados apenas em solução de Ringer Locke.

Todos os experimentos da pré-incubação eram realizados utilizando-se somente solução de Ringer, enquanto nos experimentos nos quais utilizou-se NMDA, a solução de Ringer Locke era sem $MgCl_2$, na presença de EDTA 2mM.

2.5 Fixação e obtenção do tecido

Após estudos de liberação do GABA endógeno, estimulado por diferentes aminoácidos com ou sem antagonistas, as retinas eram fixadas por imersão em paraformaldeído (PA) 4%, diluído em tampão fosfato (TF) 0,16 M, pH 7,2, por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, o tecido era lavado em TF 0,16M, pH 7,2 com três trocas e mantida nesta solução por uma noite.

Para obtenção dos cortes, as retinas eram imersas previamente em solução de TF 0,16 M, pH 7,2 com concentrações crescentes de sacarose (15% e 30%) com o objetivo de crioproteção. Após um pernoite em solução de sacarose 30%, a retina era dissecada e montada em meio de inclusão (OCT) (Sakura Finetek, Torrance, CA) sobre uma placa de alumínio e congelada em nitrogênio líquido ($-196^{\circ}C$). Na montagem do bloco eram colocadas amostras das retinas com agonistas e/ou antagonistas, para que fossem coletados na mesma lâmina. Cortes transversais de 10 μm eram obtidos em criostato numa temperatura entre $-15^{\circ}C$ a $-20^{\circ}C$. As lâminas eram previamente gelatinizadas (gelatina 0,5%) no mínimo com

um dia de antecedência, e deixadas a secar à temperatura ambiente antes de serem devidamente estocadas. O preparo da gelatina consistia da diluição de gelatina a 0,5 % e 0,2% de alúmen de cromo em água destilada, sendo a solução aquecida durante o processo de diluição.

As lâminas, com os cortes coletados secavam a temperatura ambiente sendo armazenadas em caixas fechadas envolvidas com filme plástico e mantidas a -20°C até o momento da utilização.

2.6 Imunohistoquímica

Na imunohistoquímica eram avaliadas as marcações para GABA, GAD e NR1; para isso utilizamos os anticorpos policlonais obtidos comercialmente. Os cortes a serem processados para imunohistoquímica eram previamente lavados com PBS (3 vezes, por 10 minutos). Seguiu-se então a incubação em Albumina de Soro Bovino (BSA) 3% por no mínimo 30 minutos. Além dessas lavagens, todas as diluições do protocolo eram feitas em PBS + triton X-100 0,25%. Os cortes eram incubados por um pernoite com o anticorpo primário contra GABA (1:4000, Proctos), GAD (1:5000, Oertel 1440-4) e NR1 (1:100, Pharmigen).

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes eram lavados com PBS (3 vezes, por 10 minutos). Seguido a lavagem, os cortes eram incubados por 2 horas com o anticorpo biotinilado de cabra anti-coelho para GABA, cabra anti-

carneiro para GAD ou de cabra anti-rato para NR1, (todos os anticorpos secundários eram obtidos da Vector e utilizado numa diluição de 1:200). As amostras eram novamente lavadas em PBS (3 vezes, por 10 minutos) e incubadas em ABC (Vectastain Elite, Vector) diluído 1:50 por 1 hora e 30 minutos. A solução de ABC era preparada com antecedência mínima de 30 minutos do uso, conforme a recomendação do fabricante. Finalmente, após a lavagem em PBS (3 vezes, por 10 minutos), a reação era revelada com o kit para peroxidase com o cromógeno SG (Vector) por 10 minutos. Os cortes eram lavados em PBS e montados com meio de glicerol tamponado (40% em TF 0,2M).

2.7 Contagem de células

Para análise e observação dos resultados, era utilizado o microscópio óptico Axioskop (Zeiss). Eram feitas contagens de células GABA-positivas (GABA+) localizadas nas três primeiras fileiras da porção mais interna da CNI, porção onde se encontram as células amácrinas, e de células GABA-positivas (GABA+) localizadas na primeira fileira da porção mais externa da CNI, a camada das células horizontais. Tanto as células GABA+, assim como os perfis das células não marcadas eram contadas. Os resultados eram expressos como porcentagem de células GABA+ sobre o total de células. O total de células amácrinas e horizontais GABA+ era obtido de no mínimo 3 cortes diferentes de cada grupo, em cada experimento. Para cada grupo, no mínimo 3 animais eram

quantificados. Cabe lembrar que os cortes de retina controles e experimentais eram colhidos na mesma lâmina sofrendo o processamento imunohistoquímico simultaneamente. Deste modo minimizaram-se as diferenças decorrentes do processamento histológico e imunocitoquímico entre retinas controles e experimentais, dando maior confiabilidade à comparação quantitativa das células GABA+ entre os grupos.

Os dados eram analisados usando tratamento estatístico de análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Bonferroni, no programa *Graph Pad Prism*, Versão 4.0.

2.8 Análise de RNAm

RNA total era preparado de retinas de embrião de galinha E16 tratado com PBS e/ou ETOH 10% em E11, utilizando-se trizol (Invitrogen). Para a extração de RNA, as retinas eram dissecadas em CMF (1X) numa placa de Petri. Após este procedimento, as retinas eram lavadas 2X com PBS (1mL) e para cada 2 duas retinas adicionava-se 1 mL do reagente de estabilização de RNA laterTM(Qiagen), podendo ser utilizadas em seguida ou congeladas a -70°C. Para remoção do tampão as amostras eram centrifugadas (12000 rpm) a 10°C por 10-15 minutos. Em seguida era adicionado 1 mL de trizol, sendo as retinas homogeneizadas, primeiramente com uma seringa de 3 mL e depois com uma seringa de insulina ultrafina, deixando-as 5 minutos à temperatura ambiente.

Após este procedimento, as amostras eram centrifugadas por 10 minutos a 10900 rpm na Micro-centrífuga CT – 14000R (CIENTEC), sendo o sobrenadante recolhido em tubos eppendorf e deixado por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionava-se 200 μ L de clorofórmio nas amostras, agitando-as por 15 segundos sendo as amostras incubadas por 2-3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras eram centrifugadas por 15 minutos a 10900 rpm e a fase aquosa era recolhida em tubos eppendorf. Era adicionado ao precipitado, 500 μ L de álcool isopropílico e as amostras eram deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Procedia-se novamente à centrifugação seguindo o método anterior, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1 mL de ETOH 75% em H₂O-DEPC e centrifugado por 5 minutos a 8600 rpm. O sobrenadante era descartado e o precipitado era deixado por 5 minutos a temperatura ambiente, sendo logo após este tempo ressuspenso em 20 μ L de H₂O-DEPC e incubado a 55 - 60 °C por 10 minutos.

Após este tratamento, as amostras eram diluídas (1:100) em H₂O-DEPC e a concentração de RNA determinada por espectrofotometria a 260 e 280nm. Após a extração do RNA total dos tecidos controles e tratados com ETOH, a expressão gênica do RNAm para GAD65 e GAD67 foi investigada por reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para a reação de transcrição reversa, utilizava-se o *kit SuperScript II* (Invitrogen). Para a amplificação desses genes utilizava-se o protocolo Invitrogen de reação em cadeia da polimerase (PCR) juntamente com os *primers* apresentados na Tabela 1. Como

controle interno era utilizado a amplificação do marcador universal Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH).

As amostras eram incubadas no termociclador (TermoHybaid PCR Express) e a programação utilizada para a amplificação das seqüências de interesse das GADs consistia de 3 etapas: 94°C por 5 minutos (1 ciclo); 94°C por 30 segundos, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 min; 72 °C durante 5 minutos (1 ciclo). O número de ciclos realizados para GAD65, GAD67 e GPDH na etapa de anelamento eram 27, 25 e 20 ciclos, respectivamente. Os produtos finais destas reações eram separados em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio 0,5 mg/mL , visualizados em UV e fotografados em filme KODAK.

<i>RNA_m</i>	<i>Seqüências dos Primers (5'→ 3')</i>
GAD65	F: GGAGCTGCAGCCTTGGGTATTGG R: TGTGCT TCAAATCCC GTGGTTC
GAD67	F: ACCACCCGCACCAGCTGCTGGAG R: TTTGTAGCGTGCGGCCATTATGC
GPDH	F: AAAGTCGGAGTCAACGGATTTGG R: CCCAACC GTGTGCCTTTTCG

Tabela 1. Seqüências dos *Primers* para RNA_m GAD65, GAD 67 e GPDH. F: *Foward*, R: *reverse*.

2.9 *Western Blot*

2.9.1 Obtenção das Amostras

A expressão das proteínas GAD, GAT1 e NR1 era confirmada por *Western Blot* em retinas de embriões E16 tratados com ETOH 10% e/ou PBS em embriões de 11 dias. Para isto, o extrato total de proteínas de explantes de retina era obtido através de processamento mecânico (*dounce* ou seringa) com tampão de homogeneização (Tris 20mM, MgCl₂ 10mM, CaCl₂ 0,6mM, EGTA 0,5mM, DTT 100mM, PMSF 100mM, aprotinina 10mg/mL, leupeptina 2mg /mL, Triton-X100 0,05%, pH 7,4). Logo em seguida a concentração de proteínas era estimada através do método de Bradford (1976). As amostras eram diluídas em tampão de amostra (SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, Tris 62,5 mM) e fervidas por 5 minutos.

2.9.2 Eletroforese e transferência

Eram utilizados gel de poliacrilamida (Tris 1.5M pH 8.8, acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.9%, TEMED, APS10%) na concentração de 8% ou 10% e tampão de corrida (glicina 0,192M, Tris 0,025M, SDS 0,1% e azul de bromofenol). Juntamente com as amostras era submetido à eletroforese um padrão de peso molecular (Invitrogen) de amplo espectro.

Uma vez realizada a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,2 mm, Bio Rad) em tampão de transferência (Tris 24,7 mM, glicina 0,198M, SDS 10%, metanol 20%). Após este processo, as membranas eram imersas em solução TTBS (Tris 50mM, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mM, Tween 20 0,1%) e em seguida coradas com vermelho de *Ponceau* 0,1%

diluído em 5% de ácido acético (Sigma, St Louis, MO). Assim, a transferência era verificada e a posição dos padrões de peso molecular identificados com lápis.

As etapas seguintes eram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação constante. Após a retirada do excesso de corante, as membranas eram bloqueadas em solução de 5% de leite desnatado (Molico) contendo BSA 1% em solução TTBS por 2 horas. Utilizamos anticorpo policlonal anti-GAD (1:5000, Oertel), anti-GAT1 (1:1000, Chemicon) e anti-NR1 (1:1000, Chemicon) como anticorpo primário diluído em solução TTBS contendo 1% de BSA. As membranas eram incubadas por 12 horas na presença do anticorpo primário sob refrigeração.

Após esse período, as membranas eram lavadas 3 vezes em TTBS, 10 minutos cada. Em seguida, adicionava-se o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) anti-carneiro (1:10000, Sigma) para GAD, anti-coelho (1:10000, Sigma) para GAT1 e anti-rato (1:3000, Sigma) para NR1 por 2 horas, sendo que o anticorpo secundário era diluído em TTBS contendo 1% BSA. Passadas duas horas, as membranas eram lavadas novamente como descrito anteriormente. A revelação era realizada pelo método de quimioluminescência ECL (Amersham), que consiste na oxidação do luminol pela peroxidase, sendo o produto final capaz de emitir luz. Expunha-se um filme de raio X (Kodak X-Omat) e procedia-se à revelação fotográfica padrão.

2.10 Cultura densa de células retinianas

As retinas dos embriões de 9 dias (E9) previamente dissecadas eram transferidas para um tubo de ensaio contendo 1 mL de CMF. A este CMF era adicionado 0,5 mL de tripsina estéril a 0,1%. Este tudo era levado a um banho-maria a 37° C, onde permanecia por aproximadamente 10 minutos para que a enzima pudesse agir sobre o tecido. Em seguida, as retinas eram centrifugadas por 1 minuto e o sobrenadante desprezado. O tecido era ressuspensão em 5 mL de DMEM contendo 5% de soro fetal bovino e dissociado mecanicamente por 10 aspirações sucessivas com pipeta de vidro. Esta suspensão celular foi diluída em meio de cultura de forma que cada mililitro contivesse 15×10^6 células. Plaqueava-se 2 mL desta suspensão em placas de plástico de 35 mm de diâmetro, que em seguida eram colocadas em uma estufa à 37° C com atmosfera umidificada constituída de 95% de ar e 5% de CO₂. As células da retina de embriões de 9 dias eram cultivadas por um período de 7 dias, quando então, atingiam um estágio de diferenciação (E9C7) equivalente a um embrião de 16 dias.

O meio destas culturas era trocado a cada 48 horas e pré-tratadas (um pulso em C5 e outro em C6) com doses crescentes de ETOH (100 µM, 1 mM, 6 mM, 10 mM, 30 mM, 100 mM e 300 mM), GABA 10 mM, baclofen 0.5 mM ou taurina 1mM.

2.11 Imunocitoquímica em culturas densas de células retinianas

Culturas mistas de retina E9C7, tratadas ou não com diversos agentes, eram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas em PA 4% em TF 0,16M por 10 minutos. Após lavagens com PBS, a cultura era incubada com uma solução de bloqueio composta de BSA 3% e Triton 0,25% por 30 minutos. O anticorpo primário anti-GAD (Oertel) era diluído 1:10000 e as culturas incubadas overnight. Então as culturas eram lavadas 3 vezes em PBS (10 minutos cada) e depois incubadas com o anticorpo secundário cabra anti-carneiro para GAD (Vector) diluído 1:200, por 2 horas, à temperatura ambiente. Após duas horas de incubação, as culturas eram lavadas novamente 3 vezes com PBS (10 minutos cada). A imunocitoquímica era revelada com o cromógeno DAB por 10 minutos, seguido de mais 2 lavagens com PBS. Os controles da imunocitoquímica eram obtidos pela omissão do anticorpo primário, no qual resultava da completa ausência de marcação. As células GAD+ foram contadas em 8 campos aleatórios num microscópio Zeiss com objetiva de 20x e fotografadas numa câmera *Coolpix 995 - Nikon E995*.

2.12 Dosagem da LDH

A dosagem da lactato desidrogenase (LDH) era realizada de culturas E9C7 previamente tratadas com ETOH por 48 horas (em E9C5 e E9C6), na qual a

enzima LDH era quantificada por ensaio de ELISA, seguindo a instrução do fabricante do kit (Promega). O sobrenadante de culturas mistas, tratadas com diferentes concentrações de ETOH, era recolhido e incubado numa diluição de 1:1 (50 μ L) do substrato da reação, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. A reação era interrompida com solução de parada (50 μ L) adicionada a cada poço e a absorbância registrada por ELISA a 490nm.

RESULTADOS

Baseado em resultados sobre o efeito do ETOH na modulação da liberação de GABA, investigamos se a exposição da retina embrionária de galinha ao ETOH poderia modular a liberação de GABA, induzida por glutamato. Inicialmente, fizemos uma análise toxicológica do ETOH para verificar se a concentração de ETOH administrada nos embriões causaria a sua morte. Para isso, foram injetados PBS ou ETOH 10% em embriões de E11 e em E16, avaliamos a viabilidade destes embriões. Como pode ser observado na Figura 8, não houve diferença na percentagem da viabilidade de embriões tratados com ETOH 10%, comparado com os injetados com PBS.

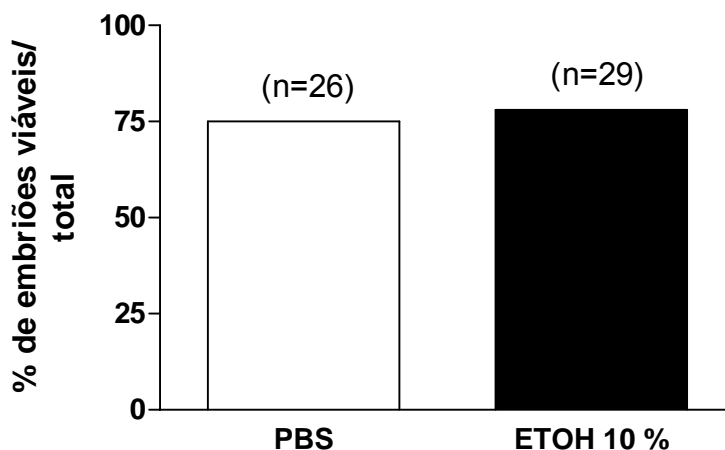


Figura 8. Percentagem da viabilidade de embriões E16 injetados com ETOH 10% ou PBS (CTR) em E11. Não houve diferença na viabilidade dos animais tratados com ETOH comparado com o CTR (PBS).

Após avaliarmos a viabilidade dos embriões, analisamos a liberação do [3 H] GABA incorporado pelas células da retina de embriões obtidos de ovos injetados

com PBS (CTR) ou com ETOH. Como pode ser observado na Figura 9A, retina de embrião E16, injetado *in ovo* com 10% de ETOH em E11, liberou 39% mais [³H] GABA ($p < 0,05$) quando estimulado com 2 mM de glutamato, comparado com retina CTR de embriões de ovos injetados com PBS. A liberação de [³H] GABA foi bloqueada completamente por antagonistas glutamatérgicos, MK801 5 μ M e DNQX 100 μ M, tanto em retina de animais CTR quanto tratados com ETOH. Isto sugere que o efeito do ETOH no aumento da liberação de [³H] GABA é um mecanismo dependente de receptores ionotrópicos de glutamato.

Alguns trabalhos demonstram que a administração de ETOH pode aumentar ou diminuir a liberação de diferentes transmissores do terminal sináptico (Ziskind-Conhaim *et al.*, 2003; Roberto *et al.*, 2004). Para verificar se esse efeito era especificamente relacionado à liberação de [³H] GABA, nós estudamos a liberação de outro neurotransmissor cuja liberação também é estimulada por glutamato, o aspartato. Assim, investigamos a liberação de [³H] D-Aspartato em retina de embriões previamente tratados com ETOH. Como apresentado na Figura 9B, não houve diferença nos níveis de [³H] D-Aspartato liberado, quando estimulado por 2 mM de glutamato, em retina E16 injetada com ETOH ou PBS *in ovo* em E11. Concluímos que o ETOH modula seletivamente a liberação de [³H] GABA estimulada por glutamato durante o desenvolvimento da retina de galinha.

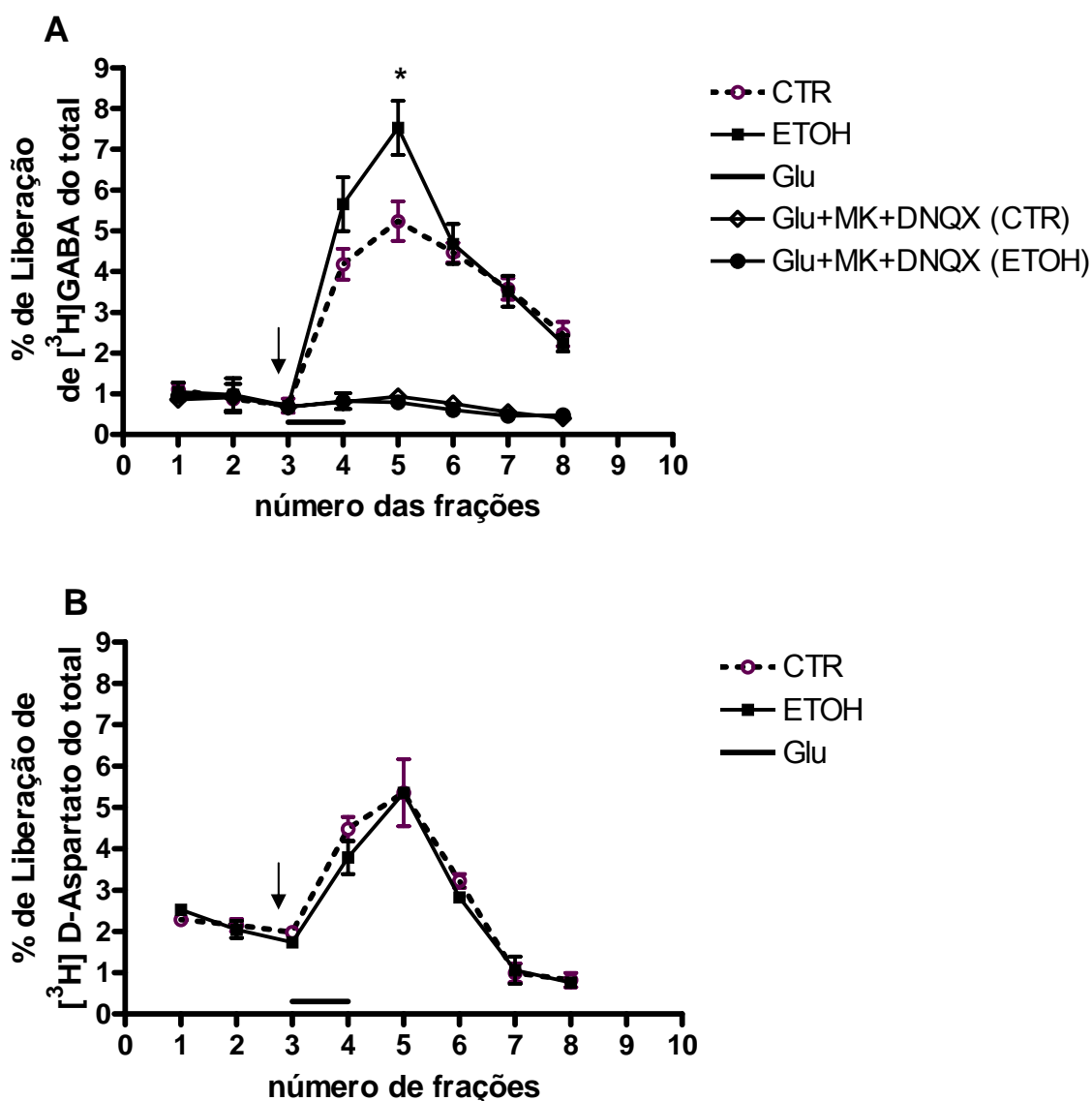


Figura 9. Aumento da liberação de [³H] GABA (**A**) mas não da liberação de [³H] D-Aspartato (**B**) estimulado por 2 mM de glutamato em retinas E16 previamente tratadas com ETOH ou PBS. A liberação de [³H] GABA (**A**) (n=4) de retinas tratadas com ETOH foi 39% maior quando comparado com retinas CTR, tendo seu efeito bloqueado totalmente pelos antagonistas glutamatérgicos, MK801 5 μM e DNQX 100 μM. Não houve diferença nos níveis de [³H] D-Aspartato (**B**) (n=3) liberado, estimulado por glutamato, em retinas tratadas com ETOH e CTR. *p<0.05 em relação ao controle. CTR, retina de embrião tratada com PBS; ETOH, retina de embrião tratado com ETOH 10%; Glu, glutamato; Glu+MK+DNQX (CTR), retinas controle estimuladas com glutamato na presença de antagonistas (MK801 e DNQX); Glu+MK+DNQX (ETOH), retinas tratadas com ETOH estimuladas com glutamato na presença de antagonistas (MK801 e DNQX). ↓ estímulo com glu.

A análise da liberação de [³H] GABA não permite avaliar as populações de células da retina envolvidas com esta liberação. Além disso, aminoácidos, como o GABA e glutamato, desempenham papel importante no metabolismo celular e podem ser segregados em diferentes compartimentos dependendo da sua função principal na célula. Portanto, a análise da liberação de aminoácidos marcados não revela precisamente todo o *pool* de neurotransmissor no neurônio. Além disso, Campochiaro e colaboradores (1984) mostraram diferenças no processo de liberação de GABA radiomarcado quando comparado ao endógeno em retinas de embrião de galinha. Assim, identificamos as populações celulares envolvidas nesse efeito, estudando a liberação de GABA endógeno induzida por AAE em retina de embriões tratados com ETOH, através de um método que combina estimulação farmacológica do tecido vivo e imunohistoquímica (Osborne, *et al.*, 1994; Calaza, *et al.*, 2001). A imunorreatividade para GABA foi encontrada no corpo celular de células horizontais, amácrinas e na CCG, como descrito por estudos anteriores (Mosinger *et al.*, 1986; Hokoç *et al.*, 1990; Calaza *et al.*, 2001). Como mostrado na Figura 10 (A, C), secções de retinas obtidas de embriões tratados com PBS e ETOH mostraram um padrão similar de expressão para o GABA. Além disso, o número de células amácrinas e horizontais GABA⁺ eram similares em ambas as condições (Figura 11 e 12 CTR/PBS e CTR/ETOH). Nenhuma diferença foi observada no padrão de GABA-IR, em retinas fixadas imediatamente após dissecação, nas diferentes condições experimentais. Entretanto, a exposição da retina à 2 mM de glutamato por 30 minutos diminuiu o número de células amácrinas GABA⁺ (Figura 10B e D), sendo que este efeito foi

maior em retinas de embriões tratadas com ETOH comparado com retinas tratadas com PBS (Figura 11 A). Por outro lado, a exposição da retina à 2 mM de glutamato, 100 μ M de NMDA ou 100 μ M de KA, não alterou a marcação de células horizontais GABA⁺ (Figura 12 A-C) em retinas tratadas com ETOH comparado com retinas de embriões tratados com PBS.

Tanto a liberação de [³H] GABA exógeno quanto a liberação de GABA endógeno, estimulados por glutamato 2 mM, foram completamente bloqueados por antagonistas glutamatérgicos (MK801 5 μ M e DNQX 100 μ M), sugerindo um envolvimento de receptores glutamatérgicos na modulação da liberação de GABA. Assim, resolvemos analisar se receptores do tipo NMDA estariam envolvidos com esta modulação, estimulando a retina com o agonista seletivo NMDA 100 μ M. Como observado o NMDA (100 μ M) também promoveu uma maior redução no número de células amácrinas GABA⁺ (Figura 11B), mas não nas células horizontais (Figura 12B), em retinas de embriões tratados com ETOH comparado com aquelas injetadas com PBS. Como esperado, este efeito foi bloqueado completamente por 5 μ M de MK-801 (Figura 11B), um antagonista não-competitivo de receptores NMDA, confirmando que o efeito do ETOH na liberação de GABA era de fato dependente deste receptor.

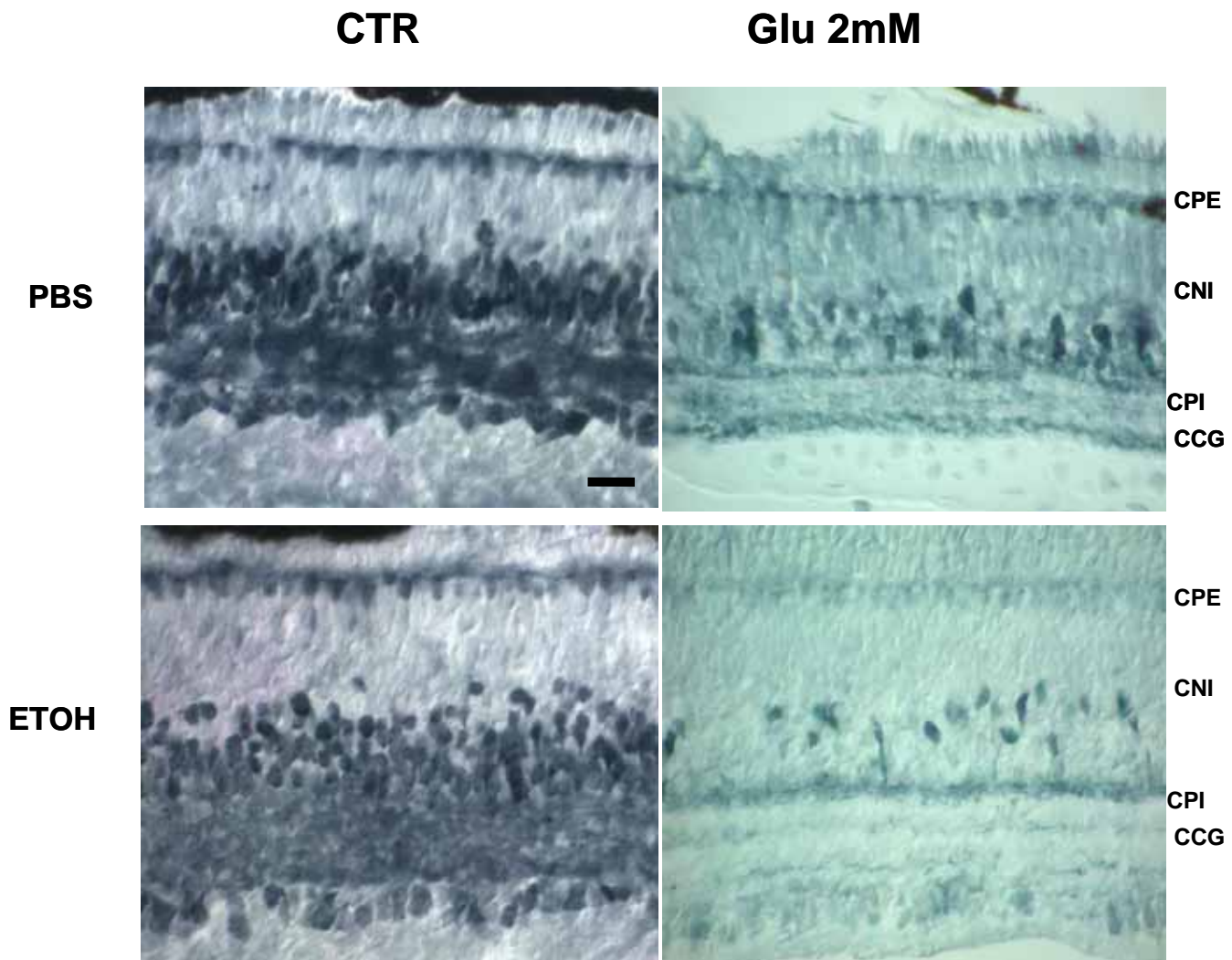


Figura 10. Fotomicrografias de cortes transversais de retina de embrião de galinha com 16 dias tratados com PBS ou ETOH em E11, com células imunorreativas para GABA (**A-D**), na condição CTR ou estimulado com glu 2 mM. Cortes radiais de retina de galinha E16 tratadas com PBS (**A,B**) ou ETOH 10% (**C,D**) *in ovo* em E11. (**A, C**) Retina controle mantida em Solução de Ringer Locke. (**B, D**) GABA-IR em células da retina estimuladas com 2mM Glu por 30 minutos. Note em (**D**) a diminuição do número de células amácrinas GABA-IR por unidade de área e a redução na densidade de marcação nos prolongamentos da CPI. n=3. Barra de escala = 10 μ m.

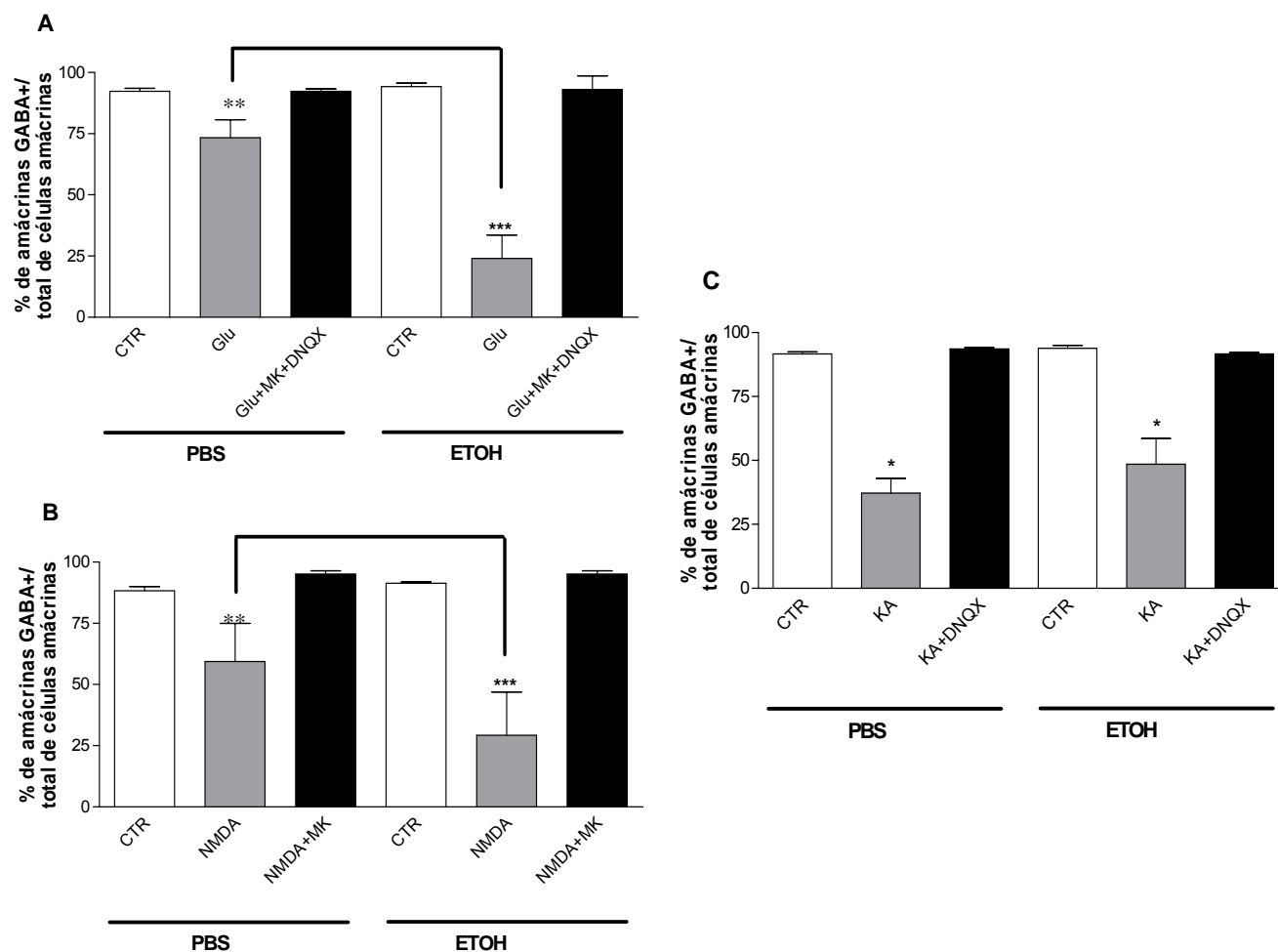


Figura 11. Histograma da porcentagem de células amácrinas GABA+ do total de células amácrinas, sob diferentes condições de incubação. Retinas de E16, previamente tratadas com ETOH, liberam mais GABA quando estimuladas com 2 mM de glutamato (**A**) e 100 μ M de NMDA (**B**) comparado com retinas de embriões tratados com PBS, tendo seu efeito bloqueado na presença de antagonistas. Por outro lado, retinas de E16, previamente tratadas com ETOH, não apresentaram diferença na liberação do GABA, quando estimuladas com 100 μ M de KA (**C**). *** $p < 0.001$ referente a Glu/NMDA (PBS) e ao CTR (PBS e ETOH); ** $p < 0.05$ referente ao CTR (PBS); * $p < 0.001$ referente a KA (PBS e ETOH). CTR, retina controle; Glu/NMDA/KA, retina estimulada com glutamato, NMDA, ou KA; Glu+MK+DNQX, retina estimulada com glutamato na presença de antagonistas MK801 (5 μ M) e DNQX (100 μ M); NMDA+MK, retina estimulada com NMDA na presença de MK801; KA+DNQX, retina estimulada com KA na presença de DNQX; $n=3$.

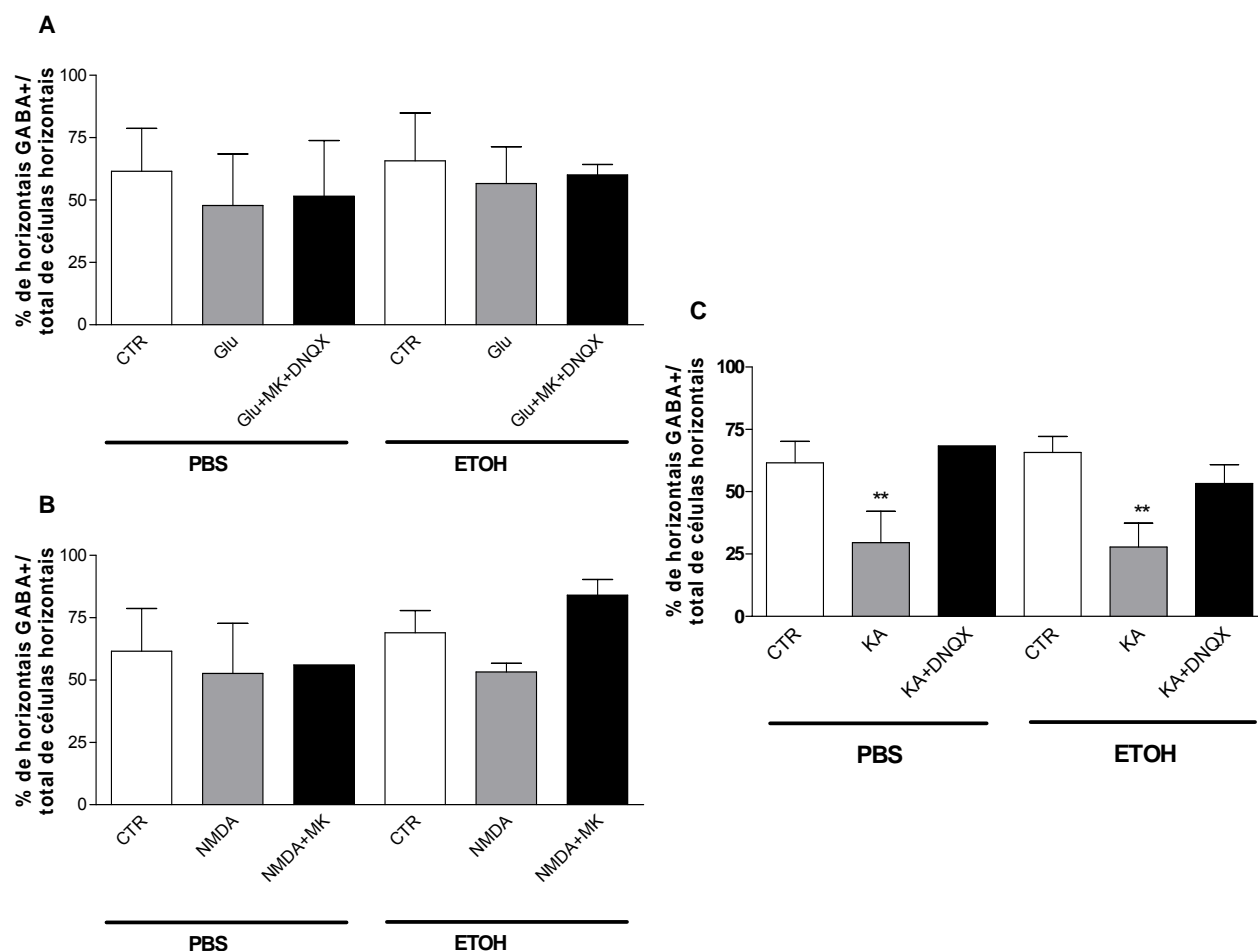


Figura 12. Histograma da porcentagem de células horizontais GABA+ do total de células horizontais, sob diferentes condições de incubação. Não houve diferença na liberação do GABA em retinas de E16, previamente tratadas com ETOH, quando estimuladas com 2 mM de glutamato (A) e 100 μ M de NMDA (B) ou 100 μ M de KA (C) comparado com retinas CTR, tendo seu efeito bloqueado na presença de antagonistas. ** $p < 0.05$ referente ao CTR (PBS/ETOH). CTR, retina controle; Glu/NMDA/KA, retina estimulada com glutamato, NMDA, ou KA; Glu+MK+DNQX, retina estimulada com glutamato na presença de antagonistas MK801 (5 μ M) e DNQX (100 μ M); NMDA+MK, retina estimulada com NMDA na presença de MK801; KA+DNQX, retina estimulada com KA na presença de DNQX. $n=3$.

Com o objetivo de identificar possíveis mediadores envolvidos na modulação da liberação de GABA induzido por glutamato em retinas de embriões tratados com ETOH, investigamos os níveis de RNAm das duas isoformas da GAD, enzima de síntese do GABA. Para isso, utilizamos a técnica de RT-PCR com seqüências específicas de *primers* para GAD65 e GAD67. Como observado, retina de embriões E16 injetados com ETOH em E11 tiveram um aumento dos níveis do RNAm para GAD65, mas não para GAD67 (Figura 13).

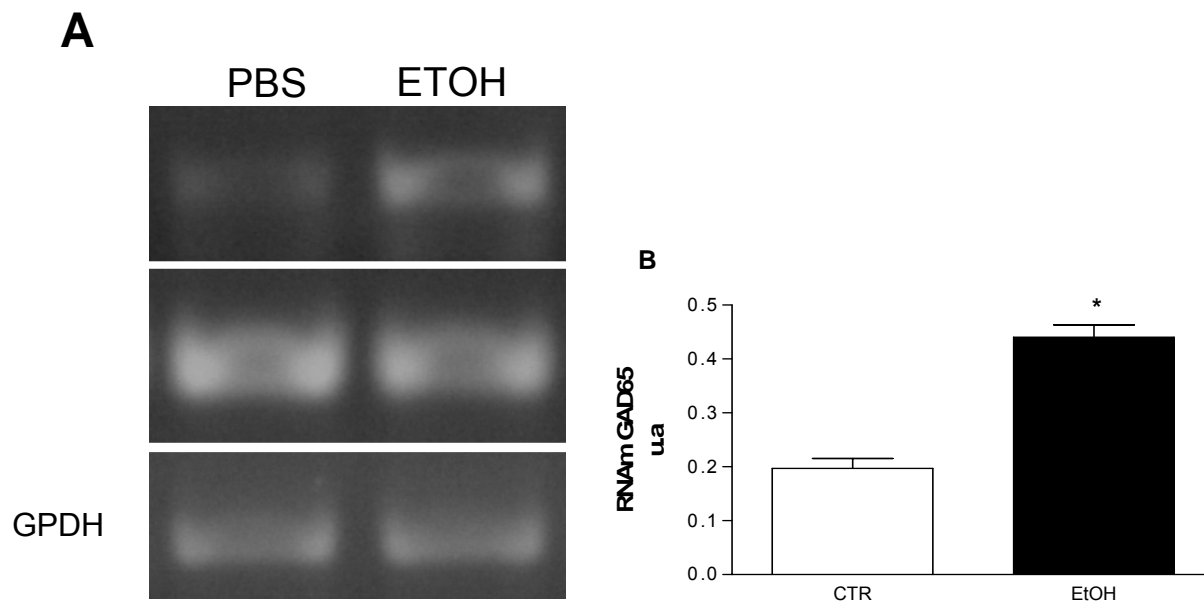


Figura 13. RT-PCR (A) semi-quantitativo para as isoformas da GAD comparando retina de E16 tratados com ETOH ou PBS em E11. ETOH aumenta seletivamente o RNAm para a enzima GAD65 (A), mas não para GAD 67. (B) Densitometria do RNAm para GAD65. * $p < 0.05$ em relação ao CTR. GPDH, gliceraldeído 3-fosfato; $n=3$.

Para investigar se o aumento dos níveis de RNAm para GAD induzia um aumento na expressão desta proteína em retinas de embriões tratados com

ETOH, nós analisamos o padrão de expressão da GAD por *Western Blot* e imunohistoquímica, sendo que o anticorpo utilizado para a GAD não distingue as duas isoformas. Entretanto, não houve alteração nos níveis da proteína GAD, (Figura 14A e 15 A e B), em retinas de embriões tratados com ETOH comparado com retinas CTR (PBS), verificado por ambos os métodos.

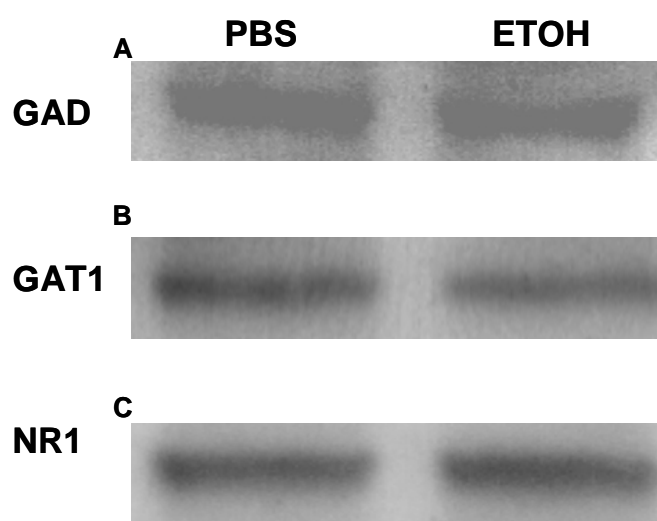


Figura 14. Análise representativa de *Western Blot* para a expressão da GAD (A) transportador de GABA (GAT1) (B) ou (C) NR1. Não houve diferença nos níveis de proteína da GAD, GAT1 e NR1 em retinas de E16 tratados com ETOH ou PBS em E11; n=3.

Com base nestes resultados decidimos analisar outros marcadores possivelmente envolvidos com o efeito do ETOH encontrado na liberação de GABA induzido por glutamato.

Para investigar se a potenciação da liberação de GABA, induzida por glutamato, em retinas de embriões tratados com ETOH, era resultado de um

aumento da expressão de NR1, a subunidade fundamental para o receptor NMDA ser funcional, nós realizamos imunohistoquímica para NR1 em retinas de embriões injetados com PBS ou ETOH (Figura 15 C e D). Como descrito na Figura não houve alteração na marcação para NR1. Assim, o efeito do ETOH na liberação de GABA induzido por glutamato não foi devido a um aumento na expressão dos níveis de NR1, nem da GAD ou do próprio GABA (Figura 15) em retinas de embriões injetados com ETOH.

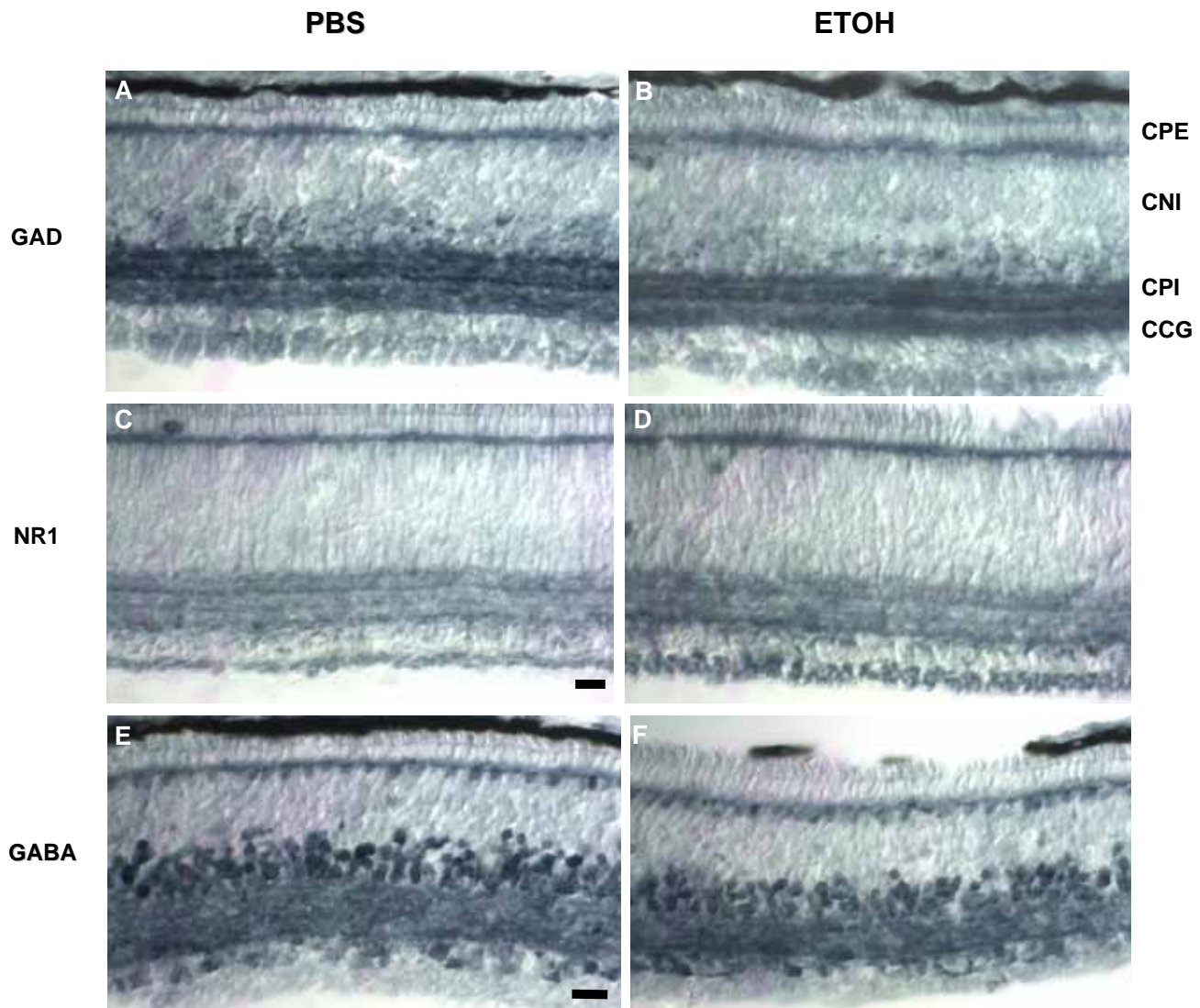


Figura 15. Fotomicrografia de células imunorreativas para GAD (A,B), NR1 (C,D) ou GABA (E,F) em secções de retina de galinha E16 injetado com PBS (A, C, E) ou ETOH 10% (B,D,F) *in ovo* em E11. Células imunorreativas para GAD estão localizadas na CNI e para NR1 nas camadas plexiformes. A GABA-IR está presente em células amácrinas e horizontais da CNI, em células da CCG e na CPI (E,F), sendo que não houve diferença na marcação para GAD, NR1 ou GABA, em retinas tratadas com PBS ou ETOH. Barra de escala= 10 μ m, n=3.

É conhecido que a enzima GAD é modulada por GABA em retina de galinha e que o GABA extracelular inibe a expressão de GAD em células da retina (de Mello *et al.*, 1991). Por outro lado, ETOH interage com receptores GABA_A (Boehm *et al.*, 2006). Assim, examinamos se o ETOH poderia reduzir a expressão de GAD, em culturas densas de células da retina no estágio E9C7 (equivalente à retina E16); as culturas foram incubadas (um pulso em E9C5 e outro em E9C6) com diferentes concentrações de ETOH (0,1 mM, 1 mM, 6 mM, 10 mM, 30 mM, 100 mM e 300 mM), 10 mM de GABA, 1 mM de taurina (agonista GABA_A e GABA_B) ou 100 μM de baclofen (agonista GABA_B) por 48 horas. Como visto na Figura 16A, culturas CTR mostraram diversos neurônios GAD⁺, detectado por imunocitoquímica. Com a adição de 1 mM de ETOH, em culturas com 5 e 6 dias, não houve nenhuma alteração na marcação de neurônios GAD⁺ (Figura 16B) comparado ao controle. Entretanto, a adição de concentrações superiores a 6 mM de ETOH bloqueou de forma dose-dependente a expressão da GAD em culturas E9C7. Como esperado, 10 mM de GABA inibiu completamente a expressão da GAD (Figura 16D). Por outro lado, baclofen não teve efeito nos níveis da expressão da GAD em culturas de retina E9C7 (Figura 16E). A Figura 16F ilustra a quantificação de neurônios GAD⁺ em cultura densa de retina sob diferentes condições. Como observado ETOH induziu uma inibição dose-resposta de neurônios GAD⁺ (IC₅₀ aproximadamente 15 mM). Na concentração de 300 mM de ETOH ou 10 mM de GABA, houve uma inibição completa da expressão da GAD em células da retina. Para excluir a participação de morte neuronal induzida por

altas doses de ETOH, medimos os níveis de lactato desidrogenase (LDH) nas culturas de células da retina E9C7 pré-tratadas (um pulso em C5 e outro em C6) com doses crescentes de ETOH (100 μ M, 1 mM, 6 mM, 10 mM, 30 mM, 100 mM e 300 mM). Como visto na Figura 16G, não houve aumento nos níveis de LDH em culturas pré-incubadas com ETOH, mas sim na presença da toxina Win (agonista canabinoide), sugerindo que a expressão da GAD está reduzida na presença do ETOH em cultura de células de retina e independe de morte celular.

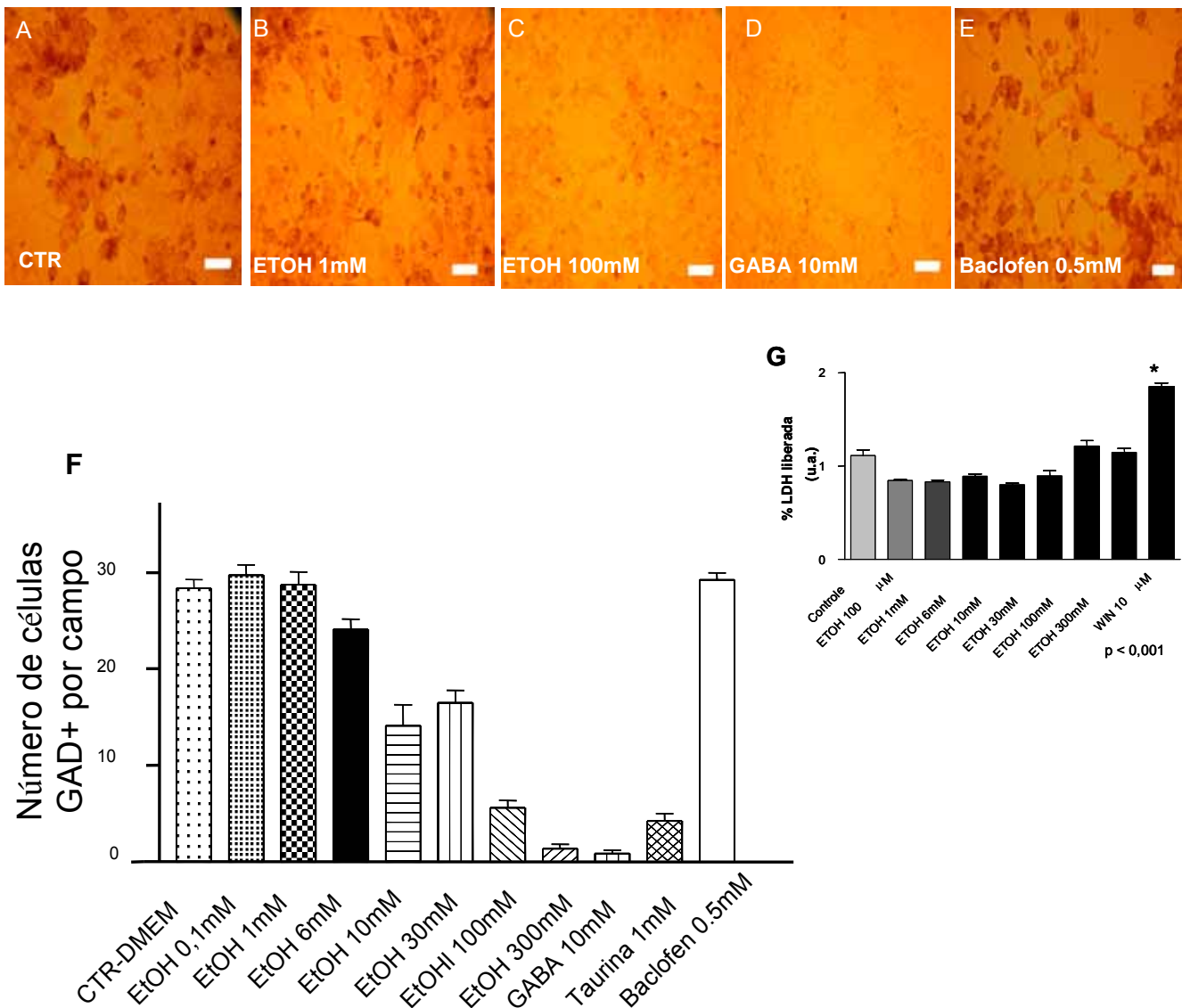


Figura 16. Expressão da GAD em cultura de células da retina de galinha é regulada por ETOH e GABA, detectado por imunocitoquímica. **(A-E)** Células da retina de E9 dissociadas e mantidas em cultura por 5 (E9C5) e 6 dias (E9C6) que foram tratadas com ETOH (1 e 100mM), GABA (10mM), Taurina (1mM) ou Baclofen (0,5mM). Culturas foram fixadas em E9C7 e marcadas para GAD como mostra em **(A)** controle, **(B)** ETOH 1mM, **(C)** ETOH 100mM, **(D)** GABA 10mM e **(E)** Baclofen 0,5mM. **F.** Histograma do número de neurônios positivos para GAD \pm SEM 8 campos randômicos, $n=1$ (triplicata). **G.** Liberação de LDH em culturas de células retiniana E9C7 previamente tratadas com ETOH 48horas. Win (agonista canabinóide), um agente excitotóxico, induz morte celular, enquanto ETOH não induziu; * $p<0.05$ em relação ao CTR; $n=2$.

DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento do SNC, ocorre um refinamento dos contatos sinápticos através do fortalecimento destas conexões, quando em locais apropriados, ou a partir da retração, quando em alvos inapropriados. A plasticidade neuronal é particularmente evidente durante período embrionário onde inúmeros receptores de neurotransmissores estão sendo expressos. Em humanos, esta plasticidade neuronal pode ser alterada se gestantes consumirem drogas que bloqueiam respostas glutamatérgicas (reduzindo a excitação neuronal) ou drogas que potenciam respostas GABAérgicas (aumentando a inibição neuronal) (McBain e Fisahn, 2006). Sabe-se que o ETOH é uma droga que pode alterar este balanço entre excitação e inibição no SNC e de fato, tem sido descrito que a exposição ao ETOH pode levar a danos irreversíveis na plasticidade neuronal (Rema e Ebner, 1999).

Baseado nisto, decidimos investigar os efeitos do ETOH em baixas doses (10% em PBS, aproximadamente 6,5 mM), na modulação da liberação de GABA em embriões de E16 injetados *in ovo* em E11, período no qual as sinapses estão sendo formadas nos neurônios da retina e na qual os receptores glutamatérgicos e GABAérgicos estão sendo expressos (de Mello *et al.*, 1991; Bredariol e Hamassaki-Britto 2001; Barros *et al.*, 2003).

O mecanismo de ação do ETOH não está bem esclarecido em sinapses, mas é descrita a ação dessa droga em terminais pós-sináptico, principalmente em

sinapses glutamatérgicas (Lovinger *et al.*, 1989; Olney *et al.*, 2001) e GABAérgicas (Boehm *et al.*, 2006). ETOH altera a transmissão sináptica GABAérgica tanto no hipocampo (Weiner *et al.*, 1994) quanto na amígdala (Roberto *et al.*, 2003, 2004), além de agir como um modulador alostérico de receptores GABA_A. Alguns trabalhos demonstram que a resposta de GABA pode ser potenciada por ETOH em baixas concentrações (1-5 mM) em receptores recombinantes GABA_A de oócitos constituídos por certas subunidades (Sundstrom-Poromaa *et al.*, 2002; Wallner *et al.*, 2003), enquanto outros receptores recombinantes GABA_A são insensíveis a baixas concentrações (<50 mM) (Harris, *et al.*, 1998), o que indica a presença de múltiplos mecanismos que influenciam a sensibilidade de receptores GABA_A ao ETOH.

O mecanismo que leva a alterações na função de receptores GABA_A e do aumento da excitabilidade do SNC após exposição ao ETOH não está bem estabelecido. Diversos mecanismos têm sido propostos, os quais incluem alterações na expressão gênica, modificações pós-traducionais, localização subcelular, localização sináptica, regulação por interação com outros receptores e sinalização intracelular. Estes mecanismos incluem ambas alterações genômicas e não-genômicas que são provavelmente interações que explicam as complexas adaptações dos receptores GABA_A ao ETOH no SNC.

O receptor de NMDA, a princípio, é o principal sítio de ação do ETOH (Kumari e Ticku, 2000; Ron, 2004) e este receptor está relacionado com fenótipos associados ao abuso de ETOH, como a tolerância, dependência, abstinência e procura pela droga (Krystal *et al.*, 2003). Enquanto a exposição aguda ao ETOH

inibe a ação excitatória do glutamato em receptores NMDA, o tratamento crônico resulta em um aumento da expressão de receptores NMDA (Samson e Harris, 1992; Kumari e Ticku, 2000).

A retina embrionária de galinha é um modelo muito apropriado para estudar o SNC porque ela está localizada fora do eixo central e, portanto, de fácil acesso. E ainda, a maioria de seus neurotransmissores participa da circuitaria neural que é inteiramente confinada dentro da retina, com ênfase no glutamato e no GABA, os principais transmissores excitatórios e inibitórios, respectivamente, do SNC (Calaza *et al.*, 2003; 2006). O neurotransmissor glutamato está presente no eixo radial, em fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares, enquanto que o GABA está localizado principalmente em células horizontais e células amácrinas responsáveis pela modulação sináptica lateral (Barnstable, 1993). Células da retina embrionária de galinha apresentam iGluRs relacionados com a liberação de GABA, via ativação de receptores NMDA e não-NMDA (Tapia e Arias, 1982; do Nascimento e de Mello, 1985; Reis *et al.*, 1995; Calaza, *et al.*, 2001, 2003, 2006).

Segundo Fink e Gothert (1996) ETOH inibe a liberação de vários neurotransmissores entre eles o GABA, em diversas regiões do cérebro. Em grande parte, isto se dá através do bloqueio de receptores NMDA contendo a subunidade NR2B. Por outro lado, inúmeros estudos recentes apontam para uma ação contrária do ETOH, aumentando a liberação pré-sináptica do GABA (Roberto *et al.*, 2003, 2004; Criswell e Breese, 2005; Breese *et al.*, 2006). De fato nossos resultados mostram que retinas de E16 tratados com ETOH liberaram 39% mais

[³H] GABA ($p < 0,05$) quando estimulado com 2 mM de glutamato, comparado com retinas de embriões CTR. Este efeito não foi dependente de um aumento na subunidade NR1 de receptores NMDA, do transportador de GABA (GAT1) nem da enzima que sintetiza o GABA (GAD), apesar de que em nossos experimentos utilizamos um anticorpo que não distingue as isoformas da GAD, portanto isto nos impede de obter uma melhor conclusão dos nossos resultados. Embora estudos demonstrem que o tratamento crônico resulta em um aumento da expressão de receptores NMDA (Samson e Harris, 1992; Kumari e Ticku, 2000), nossos resultados não demonstraram alterações na expressão da subunidade NR1 de receptores NMDA em retinas embrionárias tratadas com ETOH. Isto pode estar relacionado à concentração e ao tempo de exposição da droga, à particularidade do circuito retiniano ou à forma de tratamento da droga (*in vivo* ou *in vitro*), além da combinação das subunidades dos receptores presentes nos neurônios retinianos.

Kalluri e colaboradores (1998) descreveram que a exposição de ETOH aumenta os níveis da subunidade NR1 em córtex cerebral e hipocampo de rato. Entretanto, Rani e Ticku (2006) demonstraram recentemente que a administração de ETOH pouco alterou os RNAm ou os níveis de proteína da subunidade NR1 em culturas de neurônios corticais de rato. Nesse sentido, o fato dos níveis da subunidade NR1 não se alterarem em retinas obtidas de embriões tratados com ETOH está de acordo com parte dos resultados descritos na literatura.

Por outro lado, diversos estudos demonstram um aumento da expressão da subunidade NR2B mediante exposição ao ETOH (Follesa e Ticku, 1996; Kalluri *et al.*, 1998; Rani e Ticku, 2006). Sabe-se que os receptores de NMDA são tetrâmeros de subunidades NR1, NR2 e NR3 e a expressão da subunidade NR2 afeta a propriedade do canal (Monyer *et al.*, 1994). A ativação dos receptores de NMDA compostos de heterodímeros NR1/NR2B resultam em EPSCs que desativam lentamente quando comparadas com tetrâmeros compostos de NR1/NR2A (Flint *et al.*, 1997; Tovar e Westbrook, 1999).

Assim, uma das hipóteses poderia ser que um aumento da excitabilidade da retina (aqui medido pela liberação de GABA), mediante estímulo com glutamato ou NMDA poderia ser, em parte, devido a um aumento na proporção de receptores NMDA contendo as subunidades NR2B, as quais mostrariam correntes excitatórias maiores. Este ponto, entretanto, ainda precisa ser esclarecido.

Para verificar se o efeito do ETOH era especificamente relacionado à liberação de [³H] GABA, estudamos a liberação de um outro agente, o [³H] D-Aspartato, que mimetiza a captação do glutamato, em retina de embriões tratados com ETOH. Nossos resultados mostram que não houve diferença nos níveis de [³H] D-Aspartato liberado, quando induzido por 2 mM de glutamato, em retinas embrionárias tratadas com ETOH. Portanto, o ETOH modula seletivamente a liberação de [³H] GABA, num determinado período do desenvolvimento embrionário da retina de galinha. Esses resultados relativos ao aumento da liberação de [³H] GABA, mas não da liberação de [³H] D-Aspartato, parecem semelhante aos dados encontrados no trabalho de Roberto e colaboradores

(2004) no qual eles demonstraram que o ETOH não alterava os níveis de outros aminoácidos na mesma amostra de dialisado, indicando também um efeito seletivo na liberação de GABA sob estas condições.

Estudos anteriores mostraram que o tratamento com altas concentrações de ETOH (100mM durante 4 dias) aumentava a expressão do RNAm para GAD67 (+21%) e do RNAm para o transportador vesicular de GABA (VGAT +112%) em culturas organotípicas de córtex de rato (Zink e Spanagel, 2005). Neste mesmo estudo, a expressão dos GATs não foi diferente das condições controle. Nossos resultados demonstram um aumento de 2 vezes nos níveis do RNAm para GAD65, mas não para GAD67, em secção de retina de embrião tratado com ETOH. Mesmo tendo um aumento nos níveis de RNAm para GAD65, não houve alteração na expressão da GAD, quando detectadas tanto por imunohistoquímica quanto por *Western Blot*. Assim, nossos estudos revelam que há uma dissociação no efeito do ETOH entre os níveis de RNAm e a expressão da proteína de síntese do GABA (GAD). Este resultado pode sugerir que o ETOH induza mudanças distintas nos processos de transcrição e tradução da GAD. Este fato também pôde ser observado em outro trabalho recente no qual não houve uma correlação entre a alteração do RNAm e a expressão de subunidades de receptores GABA_A em culturas de neurônios corticais de rato tratadas cronicamente com ETOH (Rani e Ticku, 2006). Além disso, trabalhos prévios do laboratório mostram que a GAD é uma enzima regulada por GABA de forma complexa, que envolve tanto modulação transcricional quanto traducional (de Almeida *et al.*, 2002).

A exposição crônica ao ETOH durante o período fetal altera a excitabilidade neuronal espontânea, a transmissão de AAE e aminoácidos inibitórios e a sensibilidade neuronal ao ETOH em cérebros adultos (Dubois *et al.*, 2006). Nesse sentido, Roberto e colaboradores (2003) relataram que o tratamento agudo com ETOH aumenta correntes inibitórias mediadas por receptores GABA_A, possivelmente por um mecanismo pré-sináptico no núcleo central da amígdala, uma região envolvida com a regulação do consumo do álcool e resposta ansiogênica à remoção do ETOH. Posteriormente, Roberto e colaboradores (2004) confirmaram dados prévios e mostraram que a transmissão GABAérgica tanto na exposição aguda quanto crônica ocorre a partir de um mecanismo pré-sináptico envolvendo potenciação da liberação vesicular de GABA. Entretanto, o mecanismo modulatório e a identificação do alvo pré-sináptico ainda permanecem desconhecidos.

Apesar de demonstrarmos um aumento na liberação de [³H] GABA, induzida por glutamato em retinas embrionárias de pinto tratadas com ETOH, também não identificamos qual(is) molécula(s) está(ao) envolvida(s) com este efeito. O fato de termos utilizado uma segunda metodologia baseada em imunohistoquímica, desenvolvida nos últimos anos por Andrade da Costa e colaboradores (2000, 2001) e Calaza e colaboradores (2001, 2003) fortalece a idéia de que o GABA é liberado em circuitos neuronais expostos previamente ao ETOH e que a liberação de GABA endógena se dá a partir de diferentes populações de células da retina *in situ*.

A exposição de retina a 2 mM de L-glutamato por 30 minutos diminuiu o número de células amácrinas GABA+, o que sugere uma maior liberação de GABA endógeno em retina de animais tratados com ETOH quando comparados com os tratados com PBS. Este efeito foi bloqueado completamente por antagonistas glutamatérgicos, MK-801 (5 μ M) e DNQX (100 μ M). NMDA também promoveu uma maior redução no número de células amácrinas GABA+ em retinas de embriões tratadas com ETOH de modo semelhante ao ocorrido na liberação de GABA endógeno induzido por glutamato. Este efeito também foi bloqueado completamente pelo seu antagonista, o MK-801 (5 μ M).

Portanto, foi observado um aumento na liberação de GABA induzido por receptores de NMDA na retina de embrião tratado com ETOH. Se este efeito apresenta semelhanças em termos de mecanismos ao encontrado na amígdala central mediante exposição aguda e crônica ao ETOH (Roberto *et al.*, 2003, 2004) ainda permanece a ser elucidado, pois a administração de ETOH afeta diversas subunidades dos receptores de diferentes formas, sendo que isto se deve não somente à quantidade de ETOH administrada, mas também a forma de exposição da droga e do local administrado.

Em 1991, de Mello e colaboradores descreveram a regulação da GAD induzida por GABA extracelular em retina de galinha. Sabendo-se que o ETOH apresenta múltiplos efeitos em sinapses GABAérgicas, decidimos investigar seu efeito na regulação da expressão da GAD. Para isso, culturas de células da retina tratada com ETOH (por 48 horas) em um estágio correspondente a embriões de 16 dias (E9C7) eram fixadas e marcadas para GAD. Nossos dados mostram que,

assim como o GABA, o ETOH diminui a expressão da GAD num mecanismo dependente da concentração. A expressão da GAD também foi reduzida por taurina (conhecida por ativar receptores GABA_A e GABA_B), mas não por baclofen (um agonista GABA_B), sugerindo que receptores GABA_A podem estar mediando este efeito. Entretanto, de Almeida *et al.* (2002) descreveu que o efeito de GABA em reduzir a expressão da GAD em culturas de agregados retinianos de aves não era mimetizado por THIP, baclofen ou CACA, agonista de receptores GABA_A, GABA_B, ou GABA_C respectivamente. Uma possibilidade seria a do ETOH estar induzindo a liberação de GABA endógeno e este, por sua vez, inibir a expressão da GAD. Nesse sentido, o mecanismo exato do ETOH na inibição da expressão da GAD permanece a ser definido.

Nossos dados mostram que o ETOH modula a expressão da GAD em cultura de célula retiniana de galinha, por outro lado, ao administrarmos ETOH *in ovo* em embriões de galinha, não houve alteração na expressão da GAD. Esta diferença provavelmente deve-se ao fato das diferentes condições experimentais utilizadas (*in vitro* ou *in vivo*). Além disso, o tempo de exposição e a forma de tratamento (agudo ou crônico) foram diferentes entre os experimentos. Como foi realizado somente um experimento (triplicata) *in vitro* é necessário repeti-lo para se certificar dos resultados obtidos.

CONCLUSÃO

1- A liberação de [³H] GABA induzida por glutamato é modulada em retinas de E16 de embrião de galinha tratados previamente com ETOH em E11, sendo este um efeito seletivo, pois não foi observada variação na liberação de [³H] D-Aspartato, nas mesmas condições.

2- Assim como na liberação de GABA exógeno, a liberação de GABA endógeno, em retinas de E16, induzida por glutamato e NMDA, também foi modulada em retinas de embriões de galinha injetados previamente com ETOH em E11.

3- Houve um aumento da expressão do RNAm para GAD65, mas não para GAD67, em retinas de E16 expostos ao ETOH em E11.

4- Não houve alteração na expressão da GAD, GAT1 e NR1, em retinas de embriões tratados com ETOH.

5- Na imunohistoquímica realizada, não houve diferença na expressão da GAD, GABA e NR1 em retinas de embriões tratados com ETOH.

6- Culturas mistas de células retinianas (E9C7) tratadas com ETOH (1-300mM) por 48h mostram uma redução da expressão da GAD semelhante ao observado com GABA (10mM) ou taurina, mas não baclofen.

7- Não houve morte celular em culturas mistas CTR e tratadas com diferentes concentrações de ETOH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAYO, L.G. & PANCETTI, F.C. Ethanol modulation of the gamma-aminobutyric acidA and glycine-activated Cl⁻ current in cultured mouse neurons. **J Pharmacol Exp Ther**, 270(1): pp. 61-69, 1994.

ANDRADE DA COSTA, B.L.; DE MELLO, F.G. & HOKOÇ, J.N. Transporter-mediated GABA release induced by excitatory amino acid agonist is associated with GAD-67 but not GAD-65 immunoreactive cells of the primate retina. **Brain Res**, 863(1-2): pp. 132-42, 2000.

BARNSTABLE, C.J. Glutamate and GABA in retinal circuitry. **Curr Opin Neurobiol**, 3(4): pp. 520-525, 1993.

BARROS, P.H.; CALAZA, K.C. & GARDINO, P.F. GABA(Abeta2-3) immunoreactive cells in the developing chick retina. **Int J Dev Neurosci**, 21: pp. 35-40, 2003.

BATESON, A.N.; LASHAM, A. & DARLISON, M.G. Gamma-Aminobutyric AcidA receptor heterogeneity is increased by alternative splicing of a novel beta-subunit gene transcript. **J Neurochem**, 56(4): 1437-1440, 1991.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W. & PARADISO, M.A. Neuroscience: exploring brain. 1996.

BERNATH, S. Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? **Prog Neurobiol**, 38: pp. 57-91, 1992.

BHAVE, S.V. & HOFFMAN, P.L. Ethanol promotes apoptosis in cerebellar granule cells by inhibiting the trophic effect of NMDA. **J Neurochem**, 68(2): pp. 578-586, 1997.

BLAUSTEIN, M.P. & KING, A.C. Influence of Membrane Potential on the Sodium-Dependent Uptake of Gamma-Aminobutyric Acid by Presynaptic Nerve Terminals: Experimental Observations and Theoretical Considerations. **Journal Membrane Biology**, 30(2): pp. 153-173, 1976.

BOEHM, S.L.; PONOMAREV, I.; BLEDNOV, Y.A. & HARRIS, R.A. From gene to behavior and back again: new perspectives on GABAA receptor subunit selectivity of alcohol actions. **Adv Pharmacol**, 54: pp.171-203, 2006.

BORDEN, L.A. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. **Neurochem Int**, 29(4): pp. 335-356, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72: pp. 248-54, 1976.

BREDARIOL, A.S.S & HAMASSAKI-BRITTO, D.E. Ionotropic glutamate receptors during the development of the chick retina. **J Comp Neurol**, 441: 58-70, 2001.

BREESE, G.R.; CRISWELL, H.E.; CARTA, M.; DODSON, P.D.; HANCHAR, H.J.; KHISTI, R.T.; MAMELI, M.; MING, Z.; MORROW, A.L.; OLSEN, R.W.; OTIS, T.S.; PARSONS, L.H.; PENLAND, S.N.; ROBERTO, M.; SIGGINS, G.R.; VALENZUELA, C.F. & WALLNER, M. Basis of the gabamimetic profile of ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, 30(4): pp. 731-44, 2006.

CALAZA, K.C.; DE MELLO, F.G. & GARDINO, P.F. GABA release induced by aspartate-mediated activation of NMDA receptors is modulated by dopamine in a selective subpopulation of amacrine cells. **J Neurocytol**, 30: pp. 181-193, 2001.

CALAZA, K.C.; DE MELLO, F.G. & GARDINO, P.F. Local differences in GABA release induced by excitatory amino acids during retina development: selective activation of NMDA receptors by aspartate in the inner retina. **Neurochem Res**, 28: 1475-1485, 2003.

CALAZA, K.C.; HOKOÇ, J. N. & GARDINO, P.F. GABAergic circuitry in the possum retina: a GABA release induced by L-aspartate. **Experimental Brain Res**, 172: pp. 322-330, 2006a.

CALAZA, K.C.; GARDINO, P.F. & DE MELLO, F.G. Transporter mediated GABA release in the retina: role of excitatory amino acids and dopamine. **Neurochem Int**, 49: 769-777, 2006b.

CAMPOCHIARO, P.; FERKANY, J.W. & COYLE, J.T. The dissociation of evoked release of [3H]-GABA and of endogenous GABA from chick retina in vitro. **Exp Eye Res**, 39(3): pp. 299-305, 1984.

CHATTERTON, J.E.; AWOBULUYI, M.; PREMKUMAR, L.S.; TAKAHASHI, H.; TALANTAVOTA, M.; SHIN, Y.; CUI, J.; TU, S.; SEVARINO, K.A.; NAKANISHI, N.; TONG, G.; LIPTON, S.A. & ZHANG, D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. **Nature**, 415: pp. 793-798, 2002.

CHAUDHURI, J.D. Alcohol and developing fetus: a review. **Med Sci Monit**, 6(5): pp. 1031-41, 2000.

CHMIELEWSKI, C.E.; HERNANDEZ, L.M.; QUESADA, A.; POZAS, J.A.; PICABEA, L. & PRADA, F.A. Effects of ethanol on the inner layers of chick retina during development. **Alcohol**, 14: pp. 313-7, 1997.

COLLINGRIDGE, G.L. & LESTER, R.A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol Rev**, 41(2): pp. 143-210, 1989.

COTMAN, C.W.; MONAGHAN, D.T.; OTTERSEN, O.P. & STORM-MATHIESEN, J. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. **Trends in Neuroscience**, 10: pp. 273-280, 1987.

CREWS, F.T.; MORROW, A.L.; CRISWELL, H. & BREESE, G. Effects of ethanol on ion channels. **Int Rev Neurobiol**, 39: pp. 283-367, 1996.

CRISWELL, H.E. & BREESE, G.R. A conceptualization of integrated actions of ethanol contributing to its GABA-mimetic profile: a commentary. **Neuropsychopharmacology**, 30: pp. 1407-25, 2005.

CUNHA, R.A., CONSTANTINO, M.D. & RIBEIRO, J.A. Inhibition of [3H] gamma-aminobutyric acid release by kainate receptor activation in rat hippocampal synaptosomes. **Eur J Pharmacol**, 323(2-3): pp. 167-72, 1997.

DAS, S.; SASAKI, Y.F.; ROTHE, T.; PREMKUMAR, L.S.; TAKASU, M.; CRANDALL, J.E.; DIKES, P.; CONNER, D.A.; RAYUDU, P.V.; CHEUNG, W.; CHEN, H.S.; LIPTON, S.A. & NAKANISHI, N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. **Nature**, 393: pp.377-381, 1998.

DE ALMEIDA, O.M.; GARDINO, P.F.; SANTOS N.E.L.; YAMASAKI, E.N.; DE MELLO, M.C.; HOKOÇ, J.N. & DE MELLO, F.G. Opposite roles of GABA and excitatory amino acids on the control of GAD expression in cultured retina cells. **Brain Res**, 925: 89-99, 2002.

DE MELLO, F.G., BACHRACH, U. & NIRENBERG, M. Ornithine and glutamic acid decarboxylase activities in the developing chick retina. **J Neurochem**, 27: 847-851, 1976.

DE MELLO, F.G.; HOKOÇ, J.N.; VENTURA, A.L. & GARDINO, P.F. Glutamic acid decarboxylase of embryonic avian retina cells in culture: regulation by gamma-aminobutyric acid (GABA). **Cell Mol Neurobiol**, 11: pp. 485-96, 1991.

DEUPREE, D.L., TANG, X.W., YAROM, M., DICKMAN, E., KIRCH, R.D., SCHLOSS, J.V. & WU, J.Y. Studies of NMDA and non-NMDA-mediated neurotoxicity in cultured neurons. **Neurochem Int**, 29: pp. 255-261, 1996.

DEVAUD, L.L.; FITSCHY, J.M.; SIEGHART, W. & MORROW, A.L. Bi-directional alterations of GABAA receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. **J Neurochem**, 69: pp. 126-30, 1997.

DIAZ, G.J.; SPUHLER, P.K.; LILLIQUIST, M.W.; AMSEL, A. & LESLIE, S.W. Effects of prenatal and early postnatal ethanol exposure on [³H] MK 801 binding in rat cortex and hippocampus. **Alcohol Clin Exp Res**, 21: pp. 874-881, 1997.

DO NASCIMENTO, J.L.M. & DE MELLO, F.G. Induced release of gamma-aminobutyric acid by a carrier-mediated high-affinity uptake of L-glutamate in cultured chick retina cells. **J Neurochem**, 45: pp. 1820-1827, 1985.

DOWLING, J.E. The retina approachable part of the brain. **The Belknap Press of Harvard University Press**, 1987.

DUBOIS, C.; NAASSILA, M.; DAOUST, M. & PIERREFICHE, O. Early chronic ethanol exposure in rats disturbs respiratory network activity and increases sensitivity to ethanol. **J Physiol**, 576: pp. 297–307, 2006.

FADDA, F. & ROSSETTI, Z.L. Chronic ethanol consumption: From neuroadaptation to neurodegeneration (review). **Prog Neurobiol**, 56: pp. 385-431, 1998.

FELDMAN, R.S. & QUENZER, L.F. Fundamentals of neuropsychopharmacology. **Sunderland**, 1984.

FINK, K. & GOTHERT, M. Both ethanol and ifenprodil inhibit, NMDA-evoked release of various neurotransmitters at different, yet proportional potency: Potential relation to NMDA receptor subunit composition. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmac**, 354: pp. 312-319, 1996.

FLETCHER, E.L.; HACK, I.; BRANDSTÄTTER, J.H. & WÄSSLE, H. Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. **J Comp Neurol**, 420: pp. 98-112, 2000.

FLINT, A.C.; MAISCH, U.S.; WEISHAUP, J.H.; KRIEGSTEIN, A.R. & MONYER, H. NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. **J Neurosci**, 17(7): pp. 2469-76, 1997.

FREUND, G. & ANDERSON, K.J. Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. **Alcohol Clin Exp Res**, 20: pp. 1165-1172, 1996.

FOLLESA, P. & TICKU, M.K. Chronic ethanol treatment differentially regulates NMDA receptor subunit mRNA expression in rat brain. **Brain Res Mol Brain Res**, 29: pp. 99-106, 1995.

GE, S.; PRADHAN, D.A.; MING, G.L. & SONG, H. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. **Trends Neurosci**, 30(1): pp. 1-8, 2007.

GRILLY, D.M. **Drugs and human behavior**. 4th ed. Toronto: Allyn and Bacon; 2002.

GROBIN, A.C.; PAPADEASB, S.T. & MORROW, A.L. Regional variations in the effects of chronic ethanol administration on GABA(A) receptor expression: Potential mechanisms. **Neurochem Int**, 37: pp. 453-461, 2000.

GRÜNDER, T.; KOHLER, K.; KALETTA, A. & GUENHTER, E. The distribution and developmental regulation of NMDA receptor subunit proteins in the outer and inner retina of the rat. **J Neurobiol**, 44: pp. 333-342, 2000.

GUSTINCICH, S.; FEIGENSPAN, A.; WU, D.K.; KOOPMAN, L.J. & RAVIOLA, E. Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks. **Neuron**, 18(5): pp. 723-36, 1997.

HAMBURGER, V. & HAMILTON, H.L. A serial of normal stages in the development of the chick embryo. **J. Morphol**, 88: pp .49-92, 1951.

HANSON, J.W.; STREISSGUTH, A.P. & SMITH, D.W. The effects of moderate alcohol consumption during pregnancy on fetal growth and morphogenesis. **J Pediatr**, 92(3): pp. 457-60, 1978.

HARRIS, R. A.; MIHIC, S. J., & VALENZUELA, C. F. Alcohol and benzodiazepines: recent mechanistic studies. **Drug Alcohol Depend**, 51: pp. 155-164, 1998.

HENDRICKSON, A. & ERICKSON, A. Development of two glutamic acid decarboxylase (GAD) enzymes in Macaca monkey retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 34: 1220, 1993.

HOFMANN, H.D. & MOCKEL, V. Release of gamma-amino [³H] butyric acid from cultured amacrine-like neurons mediated by different excitatory amino acids. **J Neurochem**, 56: pp. 923-932, 1991.

HOFFMAN, P.L. Glutamate receptors in alcohol withdrawal-induced neurotoxicity. **Metab Brain Dis**, 10: pp. 73-79, 1995.

HOFFMAN, P.L.; RABE, C.S.; GRANT, K.A.; VALVERIUS, P.; HUDSPITH, M. & TABAKOFF, B. Ethanol and the NMDA receptor. **Alcohol**, 7: pp. 229-231, 1990.

HOFFMAN, P.L.; RABE, C.S.; MOSES, F. & TABAKOFF, B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: Inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. **J Neurochem**, 52: pp. 1937-1940, 1989.

HOFFMAN, P.L. & TABAKOFF, B. Ethanol, sedative hypnotics and glutamate receptor function in brain and cultured cells. **Alcohol Alcohol Suppl**, 2: pp. 345-51, 1993.

HOFFMAN, P.L. & TABAKOFF, B. Alcohol dependence: a commentary on mechanisms. **Alcohol Alcohol**, 31(4): pp. 333-40, 1996.

HONORÉ, T., DAVIES, S.N., DREJER, J., FLETCHER, E.J., JACOBSEN, P., LODGE, D. & NIELSEN, F.E. Quinoxalinediones: Potent Competitive Non-NMDA Glutamate Receptors Antagonists. **Science**, 245: pp. 701-703, 1988.

HOKOÇ, J.N.; VENTURA, A.L.M.; GARDINO, P.F. & DE MELLO, F.G. Developmental immunoreactivity for GABA and GAD in the avian retina: possible alternative pathway for GABA synthesis. **Brain Res**, 532: pp. 197-202, 1990.

HOYME, H.E.; MAY, P.A.; KALBERG, W.O.; KODITUWAKKU, P.; GOSSAGE, J.P.; TRUJILLO, P.M.; BUCKLEY, D.G.; MILLER, J.H.; ARAGON, A.S; KHAOLE, N.; VILJOEN, D.L.; JONES, K.L. & ROBINSON, L.K. A practical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 Institute of Medicine criteria. **Pediatrics**, 115(1): pp. 39-47, 2005.

HU, J.H.; MA, Y.H.; YANG, N.; MEI, Z.T.; ZHANG, M.H. & FEI, J. Up-regulation of gamma-aminobutyric acid transporter 1 mediates ethanol sensitivity in mice. **Neuroscience**, 123: pp. 807-812, 2004.

JENSEN, O. & LISMAN, J.E. Theta/gamma networks with slow NMDA channels learn sequences and encode episodic memory: Role of NMDA channels in recall. **Learn Mem**, 3: pp. 264-278, 1996.

JENTSCH, T.J.; STEIN, V.; WEINREICH, F. & ZDEBIK, A.A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. **Physiol Rev** **Apov**, 82 (2): pp. 503-568, 2002.

KALLURI, H.S.; MEHTA, A.K. & TICKU, M.K. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. **Brain Res Mol Brain Res**, 58(1-2): pp. 221-224, 1998.

KAMIYA, H. Kainate receptor-dependent presynaptic modulation and plasticity. **Neurosci Res**, 42: pp. 1-6, 2002.

KANAANI, J.; LISSIN, D.; KASH, S.F. & BAEKKESKOV, S. The hydrophilic isoform of glutamate decarboxylase, GAD67, is target to membranes and nerve terminals independent of dimerization with the hydrophobic membrane-anchored isoform. GAD65. **J Biol Chem**, 274: pp. 37200-37209, 1999.

KANNER, B.I. Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. **J Exp Biol**, 196: pp. 237-249, 1994.

KEMP, J.A.; FOSTER, A.C. & WONG, H.F. Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. **TINS**, 10 (7): pp. 294-298, 1987.

KEMP, J.A. & LEESON, P.S. The glycine site of the NMDA receptor-five years on. **Trends Pharmacol Sci**, 141: pp. 20-25, 1993.

KOZLOWSKI, D.A.; HILLILARD, S. & SCHALLERT, T. Ethanol consumption following recovery from unilateral damage to the forelimb area of the sensorimotor cortex: Reinstatement of deficits and prevention of dendritic pruning. **Brain Res**, 763: pp. 159-166, 1997.

KRISTIANSEN, L.V.; HUERTA, I.; BENEYTO, M. & MEADOR-WOODRUFF, J.H. NMDA receptors and schizophrenia. **Curr Opin Pharmacol**, 7(1): pp. 48-55, 2007.

KRYSTAL, J.H.; PETRAKIS, I.L.; KRUPITSK, E.; SCHUTZ, C.; TREVISAN, L. & D'SOUZA, D.C. NMDA Receptor Antagonism and the Ethanol Intoxication Signal: From Alcoholism Risk to Pharmacotherapy. **Ann N Y Acad Sci**, 1003: pp. 176-184, 2003.

KUMARI, M. & TICKU, M.K. Ethanol and regulation of the NMDA receptor subunits in fetal cortical neurons. **J Neurochem**, 70: pp.1467-1473, 1998.

KUMARI, M. & TICKU, M.K. Regulation of NMDA receptors by ethanol. **Prog Drug Res**, 54: pp. 153-189, 2000.

LAURIE, D.K.; BARTKE, I.; SCHOEPFER, R.; NAUJOKS, K. & SEEBURG, P.H. Regional, developmental and interspecies expression of the four NMDAR2 subunits, examined using monoclonal anti-bodies. **Brain Res Mol Brain Res**, 51: pp. 23-32, 1997.

LERMA, J. Spermine Regulates N-Methyl-D-Aspartate Receptor Desensitization. **Neuron**, 8: pp. 343-352, 1992.

LÓPEZ-COSTA, J.J.; GOLDSTEIN, J.; PECCI-SAAVEDRA, J.; MAGGIORE, V.M.D.; DE LAS HERA, M.A.; SARMIENTO, M.I.K & ROSENSTEIN, R.E. GABA release mechanism in the golden hamster retina. **Int J Neurosci**, 98: pp. 13-25, 1999.

LOVINGER, D.M.; WHITE, G. & WEIGHT, F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. **Science**, 243: pp. 1721-1724, 1989.

LOVINGER, D.M. Excitotoxicity and Alcohol-Related Brain Damage. **Alcohol Clin Exp Res**, 17: pp. 19-27, 1993.

LOVINGER, D.M. 5HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: An increasingly exciting topic. **Neurochem Int**, 35: pp. 125-130, 1999.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193(1): 265-275, 1951.

LUDDENS, H.; KORPI, E.R. & SEEBURG, P.H. Gaba_A/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. **Neuropharmacology**, 34: 245-254, 1995.

MARTIN, D.L. & RIMVALL, K. Regulation of γ aminobutyric acid synthesis in the brain. **J Neurochem**, 60(2): 395-407, 1993.

MATTHEWS, D.B.; KRALIC, J.E.; DEVAUD, L.L.; FRITSCHY, J.M. & MORROW, A.L. Chronic blockade of N-methyl-D-aspartate receptors alters gamma-aminobutyric acid type A receptor peptide expression and function in the rat. **J Neurochem**, 74: 1522-1528, 2000.

MCBAIN, C.J. & FISAHN, A. Interneurons unbound. **Nat Rev Neurosci**, 2: pp. 11-23, 2006.

MCBAIN, C.J. & MAYER, M.L. N-Metil-D-Aspartic acid receptor structure and fuction. **Physiol Rev**, 74: pp.723-760, 1994.

MCKERNAN, R.M & WHITING, P.J. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? **Trends in Neurosc**, 19(4): pp. 139-143, 1996.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, 130(4S Suppl): pp. 1007S-1015S, 2000.

MELIS, F.; STANCAMPIANL, R.; IMPERATO, A.; CARTA, G. & FADDA, F. Chronic ethanol consumption in rats: Correlation between memory performance hippocampal acetylcholine release in vivo. **Neuroscience**, 74: pp. 155-159, 1996.

MEONI, P.; BUNNEMANN, B.H.; TRIST, D.G. & BOWERU, N.G. N-terminal splice variants of the NMDAR1 glutamate receptor subunit: Differential expression in human and monkey brain. **Neurosci Lett**, 249: pp. 45-48, 1998.

MONTPIED, P.; MORROW, A.L.; KARANIAN, J.W.; GINNS, E.I.; MARTIN, B.M. & PAUL, S.M. Prolonged ethanol inhalation decreases gamma-amino-butyric acid A

receptor alpha subunit mRNA s in the rat cerebral cortex. **Mol Pharmacol**, 39: pp. 157-163, 1991.

MONYER, H.; BURNASHEV, N.; LAURIE, D.J.; SAKMANN, B. & SEEBURG, P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron**, 12(3): 529-540, 1994.

MOSINGER, J. L.; YAZULLA, S. & STUDHOLME, K. M. GABA-like immunoreactivity in the vertebrate retina: A species comparison. **Experimental Eye Research**, 42: pp. 631-644, 1986.

MOTHET, J.P.; PARENT, A.T.; WOLOSKER, H.; BRADY, R.O.; LINDEN, D.J.; FERRIS, C.D.; ROGAWSKI, M.A. & SNYDER, S.H. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97(9): pp. 4926-31, 2000.

NEVO, I. & HAMON, M. Neurotransmitter and Neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism (review). **Neurochem Int**, 26: pp. 305-336, 1995.

NOBLE, E.P. Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: A review. **Eur Psychiatry**, 15: 79-89, 2000.

OLNEY, J.W.; WOZNIAK, D.F.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V. & IKONOMIDOU, C. Glutamate signaling and the fetal alcohol syndrome. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, 7(4): pp. 267-75, 2001.

OSBORNE, N.N. & HERRERA, A.J. The effect of experimental ischemia and excitatory amino acids agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina. **Neuroscience**, 59: 1071-1081, 1994.

PAES-DE-CARVALHO, R. & DE MELLO, F.G. Adenosine-elicited accumulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in the chick embryo retina. **J Neurochem**, 38(2): pp. 493-500, 1982.

PAES-DE-CARVALHO, R.; BRASS, K.M.; SNYDER, S.H. & ADLER, R. Analysis of adenosine immunoreactivity, uptake, and release in purified cultures of developing chick embryo retinal neurons and photoreceptors. **J Neurochem**, 55(5): pp. 1603-1611, 1990.

PARSON, SH.; DHILLON, B.; FINDLATER, G.S. & KAUFMAN, M.H. Optic nerve hypoplasia in the fetal alcohol syndrome: a mouse model. **J Anat**, 186 (Pt 2): 313-20, 1995.

PEOPLES, R.W. & WEIGHT, F.F. Cutoff in potency implicates alcohol inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. **J Neurosci**, 17: pp. 5711-5725, 1997.

PRITCHETT, D.B.; SONTHEIMER, H.; SHIVERS, B.D.; YMER, S.; KETTENMANN, H.; SCHOFIELD, P.R. & SEEBURG, P.H. Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. **Nature**, 13,338(6216): pp. 582-585, 1989.

RAFIKI, A.; BERNARD, A.; MEDINA, I.; GOZLAN, H. & KHRESTCHATISKY, M. Characterization in cultured cerebellar granule cells and in the developing rat brain of mRNA variants for the NMDA receptor 2C subunit. **J Neurochem**, 74: pp. 1798-1808, 2000.

RANI, C.S.S. & TICKU, M.K. Comparison of chronic ethanol and chronic intermittent ethanol treatments on the expression of GABA_A and NMDA receptor subunits. **Alcohol**, 38: pp. 89-97, 2006.

REMA, V. & EBNER, F.F. Effect of enriched environment rearing on impairments in cortical excitability and plasticity after prenatal alcohol exposure. **J Neurosci**, 19(24):10993-1006, 1999.

REIS, R.A.M.; KUBRUSLY, R.C.C.; DE MELLO, M.C.F. & DE MELLO, F.G. Transient coupling of NMDA receptor with ip3 production in cultured cells of the avian retina. **Neurochem Int**, 26: pp. 375-380, 1995.

ROBERTO, M.; MADAMBA, S.G.; MOORE, S.D.; TALLENT, M.K. & SIGGINS, G.R. Ethanol increases GABAergic transmission at both pre-and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100: pp.2053-2058, 2003.

ROBERTO, M.; MADAMBA, S.G.; STOUFFER, D.G.; PARSONS, L.H. & SIGGINS, G.R. Increased GABA release in the central amygdala of ethanol-dependent rats. **J Neurosci**, 24: pp. 10159-10166, 2004.

ROBINSON, D.L.; LARA, J.A.; BRUNNER, L.J. & GONZALES, R.A. Quantification of ethanol concentration in the extracellular fluid of the rat brain: in vivo calibration of microdialysis probes. **J Neurochem**, 75: pp. 1685 -1693, 2000.

RON D. Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol. **Neuroscientist**, 10: pp. 325-336, 2004.

SAMSON, H.H. & HARRIS, R.A. Neurobiology of alcohol abuse. **Trends Pharmacol Sci**, 13: pp. 206-211, 1992.

SARTHY, V., RIPPS, H. The Retinal Müller Cell – Structure and function. **Kluwer Academic, New York**, pp. 278, 2001.

SCHOFIELD, P.R.; DARLSON, M.G.; FUJITA, N.; BURT, D.R.; STEPHENSON, F.A.; RODRIGUEZ, H.; RHEE, L.M.; RAMACHANDRAN, J.; REALE, V. & GLENCORSE, T.A. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. **Nature**, 328: pp.221-227, 1987.

SCHOUSBOE, A. Pharmacological and functional characterization of astrocytic GABA transport: a short review. **Neurochem Res**, 25: pp. 1241-4, 2000.

SCHWARTZ, E.A. Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the rod retina. **J Physiol**, 323: pp. 211-227, 1982.

SEEMAN, P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. **Pharmacol Rev**, 24(4): pp. 583-655, 1972.

SEQUEIRA, S.M.; MALVA, J.O.; CARVALHO, A.P. & CARVALHO, C.M. Presynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activation inhibits neurotransmitter release through nitric oxide formation in rat hippocampal nerve terminals. **Brain Res Mol Brain Res**, 89(1-2): pp. 111-8, 2001.

SHEFNER, S.A. Electrophysiological effects of ethanol on brain neurons. In: Watson RR, ed. *Biochemistry and Physiology of Substance Abuse*. Boca Raton, **CRC Press** 2: pp. 25-52, 1990.

SHEIKH, S.N. & MARTIN, D.L. Heteromers of glutamate decarboxylase isoforms occur in rat cerebellum. **J Neurochem**, 66: pp. 2082-2090, 1996.

SIEGAL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; FISHER, S.K. & UHLER, M.D. Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects. Philadelphia: **Lippincott, Williams & Wilkins**; 1999.

SNELL, L.D.; NUNLEY, K.R.; LICKTEIG, R.L.; BROWNING, M.D.; TABAKOFF, B. & HOFFAMAN, P.L. Regional and subunit specific changes in NMDA receptor mRNA and immunoreactivity in mouse brain following chronic ethanol ingestion. **Mol Brain Res**, 40: pp. 71-78, 1996.

SOGHOMONIAN, J.J. & MARTIN, D.L. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? **Trends Pharmacol Sci**, 19: pp. 500-505, 1998.

STROMLAND, K. & PINAZO-DURAN, M.D. Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. **Alcohol Alcohol**, 37(1): pp. 2-8, 2002.

SUNDSTROM-POROMAA, I.; SMITH, D.H.; GONG, Q.H.; SABADO, T.N.; LI, X.; LIGHT, A.; WIEDMANN, M.; WILLIAMS, K. & SMITH, S.S. Hormonally regulated alpha(4)beta(2)delta GABA_A receptors are a target for alcohol. **Nat Neurosci**, 5: pp. 721-722, 2002.

TAPIA, R. & ARIAS, C. Selective stimulation of neurotransmitter release from chick retina by kainic and glutamic acids. **J Neurochem**, 39: pp. 1169-1178, 1982.

TOVAR, K.R. & WESTBROOK, G.L. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. **J Neurosci**, 19(10): pp. 4180-8, 1999.

TSAI, G. Glutamatergic Neurotransmission in Alcoholism. **J Biomed Sci**, 5: pp. 309-320, 1998.

TUFAN, A.C.; ABBAN, G.; AKDOGAN, I.; ERDOGAN, D. & OZOGUL, C. The effect of in ovo ethanol exposure on retina and optic nerve in a chick embryo model system. **Reprod Toxicol**, 23(1): pp. 75-82, 2007.

WAAGEPETERSEN, H.S.; SONNEWALD, U. & SCHOUSBOE, A. The GABA paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter and neurodifferentiative agent. **J Neurochem**, 73: pp. 1335-1342, 1999.

WALLNER, M.; HANCHAR, H.J. & OLSEN, R.W. Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100: 15218-15223, 2003.

WATANABE, M., MISHINA, M. & INOUE, Y. Differential distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the mouse retina. **Brain Res**, 634: pp. 328-332, 1994.

WEINER, J.L.; ZHANG, L. & CARLEN, P.L. Potentiation of GABA-A-mediated synaptic current by ethanol in hippocampal CA1 neurons: Possible role of protein kinase C. **J Pharmacol Exp Ther**, 268: pp. 1388-1395, 1994.

WEISS, F. & PORRINO, L.J. Behavioural Neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. **J. Neurosci**, 22: pp. 3332-3337, 2002.

WITTE, D.P. Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory amino acids causes craving for ethanol. **Addictive Behaviors**, 29: pp. 1325-1339, 2004.

WRIGHT, J.M.; PEOPLES, R.W. & WEIGHT, F.F. Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. **Brain Res**, 738: pp. 249-256, 1996.

WU, Q.; WADA, M.; SHIMADA, A.; YAMAMOTO, A. & FUJITA, T. Functional characterization of Zn²⁺(+)-sensitive GABA transporter expressed in primary cultures of astrocytes from rat cerebral cortex. **Brain Res**, 1075: pp. 100-109, 2006.

VERKHRATSKY, A. & KIRCHHOFF, F. NMDA Receptors in glia. **Neuroscientist**, 13(1): pp. 28-37, 2007.

YAN, Q.S.; REITH, M.E.A.; YAN, S.G. & JOBE, P.C. Effect of systemic ethanol on basal and stimulated glutamate release in the nucleus accumbens of freely moving Sprague-Dawley rats: A microdialysis study. **Neurosci Lett**, 258: pp. 29-32, 1998.

YANG, X.L. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. **Prog Neurobiol**, 73(2): pp. 127-50, 2004.

ZINK, M. & SPANAGEL, R. Ethanol induces GAD67 and VGAT in slice cultures of newborn rat cerebral cortex. **Developmental Neuroscience**, 16: pp. 377-380, 2005.

ZISKIND-CONHAIM, L.; GAO, B.X. & HINCKLEY, C. Ethanol dual modulatory actions on spontaneous postsynaptic currents in spinal motoneurons. **J Neurophysiol**, 89(2): pp. 806-13, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)