

Exposição pré-natal ao etanol: toxicidade, biomarcadores e métodos de detecção

Prenatal exposure to ethanol: toxicity, biomarkers and detection methods

CARINA CASSINI¹, RAFAEL LINDEN²

¹ Farmacêutica, Especialista em Toxicologia Forense pela Universidade Feevale.

² Professor Titular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Feevale.

Recebido: 20/12/2010 – Aceito: 4/4/2011

Resumo

Contexto: A exposição pré-natal ao etanol pode produzir diversos efeitos adversos no desenvolvimento fetal denominados doença espectral do alcoolismo fetal (DEAF). A detecção precoce de exposição ao etanol permite que medidas preventivas sejam tomadas para minimizar os efeitos adversos da exposição. **Objetivos:** O presente trabalho teve como objetivo revisar os principais efeitos tóxicos do etanol no neonato e os biomarcadores de exposição ao álcool. **Métodos:** Foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed utilizando os descritores “*effects maternal ethanol exposure*” e “*biomarkers ethanol prenatal exposure*”, além de referências cruzadas dos artigos selecionados. **Resultados:** Diversos efeitos adversos no desenvolvimento fetal têm sido descritos, especialmente os prejuízos no sistema nervoso central. Os biomarcadores de exposição mais citados na literatura são os etil ésteres de ácidos graxos (EEAG), etil glicuronídeo (EtG) e etil sulfato (EtS) utilizando meconônio e cabelo como matriz biológica. **Conclusão:** A detecção precoce de exposição ao álcool na vida intrauterina pode ser realizada e é um instrumento para prevenir efeitos secundários, porque possibilita a intervenção farmacológica e educacional na criança com DEAF.

Cassini C, Linden R / *Rev Psiq Clín.* 2011;38(3):116-21

Palavras-chave: Exposição pré-natal ao etanol, doença espectral do alcoolismo fetal, biomarcadores de exposição ao etanol.

Abstract

Background: Prenatal exposure to ethanol can produce a complex set of effects on fetal development, which is denominated fetal alcohol spectrum disorder (FASD). Early detection of ethanol exposure can allow the prevention of some relevant adverse effects associated to FASD. **Objectives:** The aim of this work was to review the main toxic effects of ethanol on the neonate and the available biomarkers of prenatal alcohol exposure. **Methods:** A bibliographic search was performed in PubMed employing the terms “*effects maternal ethanol exposure*” and “*biomarkers ethanol prenatal exposure*” and cross references. **Results:** Many adverse effects on fetal development were described, especially deficits in the central nervous system. The biomarkers of ethanol exposure more widely described were fatty acid ethyl esters (FAEEs), ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulphate (EtS), being meconium and hair the most common biological matrices for laboratorial evaluation. **Discussion:** The early detection of alcohol exposure in intra-uterine life is useful to prevent the secondary effects of FASD through pharmacologic and educational intervention in affected children.

Cassini C, Linden R / *Rev Psiq Clín.* 2011;38(3):116-21

Keywords: Prenatal ethanol exposure, fetal alcohol spectrum disorder, ethanol exposure biomarkers.

Introdução

O consumo excessivo de álcool durante a gravidez é perigoso ao feto, podendo levar ao nascimento prematuro, retardo físico e do desenvolvimento mental e até à morte do neonato¹. A intervenção farmacológica e educacional da criança exposta ao etanol *in utero* pode ser mais eficiente se for possível a identificação precoce da exposição².

A determinação e a quantificação de etil éster de ácidos graxos (EEAG), etil glicuronídeo (EtG) e etil sulfato (EtS) têm sido utilizadas para avaliar a exposição intrauterina ao álcool por meio de diversos métodos analíticos²⁻⁴. A avaliação desses metabólitos em matrizes biológicas como o meconônio e o cabelo do neonato reflete o uso crônico de etanol no segundo e terceiro trimestre de gestação^{5,6}. Outras amostras, como a placenta, podem ser usadas para avaliação do uso de drogas durante o primeiro trimestre⁶. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo realizar uma análise crítica da literatura sobre os efeitos da exposição ao etanol em neonato (e no desenvolvimento pós-natal), as principais matrizes biológicas para avaliação desse tipo de exposição e os principais biomarcadores utilizados para a detecção da exposição intrauterina ao etanol.

Métodos

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed utilizando os descritores de assunto “*effects maternal ethanol exposure*”

e “*biomarkers ethanol prenatal exposure*” e referências cruzadas dos artigos selecionados, incluindo artigos publicados até novembro de 2010.

Resultados e discussão

Efeitos da exposição pré-natal ao álcool

A busca bibliográfica a respeito dos efeitos da exposição pré-natal ao etanol mostrou um total de 913 estudos com humanos e animais relatando diferentes efeitos tóxicos ao etanol. Serão abordados os principais temas de toxicidade encontrados.

O excesso de ingestão de bebidas alcoólicas é um sério problema de saúde pública que acomete o mundo inteiro. Os problemas com álcool são gerados por muitos fatores como pessoais, sociais e de saúde. Os efeitos sobre a saúde pública são mais preocupantes quando se trata de mulheres e crianças. Estudos concordam que as mulheres são mais vulneráveis aos efeitos do etanol por suas peculiaridades fisiológicas, metabólicas e hormonais^{7,8}. O uso de álcool, associado a outros fatores como gravidez indesejada, baixa renda, estresse e violência durante o período gestacional, contribui para o aparecimento de doenças psiquiátricas maternas como episódios de mania, depressão maior e até risco de suicídio⁹⁻¹¹. Crianças expostas ao álcool desde a concepção e durante o seu desenvolvimento podem sofrer efeitos dramáticos. A exposição pré-natal intensa ao etanol pode produzir significativos e severos danos cerebrais e disfunções comportamentais, sendo esses sintomas os principais critérios de diagnóstico da síndrome alcoólica

fetal (SAF). Entretanto, nem sempre o neonato exposto nasce com SAF e, apesar de alguns déficits neurocomportamentais serem frequentemente relatados nessa síndrome (por exemplo, hiperatividade e déficit de atenção, déficit na coordenação motora, dificuldade em socializar-se, déficits na cognição, habilidade matemática, fluência verbal e memória espacial), não existe um consenso para o fenótipo específico da SAF. Tem-se utilizado, portanto, outro termo – doença espectral do alcoolismo fetal (DEAF) –, que engloba todos os efeitos do etanol, até mesmo de uma exposição moderada^{11,12}. O álcool é teratogênico especialmente no primeiro trimestre de gravidez e os seus efeitos são dose-dependentes. Apesar de os efeitos da exposição se relacionarem com diversos outros fatores, não se conhece uma dose segura na gestação, sendo aconselhável, dessa forma, realizar abstinência alcoólica na gravidez¹².

Danos neuroteratogênicos

Prejuízo da memória, atenção e aprendizado são os efeitos mais comuns da SAF, que é também a causa de retardo mental passível de prevenção mais comum¹³. O quociente de inteligência (QI) médio de crianças com SAF é estimado ser abaixo de 70, porém muitas delas não apresentam retardo mental e o QI se apresenta numa escala de 20 a 120. Distúrbio da hiperatividade e déficit de atenção (ADHD) é a comorbidade psiquiátrica mais frequente diagnosticada em crianças expostas ao etanol. Além disso, disfunção motora como tremores, incoordenação dos olhos e mãos também estão descritos e persistem até a vida adulta em populações intensamente expostas¹⁴. Os danos cerebrais exercidos pelo etanol que levam a esse fenótipo provêm de diversos mecanismos. Em geral, ocorre a ativação de vias de indução de morte celular pela formação de moléculas tóxicas e o prejuízo do desenvolvimento neuronal por inibição de fatores neurotróficos e déficit de energia celular, que serão abordados a seguir.

O álcool prejudica a energia celular por alterar o transporte e a utilização de glicose, provocando déficit no neurodesenvolvimento^{11,15,16}. A inibição da produção local de insulina e a redução da produção de transportador de glicose explicam esses achados¹⁷. O prejuízo do desenvolvimento cerebral intrauterino provocado pelo etanol também pode ser evidenciado pelo volume diminuído do cérebro/estruturas cerebrais e alterações na sua constituição^{16,18}. O *gyrus dentatus*, parte do hipocampo – região cerebral crucial para memória, aprendizado e atenção –, tem o seu desenvolvimento diminuído pelo álcool^{16,19}.

O etanol também pode gerar estresse oxidativo, condição de desequilíbrio entre espécies reativas e defesas antioxidantes, envolvido em muitos efeitos tóxicos. Isso ocorre diretamente pelo aumento da formação de radicais superóxido e hidroxila via mitocôndria pelas enzimas citocromo P450 2E1 (CYP2E1), durante a oxidação do acetaldeído à acetato. Esses radicais livres, por serem altamente reativos, atacam carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, provocando danos que poderão levar à morte celular¹¹. O cérebro é um alvo fácil dessas moléculas reativas, por conter alta concentração de lipídeos e consumir muito oxigênio²⁰. A ingestão de etanol diminui as defesas endógenas antioxidantes como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, responsáveis pela detoxificação do radical superóxido e hidróperóxidos²⁰. O papel do estresse oxidativo nos efeitos deletérios do álcool foi demonstrado num estudo com animais em que a suplementação com antioxidante (5% de vitamina E) na dieta de ratas grávidas submetidas à ingestão de etanol reduziu o estresse oxidativo e diminuiu significativamente as malformações fetais quando comparadas com o grupo de ratas que não recebeu o antioxidante²¹.

Os déficits cognitivos associados à DEAF parecem ser consequência de alterações moleculares que prejudicam a plasticidade neuronal, que é a capacidade do cérebro de se moldar e estabelecer conexões essenciais para os processos de aprendizado e de memória. A exposição ao álcool regula negativamente os receptores NMDA e toda a cascata posterior (onde participam mensageiros como o cálcio e o AMP cíclico), que culmina na ativação da transcrição de genes relacionados à plasticidade neuronal²².

O etanol também interfere na sinalização celular favorecendo a morte e prejudicando a proliferação. Fatores de crescimento são moléculas sinalizadoras hábeis em regular a sobrevivência, diferenciação e conectividade de diferentes células. Exemplos de fatores de crescimento cerebrais são: o fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *nerve growth factor*), o fator neurotrófico derivado de célula glial (GDNF, do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF, do inglês *insulin-like growth factor*)²³. No sistema nervoso central, a insulina e os receptores IGF-1, que são mediadores críticos do crescimento neuronal, viabilidade celular, função metabólica e formação de sinapses, estão expressos abundantemente e são alvos da toxicidade do etanol, que leva à perda neuronal²⁴. Estudos em ratos e em cultura de células neuronais cerebelares mostraram que o etanol diminui a produção de IGF e toda a sinalização de sobrevivência mediada pela insulina, levando à hipoplasia cerebelar^{17,24}. Outros estudos em animais demonstraram que as células de Purkinje e os neurônios granulares do cerebelo aparecem em população reduzida por causa da exposição ao etanol durante o seu desenvolvimento²⁵.

Os fatores de crescimento, que são afetados pelo álcool, são reguladores do ciclo celular, especialmente para a entrada da célula em G1 e durante a fase S, quando ocorre a replicação do DNA. Tem sido demonstrado que o etanol aumenta o tempo em G1, atrasando o ciclo celular, e decresce o número de células proliferativas¹¹. O ciclo celular é regulado por uma grande família de proteínas cinases chamadas cinases dependentes de ciclina (CDKs), que são positivamente reguladas por ciclinas e negativamente reguladas por inibidores de ciclinas. As CDKs ativadas catalisam a fosforilação de alvos efetores, resultando na progressão do ciclo celular. Li *et al.*²⁵ mostraram, em cultura de células de ratos de 3 anos de idade, que a duração da fase S foi significativamente prolongada e que as CDK2 tiveram atividade e expressão diminuídas. Já a apoptose foi evidenciada somente após exposição crônica. O período de maior vulnerabilidade à ação apoptogênica do etanol coincide com o período de crescimento cerebral, que, em camundongos e ratos, ocorre nas primeiras 2 semanas pós-natal, mas em humanos se estende da metade da gestação até alguns anos após o nascimento. Recentemente, foi publicado um estudo com fetos de primatas não humanos expostos ao etanol que mostrou um aumento de 60 vezes na apoptose em regiões cerebrais extra-hipocámpais (córtex posterior, núcleo talâmico anterior), que, como o hipocampo, também estão envolvidas na memória e aprendizado²⁶.

Danos hepatoteratogênicos

A concentração sanguínea de álcool depende da quantidade de álcool ingerida e absorvida pelo trato gastrointestinal, do volume de distribuição no organismo e da razão de eliminação. A maioria dos tecidos do organismo contém enzimas capazes de metabolizar o etanol, mas a atividade significativa dessas enzimas ocorre no fígado e, em menor extensão, no estômago. No fígado, o etanol gera um excesso de equivalentes de redução, especialmente o NADH, provocando um distúrbio no metabolismo e danos hepáticos⁷.

Em neonatos, o etanol também provoca danos hepáticos. O etanol diminui a disposição de selênio, elemento-traço essencial para o funcionamento do antioxidante glutathione (importante detoxificante hepático), provocando um desequilíbrio no metabolismo *redox* hepático e levando a danos oxidativos²⁷. Fetos de ratas que receberam etanol por quatro semanas apresentaram danos oxidativos em lipídeos, diminuição da disposição de glutathione reduzida em relação à oxidada e apoptose no fígado²⁸. Além disso, a exposição gestacional crônica intrauterina ao etanol induz a atividade da CYP2E1, materna e fetal, que catalisa a oxidação do etanol e forma espécies reativas de oxigênio, aumentando o estresse oxidativo²⁹.

Outras considerações

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é altamente suscetível à programação durante o desenvolvimento fetal, e situações como

a exposição ao álcool podem reprogramar o eixo HPA, tornando-o hiper-reativo. A super-regulação do eixo HPA leva ao aumento de glicocorticoides. Estruturas cerebrais como o hipocampo, o hipotálamo e a pituitária são sensíveis a altos níveis de glicocorticoides e a exposição a esses hormônios altera o desenvolvimento dessas estruturas³⁰. Entretanto, esse efeito ainda é controverso, pois a exposição crônica ao etanol não mudou a função do eixo HPA materno e fetal, num estudo realizado com porcos²⁹.

Diversos trabalhos relatam a interação entre a exposição ao etanol com o estado nutricional. Shankar *et al.*³¹ observaram, em estudo realizado com ratos, que o etanol e a má nutrição têm efeitos sinérgicos na toxicidade para o neonato. Uma das causas desse efeito é que a má nutrição diminui o metabolismo do etanol por meio da diminuição da expressão da enzima aldeído desidrogenase hepática, aumentando a concentração sanguínea do álcool. Além disso, os mesmos autores mostraram que o etanol e a má nutrição simultânea diminuem em 50% os níveis do IGF-1 (que também é importante para o desenvolvimento fetal e placentário).

Entre as estratégias farmacológicas de intervenção para evitar o desenvolvimento de SAF, está o uso materno de agonistas serotoninérgicos como a buspirona. Os receptores serotoninérgicos HT-1A têm sido propostos serem efetores de sinal de transdução para a neurogênese e a diferenciação de neurônios que expressam esses receptores¹¹. A administração de peptídeos neuroprotetores e de outras moléculas com propriedades antioxidantes e antiapoptóticas também foi descrita como estratégia para evitar a síndrome e doenças secundárias associadas a ela^{21,31,32}. Muito importante é que se façam treinamentos para o desenvolvimento da memória, capacidade motora e educação especial nas crianças e programas para o tratamento do abuso de álcool nas mães¹¹.

Detecção da exposição pré-natal ao etanol

A detecção precoce da exposição pré-natal ao álcool, combinada com o monitoramento contínuo do progresso físico e mental do neonato, pode facilitar a intervenção, potencializando o desenvolvimento da criança, e prevenir doenças secundárias³³. Dessa forma, é importante que o biomarcador de exposição pré-natal ao etanol seja específico e sensível, útil para identificar os neonatos com risco de DEAF³⁴.

Etil ésteres de ácidos graxos (EEAG)

EEAG são produtos do metabolismo não oxidativo do etanol formados por meio de reações de esterificação com ácidos graxos livres por meio da ação das enzimas ácido graxo sintase e etanol O-aciltransferase⁵. Diferente do etanol, eles persistem no sangue por mais de 24h depois do consumo significativo de álcool e são encontrados concentrados no tecido adiposo com meia-vida de 16,5h³⁵. Estudos indicam que os EEAG não atravessam a placenta humana, de forma que a detecção desses metabólitos em diversas matrizes biológicas do neonato corresponde ao metabolismo exclusivamente fetal do etanol, tornando os EEAG marcadores diretos de exposição ao etanol *in utero*^{35,36}.

Os EEAG consistem em mais de 20 compostos, dentre os quais os mais estudados incluem: etil laurato (E12), etil miristato (E14), etil palmitato (E16), etil palmitoleato (E16:1), etil estearato (E18), etil oleato (E18:1), etil linoleato (E18:2), etil linolenato (E18:3), etil araquidonato (E20:4) e etil decosa-hexaenoato (E22:6)¹. Entretanto, já foi relatado que alguns desses etil ésteres, como o etil laurato (E12) e o etil miristato (E14), não possuem especificidade suficiente para indicar exposição gestacional ao álcool, sendo encontrados também em amostras de recém-nascidos não expostos³⁵. Em amostras de mecônio da população em geral, o nível basal de EEAG cumulativo é de 1,81 nmol/g e os EEAG de cadeia mais curtas são os prevalentes³⁶. O valor de *cutoff* (valor predeterminado que delimita um resultado negativo de um positivo) aceito internacionalmente é de 2 nmol de sete EEAG cumulativo/g de mecônio quando são excluídos o etil laurato e miristato, com sensibilidade de 100% e especificidade de

98,4%³⁶. Moore *et al.*³⁷ descreveram que uma concentração cumulativa de seis EEAG (etil palmitoleato, etil palmitato, etil linoleato, etil oleato, etil estearato e etil araquidonato) maior que 10.000 ng/g pode indicar exposição fetal significativa ao etanol.

As matrizes biológicas mais utilizadas para a detecção dos EEAG são o mecônio e o cabelo do neonato e o cabelo materno³⁵. A formação do mecônio inicia-se aproximadamente na 12ª semana de gestação, quando o feto começa a engolir o líquido amniótico¹⁴. Os xenobióticos e seus metabólitos se depositam no mecônio por meio da bile ou via ingestão da urina fetal, que é excretada no líquido amniótico. O etanol, assim como a maioria das outras drogas, atravessa a placenta por difusão passiva. Esses fatores, somados à fácil coleta, fazem do mecônio uma ótima matriz para identificar exposições intrauterinas^{34,35}. O cabelo tem sido considerado uma matriz alternativa para avaliação de EEAG. Diferentemente do mecônio, que fica disponível para a coleta durante os dois ou três primeiros dias de vida, a coleta do cabelo do neonato pode ser realizada até três meses depois do nascimento³⁵. O cabelo do neonato começa a crescer aproximadamente na terceira ou quarta semana de vida fetal. As substâncias se depositam na camada cortical do cabelo por meio da corrente sanguínea. Dessa forma, o cabelo é uma boa matriz para o monitoramento de drogas e também como detecção retrospectiva de consumo de diferentes substâncias³⁵. Um estudo comparando a incorporação de EEAG nos cabelos em porcos e humanos demonstrou que os humanos têm maior produção de EEAG e maior deposição no cabelo, enquanto o catabolismo é mais lento comparado com os porcos. Além disso, o etil oleato foi o éster que teve maior correlação com a exposição sistêmica ao etanol (determinação de etanol no sangue materno)³⁸.

Estudos em diferentes populações do mundo têm analisado a prevalência do consumo de álcool no período gestacional utilizando a quantificação de EEAG como biomarcador de exposição^{2,34,37,39-41}, conforme mostrado na tabela 1. A maioria dos autores utilizou sete diferentes EEAG como marcadores de exposição e relatou ser o etil linoleato, o etil palmitato e o etil oleato os encontrados em maiores concentrações no mecônio e que mostraram maior correlação com o nível de exposição ao álcool, devendo esses serem incluídos nas análises. As diferenças de EEAG majoritários encontrados nos diferentes trabalhos são explicadas pelo estado nutricional da mãe. No cabelo, tem sido demonstrado que os níveis de EEAG estão aumentados tanto nas mães quanto nos neonatos expostos ao etanol em relação aos grupos não expostos^{4,38}.

O método de extração de EEAG mais utilizado foi a extração primária líquido-líquido com hexano para mecônio e heptano para cabelo e subsequente extração ou microextração em fase sólida. Os métodos de detecção incluíram cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) em *tandem*, entre outros, como mostra a tabela 1. Alertando quanto às desvantagens do uso da extração líquida, que são os efeitos adversos dos solventes e a grande quantidade de amostra necessária, Hutson *et al.*⁴⁰ publicaram um método sensível e reprodutível, em que os EEAG são extraídos por microextração em fase sólida (MEFS) em *headspace* utilizando somente 50 mg de amostra de mecônio.

Observando a tabela 1, verifica-se que o estudo que apresentou limite de detecção (LDD) mais baixo foi o de Garcia-Algar *et al.*³⁹, que utilizou CL/EM em *tandem* (considerando a relação 2 nmol/g \cong 600 ng/g, conforme Bakdash *et al.*¹). Entretanto, todos os LDD e limites de quantificação (LDQ) apresentados foram adequados. Como a cromatografia gasosa (CG) apresenta resolução superior à cromatografia líquida (CL), ela pode ser eleita como o método cromatográfico de escolha, embora ambos os métodos, associados à espectrometria de massas, forneçam informações sobre a estrutura da molécula. Em relação ao método de extração, a MEFS poderia ser preferida sobre outros tipos de extração, porque possui diversas vantagens como a de eliminar a necessidade de solvente, diminuir o tempo de preparação da amostra, possibilitar a análise em outras matrizes biológicas e necessitar de pouca amostra, podendo ser

Tabela 1. Estudos de exposição ao etanol em diferentes populações utilizando EEAG como biomarcador

Autores	Amostras (n)/ local do estudo	Matriz biológica	Biomarcador estudado	Método de extração	Método de detecção	Resultados e características analíticas (sensibilidade/especificidade/LDD/LDQ)
Moore <i>et al.</i> (2003) ³⁷	436/Havaí 289/EUA	Mecônio	E16:1, E16, E18:1, E18:2, E18, E20:4	Extração líquida com hexano/extração em fase sólida	CG/EM	16,7% positivas no primeiro grupo 12,1% positivas no segundo grupo EEAG majoritário: linoleato
Ostrea <i>et al.</i> (2006) ⁵	124/EUA	Mecônio	E 12, E14, E16, E18:1, E18:2, E18:3, E:18, E20:4, E22:6	Extração hexano e extração em fase sólida	CG/EM	28% positivas Valor preditivo positivo de E18:2 e especificidade > 96% exposição ao álcool E18:3 e etildoco-hexonato específicos mas sem concentrações significativas LDD: 0,05 ug/g a 9 ug/g
Gareri <i>et al.</i> (2008) ³⁴	682/Canadá	Mecônio	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	Extração líquido-líquido e extração em fase sólida	CG e CG/EM	242 < que <i>cutoff</i> (2 nmol/g) mas > que LDQ LDD: 1 µg/mL 2,5% positivas 0,5% positivas pelo questionário
Garcia-Algar <i>et al.</i> (2008) ³⁹	353/Espanha	Mecônio	E12, E18:3, E14, E20:4, E16:1, E18:2, E16, E18 e E18:1	Extração líquida com acetona e hexano e extração em fase sólida	CL/EM em <i>tandem</i>	LDQ: 0,12 a 0,2 nmol/g 45% igual ou superior ao <i>cutoff</i> (2 nmol/g) EEAGs EEAG majoritários: oleato e palmitoleato
Hutson <i>et al.</i> (2009) ⁴⁰	Não informado	Mecônio	E16, E18:1, E18:2, E18	Microextração em fase sólida em <i>headspace</i>	CG/EM	LDD: 0,05-0,16 nmol/g LDQ: 0,13-0,32 nmol/g
Hutson <i>et al.</i> (2010) ⁴¹	905/Uruguai	Mecônio	E16, E16:1, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E20:4	Extração líquido-líquido e extração em fase sólida	CG e CG/EM	LDD: 0,16 a 0,22 nmol/g LDQ: 0,32 a 0,44nmol/g 37% relataram beber álcool 14% positivas pelo questionário CAGE 44% positivas pela determinação de EEAG
Bakdash <i>et al.</i> (2010) ¹	602/Alemanha	Mecônio	E14, E16, E18, E18:1, E18:2,	Microextração em fase sólida em <i>headspace</i>	CG/EM	LDD: 50 ng/g para E18:1 e 15 ng/g para os demais LDQ: 150 ng/g para E18:1 e 50 ng/g para os demais 7,1% positivas (acima do <i>cutoff</i> de 500 ng/g) EEAG majoritários: oleato, linoleato e palmitoleato
Kulaga <i>et al.</i> (2009) ³⁸	324/Canadá	Cabelo	E14, E16, E18:1, E18	Extração líquida com dimetilsulfóxido e n-heptano e microextração em fase sólida em <i>headspace</i>	CG/EM	LDD: 0.01-0.04 ng/mg LDQ: 0.04-0.12 ng/mg 33,3% positivas (≥ 0,5 ng/mg) EEAG majoritários: oleato e palmitoleato
Roeshig <i>et al.</i> (2010) ²	63/Brasil	Mecônio	E12, E14, E16, E16:1, E18, E18:, E18:2, E20:4	Microextração em fase sólida em <i>headspace</i>	CG/EM	LDD < 100 ng/g LDQ < 150 ng/g E20:4 detectado em amostras negativas
Pragst <i>et al.</i> (2010) ⁴	174/Alemanha	Cabelo	E12, E16, E18:1, E18	Extração líquida com dimetilsulfóxido e n-heptano e microextração em fase sólida em <i>headspace</i>	CG/EM	LDD: 0,01-0,04 ng/mg 30 casos positivos (28 concordantes com EtG positivo)

CG: cromatografia gasosa; CL: cromatografia líquida; EM: espectrometria de massas; EEAG: etil éster de ácido graxo; LDD: limite de detecção; LDQ: limite de quantificação.

adequada para a análise de outras drogas simultaneamente⁴⁰. Se não houver disponibilidade dessa tecnologia no laboratório, a escolha é fazer a extração em duas etapas – extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida (EFS), conforme a maioria dos trabalhos relata (Tabela 1).

Etil glicuronídeo (EtG) e etil sulfato (EtS)

EtG também é um metabólito do etanol, que é produzido em baixas concentrações (cerca de 0,02% a 0,06% do etanol ingerido) no retículo endoplasmático do fígado e, em menor extensão, nos pulmões e mucosa intestinal. Foi recentemente proposto ser um marcador de exposição alcoólica intrauterina em dois estudos^{1,42}. Os autores detectaram EtG em 155 amostras de mecônio de um total de 177, com concentrações entre 5 e 6.300 ng/g. O EtS é outro metabólito do

etanol, produto de reação de sulfoconjugação e foi encontrado em indivíduos que ingeriram álcool, mas não em indivíduos saudáveis sob abstinência alcoólica por dois dias⁴³.

As matrizes biológicas mais utilizadas para a detecção de EtG e EtS são também o mecônio e o cabelo da mãe e do recém-nascido, mas o EtG pode ser encontrado também na urina e no suor. Entretanto, o mecônio pareceu ser amostra mais adequada quando comparado ao cabelo, num estudo realizado em 99 mães e respectivos neonatos⁴². Enquanto todas as amostras de cabelo tiveram níveis abaixo do limite de quantificação para o EtG (3 pg/mg), 82,3% das amostras de mecônio foram positivas para EtG e 19,2% para EtS. Os autores explicaram que, provavelmente, a detecção de EtG no cabelo da gestante é mais adequada como marcador de exposição intensa diária ao etanol (que não foi relatado pelas participantes do estudo), de pelo menos 30 g/dia, do que como marcador de expo-

sição eventual. Em relação ao resultado negativo encontrado nos cabelos dos neonatos, os autores não descartam a possibilidade de amostragem insuficiente (somente 4 a 12 mg), visto que o teste para EEAG também ficou abaixo do limite de quantificação⁴². Outros trabalhos também sugerem que um resultado negativo para EtG no cabelo não exclui a possibilidade de ter ocorrido exposição ao etanol, porque esse parâmetro pode aparecer negativo no cabelo de indivíduos que ingerem álcool socialmente⁴⁴. Por outro lado, Pragst *et al.*⁴ mostraram que a determinação de EEAG e de EtG no cabelo é eficaz para indicar uso abusivo crônico de álcool. No estudo, eles mostraram que os resultados para EEAG e EtG concordaram em 75% dos casos, mas que não existe proporcionalidade nas concentrações em função das diferentes razões de incorporação do metabólito no cabelo. O valor de *cutoff* estabelecido para EtG no cabelo é de 30 pg/mg para diferenciar consumo social do consumo excessivo de álcool⁴. Um estudo que comparou amostras de cabelos de alcoolistas, indivíduos que bebem socialmente e abstêmios mostrou que, apesar de os resultados para EEAG e EtG não correlacionarem entre si, a determinação desses dois biomarcadores nos cabelos é útil para marcar qualitativamente a exposição ao etanol, de forma que EtG positivo e/ou EEAG acima do valor de *cutoff* de 1 ng/mg indica comportamento de ingestão excessiva ao álcool. A falta de correlação pode ser resultado dos diferentes sítios de formação dos metabólitos e vias de depósitos nos cabelos e também pelas propriedades químicas de cada marcador, que resulta em diferentes padrões de remoção por tratamentos cosméticos⁴⁴. Nesse sentido, salienta-se que, enquanto os EEAG se depositam por meio das glândulas sebáceas, o EtG se deposita no cabelo pelo suor⁴⁵. Ambos os marcadores podem ter as suas concentrações diminuídas após tratamentos capilares como tinturas, relaxamentos, permanentes e clareamento, mas é possível detectá-los ainda. Entretanto, pode haver resultados falsos-positivos após a utilização tópica de cosméticos contendo etanol⁴⁵. Além disso, a análise em diferentes segmentos do cabelo mostrou que os dois metabólitos se incorporam em regiões diferentes do fio, o que dificulta a interpretação do período em que houve exposição. A concentração dos EEAG aumenta da região proximal para a distal e depois decresce, enquanto os EtG decrescem da proximal para a distal⁴⁴.

EtG foi detectado em 16,3% de amostras de mecônio num estudo feito com 602 amostras¹. Os autores compararam os resultados de EtG com os obtidos para EEAG, que foi encontrado em concentração acima do *cutoff* em 7,1% das amostras. Correlação entre os dois marcadores foi observada quando considerado o valor de *cutoff* para EtG de 274 ng/g. Em apenas um caso, o resultado foi positivo em altas concentrações para EEAG (150.000 ng/g) e negativo para EtG, e os autores sugerem uma possível contaminação da amostra. Houve cinco casos em que foi encontrado EtG entre 274 e 850 ng/g e nenhum traço de EEAG. Possível explicação para tal achado é a baixa razão de formação de EEAG. Além disso, é possível que o EtG permaneça no mecônio por menos tempo que o EEAG por causa de sua maior hidrofília. Dessa forma, o consumo de álcool nas últimas semanas antes da coleta poderia levar à alta concentração de EtG sem ter ainda EEAG detectável¹.

Outros marcadores

A determinação de etanol no sangue materno não avalia exposição a longo prazo e muitas vezes é associada a questionários ou à avaliação de outros biomarcadores que são indiretos⁷. Acetaldeído é um produto do metabolismo oxidativo do etanol altamente reativo e que se liga em várias proteínas como a albumina e hemoglobina. Adultos de acetaldeído em hemoglobina têm sido encontrados em altas concentrações nos alcoolistas, sendo considerado um marcador de exposição. Outro marcador é a transferrina deficiente de carboidratos. Essa proteína ligante de ferro é produzida no fígado e tem sua carga isoeletrica afetada em alcoolistas, o que leva a um decréscimo no número de cadeias de carboidratos. Isso somente acontece nos casos de consumo muito intenso de etanol (cerca de 60 g por dia) e permanece aumentado por sete dias⁴⁶. Outros marcadores clássicos são as dosagens das transaminases e gama glutamil-transferase e o

volume corpuscular médio, que são considerados marcadores de efeito, e não de exposição, e são inespecíficos, podendo ter os seus níveis/atividade alterados também por causa de outros tóxicos⁷.

Alguns questionários são utilizados para distinguir entre o uso ou não do álcool, como o CAGE (*Cut down, Annoyed by criticism, Guilty and Eye-opener*) e suas versões modificadas TWEAK (*Tolerance Worry Eye-opener Annoyed Cut-down*), T-ACE (*Tolerance CUT-down, Annoyed Eye-opener*), MAST (*Michigan Alcoholism Screening Test*) e TLFB (*Timeline Followback calendar*). O TWEAK e o T-ACE demonstram sensibilidade e especificidade de até 70% e 79%. Entretanto, ambos podem ser considerados inadequados, porque eles medem mais a dependência da mãe pelo álcool, podendo falhar em identificar a exposição ao etanol quando a mãe não é dependente. Foi proposto o uso de TLFB combinado com os outros questionários para aumentar a efetividade do *screening*³⁵. Porém, esse *screening* nem sempre corresponde à realidade da exposição^{34,41} e serve para fornecer informações sobre o consumo de álcool materno e sobre uma possível intervenção.

Os diferentes métodos de detecção da exposição precoce ao etanol acarretam um custo, por exigirem equipamentos de boa sensibilidade e especificidade. A avaliação dos biomarcadores de exposição fetal ao etanol provê informações sobre a intensidade da exposição e contribui para o correto direcionamento dos casos em que será necessário o acompanhamento pós-natal por diversos profissionais, fase que possui um custo ainda maior. É nessa etapa que será estabelecido se a criança desenvolverá de fato algum sintoma da DEAF. Dessa forma, a investigação da exposição tem o seu benefício sobreposto ao custo.

Conclusão

O etanol é considerado um composto teratogênico e, dessa forma, as mulheres que possam estar grávidas ou sabidamente estão devem se abster do consumo. Esta revisão mostra que existem meios de detectar se houve exposição intrauterina ao etanol, indicando que o neonato pertence ao grupo de risco no desenvolvimento de DEAF. A detecção precoce, por meio dos biomarcadores EEAG, EtG e EtS no mecônio e/ou cabelo, fornece informações a respeito da intensidade da exposição e contribui para que sejam tomadas medidas para assistir a criança e a família na educação e desenvolvimento social. Além disso, esses marcadores também podem ser usados para esclarecer a patogênese de SAF.

Referências

1. Bakdash A, Burger P, Goecke TW, Fasching PA, Reulbach U, Bleich S, et al. Quantification of fatty acid ethyl esters (EEAG) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396(7):2469-77.
2. Roehsig M, De Paula DM, Moura S, Diniz EM, Yonamine M. Determination of eight fatty acid ethyl esters in meconium samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2010;33(14):2115-22.
3. Morini L, Marchei E, Vagnarelli F, Garcia Algar O, Groppi A, Mastrobatista L, Pichini S. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair-potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol. *Forensic Sci Int.* 2010;196(1-3):74-7.
4. Pragst F, Rothe M, Moench B, Hastedt M, Herre S, Simmert D. Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: Interpretation and advantages. *Forensic Sci Int.* 2010;196:101-10.
5. Ostrea Jr EM, Hernandez JD, Bielawski DM, Kan JM, Leonardo GM, Abela MB, et al. Fatty acid ethyl esters in meconium: are they biomarkers of fetal alcohol exposure and effect? *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30:1152-9.
6. Joya X, Pujadas, M, Falcón M, Civit E, Garcia-Algar O, Oriolall O, et al. Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. *Forensic Sci Int.* 2010;196:38-42.
7. Mancinelli R, Binetti R, Ceccanti M. Female drinking environmental biological markers. *Ann Ist Super Sanita.* 2006;42:31-8.

8. Yamaguchil ET, Cardoso MMSC, Torres MLA, Andrade AG. Drogas de abuso e gravidez. *Rev Psiq Clín.* 2008;(Supl 1):44-7.
9. Silva CS, Ronzani TM, Furtado EF, Aliane PP, Almeida AM. Relationship between religious practice, alcohol use, and psychiatric disorders among pregnant women. *Rev Psiq Clín.* 2010;37(4):152-6.
10. Pereira PK, Lovisi GM, Lima LA, Legay LF. Complicações obstétricas, eventos estressantes, violência e depressão durante a gravidez em adolescentes atendidas em unidade básica de saúde. *Rev Psiq Clín.* 2010;37(5):216-22.
11. Goodlett CR, Horn KH, Zhou FC. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp Biol Med.* 2005;230:394-406.
12. Houet T, Vabret F, Herlicuviez M, Dreyfus M. Comparaison de la consommation d'alcool avant et pendant la grossesse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2004;34:687-93.
13. Arevalo E, Shanmugasundaraj S, Wilkemeyer MF, Dou X, Chen S, Charness ME, et al. An alcohol binding site on the neural cell adhesion molecule L1. *PNAS.* 2007;105(1):371-5
14. Guerri C, Bazinet A, Riley EP. Fetal alcohol spectrum disorders and alterations in brain and behavior. *Alcohol Alcohol.* 2009;44(2):108-14.
15. Miller MW, Dow-Edwards DL. Structural and metabolic alterations in rat cerebral cortex induced by prenatal exposure to ethanol. *Brain Res.* 1988;474(2):316-26.
16. Miki T, Yokoyama T, Sumitani K, Kusaka T, Warita K, Matsumoto Y, et al. Ethanol neurotoxicity and dentate gyrus development. *Congenit Anom (Kyoto).* 2008;48(3):110-7.
17. De La Monte SM, Xu XJ, Wands JR. Ethanol inhibits insulin expression and actions in the developing brain. *CMLS.* 2005;62:1131-45.
18. Duffy O, Menez JF, Floch HH, Leonard BE. Changes in whole brain membranes of rats following pre- and post-natal exposure to ethanol. *Alcohol Alcohol.* 1991;26(5-6):605-13.
19. Milotová M, Riljak V, Jandová K, Bortelová J, Mersová D, Pokorný J, et al. Changes of hippocampal neurons after perinatal exposure to ethanol. *Physiol Res.* 2008;57:275-82.
20. Li Y, Wang H. In utero exposure to tobacco and alcohol modifies neurobehavioral development in mice offspring: consideration a role of oxidative stress. *Pharmacol Res.* 2004;49(5):467-73.
21. Wentzel P, Rydberg U, Eriksson UJ. Antioxidative treatment diminishes ethanol-induced congenital malformations in the rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30(10):1752-60.
22. Medina AE. Fetal alcohol spectrum disorders and abnormal neuronal plasticity. *Neuroscientist.* 2011;17(3):274-87. Epub 2011 Mar 7.
23. Fiore M, Mancinelli R, Aloe L, Laviola G, Somelli F, Vitali M, et al. Hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor, glial cell-derived neurotrophic factor and nerve growth factor are differentially affected by early chronic ethanol or red wine intake. *Toxicol Lett.* 2009;188(3):208-13.
24. De La Monte SM, Wands JR. Chronic gestational exposure to ethanol impairs insulin-stimulated survival and mitochondrial function in cerebellar neurons. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:882-93.
25. Li Z, Lin H, Zhu Y, Wang M, Luo J. Disruption of cell cycle kinetics and cyclin-dependent kinase system by ethanol in cultured cerebellar granule progenitors. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001;132(1):47-58.
26. Farber NB, Creeley CE, Olney, JW. Alcohol-induced neuroapoptosis in the fetal macaque brain. *Neurobiol Dis.* 2010;40(1):200-6.
27. Ojeda ML, Vazquez B, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Ethanol consumption by Wistar rat dams affects selenium bioavailability and antioxidant balance in their progeny. *Int J Environ Res Public Health.* 2009;6:2139-49.
28. Perez MJ, Velasco E, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJG. Maternal ethanol consumption during pregnancy enhances bile acid-induced oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver. *Toxicology.* 2006;225:183-94.
29. Hewitt AJ, Walker KR, Kobus SM, Poklewska-Kozzell M, Reynolds JN, Brien JF. Differential effects of chronic ethanol exposure on cytochrome P450 2E1 and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the maternal-fetal unit of the guinea pig. *Neurotoxicol Teratol.* 2010;32(2):164-70.
30. Zhang X, Slwowska JH, Weinberg J. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005;230(6):376-88.
31. Shankar K, Hidestrand M, Liu X, Xiao R, Skinner CM, Simmen FA, et al. Physiologic and genomic analysis of nutrition-ethanol interactions during gestation: implications for fetal ethanol toxicity. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231(8):1379-97.
32. Spong CY, Abebe DT, Gozes I, Breneman DE, Hill JM. Prevention of fetal demise and growth restriction in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(2):774-9.
33. Burd L, Hofer R. Biomarkers for detection of prenatal alcohol exposure: a critical review of fatty acid ethyl esters in meconium. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008;82(7):487-93.
34. Gareri J, Lynn H, Handley M, Rao C, Koren G. Prevalence of fetal ethanol exposure in a regional population-based sample by meconium analysis of fatty acid ethyl esters. *Ther Drug Monit.* 2008;30(2):239-45
35. Caprara DL, Nash K, Greenbaum R, Rovet J, Koren G. Novel approaches to the diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31(2):254-60.
36. Chan D, Caprara D, Blanchette P, Klein J, Koren G. Recent developments in meconium and hair testing methods for the confirmation of gestational exposures to alcohol and tobacco smoke. *Clin Biochem.* 2004;37:429-38.
37. Moore C, Jones J, Lewis D, Buchi K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. *Clin Chem.* 2003;49(1):133-6.
38. Kulaga V, Caprara D, Iqbal U, Kapur B, Klein J, Reynolds J, et al. Fatty acid ethyl esters (EEAG); comparative accumulation in human and guinea pig hair as a biomarker for prenatal alcohol exposure. *Alcohol Alcohol.* 2006;41(5):534-9.
39. Garcia-Algar O, Kulaga V, Gareri J, Koren G, Vall O, Zuccaro P, et al. Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a Mediterranean city. *Ther Drug Monit.* 2008;30(2):249-54.
40. Hutson JR, Aleksa K, Pragst F, Koren G. Detection and quantification of fatty acid ethyl esters in meconium by headspace-solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(1-2):8-12.
41. Hutson JR, Magri R, Gareri JN, Koren G. The incidence of prenatal alcohol exposure in Montevideo Uruguay as determined by meconium analysis. *Ther Drug Monit.* 2010;32(3):311-7.
42. Morini L, Marchei E, Vagnarelli F, Garcia-Algar O, Groppi A, Mastrobattista L, et al. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair-potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol. *Forensic Sci Int.* 2010;196(1-3):74-7.
43. Schneider H, Glatt H. Sulpho-conjugation of ethanol in humans in vivo and by individual sulphotransferases forms in vitro. *Biochem J.* 2004;383:543-9.
44. Yegles M, Labarthe A, Auwarter V, Hartwig S, Vater H, Wennig R, et al. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotalers. *Forensic Sci Int.* 2004;145(2-3):167-73.
45. Schummer C, Appenzeller BM, Wennig R. Quantitative determination of ethyl glucuronide in sweat. *Ther Drug Monit.* 2008;30(4):536-9.
46. Stoler J, Huntington K, Peterson CM, Peterson K, Aboagye K, Lian L, et al. The prenatal detection of significant alcohol exposure with maternal blood markers. *J Pediatr.* 1998;133(3):346-52.