

VANIA MARIA MORAES FERREIRA

INFLUÊNCIA DA IDADE, DO SEXO E DO COMPLEXO
RECEPTOR NMDA NO COMPORTAMENTO DE
RATOS TRATADOS COM ETANOL NO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.

Florianópolis

1996

FERREIRA, V.M.M. *Influência da idade, do sexo e do complexo receptor NMDA no comportamento de ratos tratados com etanol no labirinto em cruz elevado*. Florianópolis, 1996. 90 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: **Prof. Dra. Gina Struffaldi Morato**
Defesa: 31.05.96

O complexo receptor [NMDA] parece estar envolvido com as desordens de [ansiedade]. O presente estudo procurou investigar os efeitos do [etanol (EtOH)] no comportamento de ratos de ambos os sexos com 2, 3, 4 e 5 meses de idade, testados no [labirinto em cruz elevado (LCE)]; e uma comparação entre os efeitos do EtOH e do HA-966, antagonista do sítio da glicina, e da ketamina, antagonista do sítio da fenciclidina no receptor NMDA, associados ou não com um agonista do sítio da glicina neste receptor, a [D-cicloserina (DCS)]. Os resultados demonstraram que o EtOH não afetou a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do LCE nos ratos testados aos 2 meses de idade, mas aumentou aqueles parâmetros em animais com idade mais avançada, sugerindo que o efeito do EtOH depende da idade em que o animal é testado. Por outro lado, os resultados mostraram também que a DCS interferiu com o efeito ansiolítico produzido pela ketamina somente em ratos machos. Nossos resultados sugerem que a semelhança dos perfis ansiolíticos observados para o EtOH e o HA-966, reforça as evidências para um efeito antagonístico do EtOH no sítio da glicina.

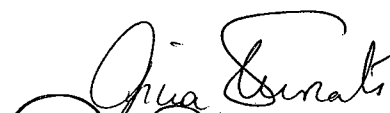
[Ansiedade] [D-cicloserina] [Etanol] [Labirinto em cruz elevado] [NMDA]

**"INFLUÊNCIA DA IDADE, DO SEXO E DO SISTEMA NMDA NO
COMPORTAMENTO DE RATOS TRATADOS COM ETANOL NO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO"**

POR

VÂNIA MARIA MORAES FERREIRA

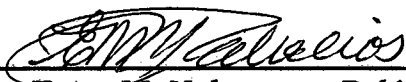
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:



Gina Struffaldi Morato



Reinaldo N. Takahashi

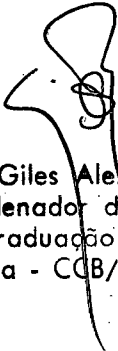


Ester M. Nakamura-Palácios



Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis, maio de 1996.



Prof. Giles Alexander Rae
Coordenador do Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia - CCB/UFSC

Dedicatória Especial

Dedico com muito carinho esta Dissertação de Mestrado à professora Dra. Gina Struffaldi Morato que procurou me ensinar que "toda observação deve ser pró ou contra alguma opinião - se for para ter alguma utilidade." ()*

*E, agora... "não sei como o mundo me vê; mas eu me sinto somente como um garoto brincando na praia, contente em achar aqui e ali uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita do que o comum, tendo sempre diante de mim, ainda por descobrir, o grande oceano da verdade." (**)*

** Charles Darwin*

*** Isaac Newton*

Agradecimentos

- *Aos professores Dra. Gina Struffaldi Morato, Dr. Antônio de Pádua Carobrez e Dr. João Batista Calixto, pela oportunidade e incentivo nesta etapa de minha carreira científica.*
- *A todos os demais professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia, em especial aos professores Dr. Giles Alexander Rae e Dr. Reinaldo Naoto Takahashi.*
- *Aos funcionários e amigos, em especial à Daniela Cabrini, Monique Gevaerd e Nivaldo Paulino, que estiveram comigo nos momentos mais difíceis, assim como nos momentos mais felizes em que aqui estive.*
- *Ao professor Dr. Edelson Flávio Morato pelo auxílio nas dosagens alcoólicas.*
- *Ao Laboratório do Hospital Universitário e Laboratório Barriga Verde, sob responsabilidade do Dr. Antônio Walter, pela gentileza da execução das dosagens alcoólicas.*
- *A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.*

Agradecimentos Especiais

- *Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e confiança.*
- *À Universidade Federal do Pará (UFPA), em especial aos professores Dr. Francisco Luis de Moura Cavalcante e Dra. Setsuko Noro dos Santos por terem acreditado e investido em minha carreira científica.*

“As idéias preconcebidas são como faróis que iluminam o caminho do experimentador, servindo como guias para interrogar a natureza. Somente passam a ser perigosas quando se transformam em idéias fixas (...); a maior perturbação da mente consiste em crer em algo porque desejamos que seja assim.”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
INTRODUÇÃO	1
1. ÁLCOOL E ALCOOLISMO	1
1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Fatores genéticos, hormonais, ambientais e de desenvolvimento	3
1.3. Mecanismos de ação do EtOH.....	7
2. AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS E ÁLCOOL	8
2.1. Aminoácidos excitatórios.....	8
2.2. Álcool e Sistema NMDA.....	11
3. ANSIEDADE E ÁLCOOL.....	14
3.1. Ansiedade.....	14
3.2. Modelos animais de ansiedade.....	15
3.3. Labirinto em cruz elevado.....	16
3.4. Álcool e ansiedade	19
4. SISTEMA NMDA, ANSIEDADE E ÁLCOOL.....	20
OBJETIVOS	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
1. Animais	24
2. Drogas.....	24
3. Equipamentos	25
3.1. Teste da atividade locomotora	25
3.2. Teste do labirinto em cruz elevado e arena	25

4. Procedimentos	28
Experimento 1 - <i>Atividade locomotora</i>	28
Experimento 2 - <i>Influência da idade e do sexo no efeito ansiolítico do EtOH</i>	29
Experimento 3 - <i>Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pelo EtOH</i>	30
Experimento 4 - <i>Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pelo HA966</i>	30
Experimento 5 - <i>Efeito ansiolítico produzido pela KET</i>	31
Experimento 6 - <i>Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pela KET</i>	31
5. Determinação dos níveis alcoólicos sanguíneos	32
6. Análise estatística.....	32
RESULTADOS.....	34
Experimento 1 - <i>Atividade locomotora</i>	34
Experimento 2 - <i>Influência da idade e do sexo no efeito ansiolítico do EtOH</i>	36
Experimento 3 - <i>Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pelo EtOH</i>	39
Experimento 4 - <i>Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pelo HA966</i>	43
Experimento 5 - <i>Efeito ansiolítico produzido pela KET</i>	45
Experimento 6 - <i>Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pela KET</i>	47
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÕES	61
RESUMO	63
ABSTRACT.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema ilustrativo de alguns possíveis locais de ação do EtOH	2
Figura 2- Representação esquemática de um fator desencadeante nas desordens do pânico.....	4
Figura 3- Modelo esquemático para ilustrar a interação do EtOH com o receptor NMDA.....	10
Figura 4- Representação esquemática do labirinto em cruz elevado	26
Figura 5- Esquema das etapas dos procedimentos experimentais com ratos no labirinto em cruz elevado.....	27
Figura 6- Atividade locomotora de ratos machos e fêmeas, com 2 e 4 meses de idade administrados com diferentes doses de EtOH e testados na caixa de atividade locomotora	35
Figura 7- Influência da idade sobre o comportamento exploratório de ratos machos e fêmeas injetados com salina ou EtOH	38

- Figura 8- Efeito do pré-tratamento da DCS sobre o comportamento de ratos machos e fêmeas, com 4 meses de idade, tratados com EtOH.....40
- Figura 9- Efeito do pré-tratamento da DCS sobre o comportamento de ratos machos e fêmeas, com 4 meses de idade, tratados com HA-96644
- Figura 10- Curva dose-resposta do efeito ansiolítico da ketamina46
- Figura 11- Efeito do pré-tratamento da DCS sobre o comportamento de ratos machos e fêmeas, com 4 meses de idade, tratados com ketamina48

LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

AAE	Aminoácidos excitatórios
DA	Dopamina
DCS	D-cicloserina
e.p.m.	Erro padrão da média
EtOH	Etanol
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GLI	Glicina
GLU	Glutamato
i.p.	Intraperitonealmente
KET	Ketamina
LCE	Labirinto em cruz elevado
NMDA	N-metil-D-aspartato
NA	Noradrenalina
SNC	Sistema Nervoso Central
Ca ⁺⁺	Cálcio
Ha-966	3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidinona
MK-801	[(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo (a,d) cicloheptano-5,10-imino hidrogênio maleato]

INTRODUÇÃO

1. *ÁLCOOL E ALCOOLISMO*

1.1. *Aspectos gerais*

O álcool etílico ou etanol (EtOH), é uma das drogas de abuso mais freqüentemente empregadas no mundo (Lieber, 1995) e tem acompanhado o homem por milhares de anos em suas atividades religiosas, culturais e sociais (Von Wartburg, 1990). Constitui-se em um dos mais antigos enigmas farmacológicos e um dos mais sérios problemas de saúde do mundo (Hunt, 1993), pois, sendo uma pequena molécula (Figura 1), solúvel tanto em água quanto em lipídeos, o EtOH tem grande distribuição no organismo e afeta muitas funções vitais (Lieber, 1992; 1995).

O consumo excessivo de EtOH pode levar a sérias conseqüências sociais e médicas (Morgan e Sherlock, 1977; Blume, 1987; Von Wartburg, 1990). Cerca de 20 a 40% das pessoas internadas em hospitais gerais, têm problemas relacionados com esta droga (Adams *et al.*, 1993). Em nosso meio, inclusive, tem sido relatado que o número de adolescentes que já experimentaram bebidas alcoólicas é expressivo (Galduróz *et al.*, 1994). O uso abusivo de EtOH pode levar a uma desordem comportamental denominada de alcoolismo, caracterizada pelo consumo de grandes quantidades de álcool em ocasiões repetidas (Goodwin, 1992), que pode produzir, além de sintomas orgânicos, insônia, medo,

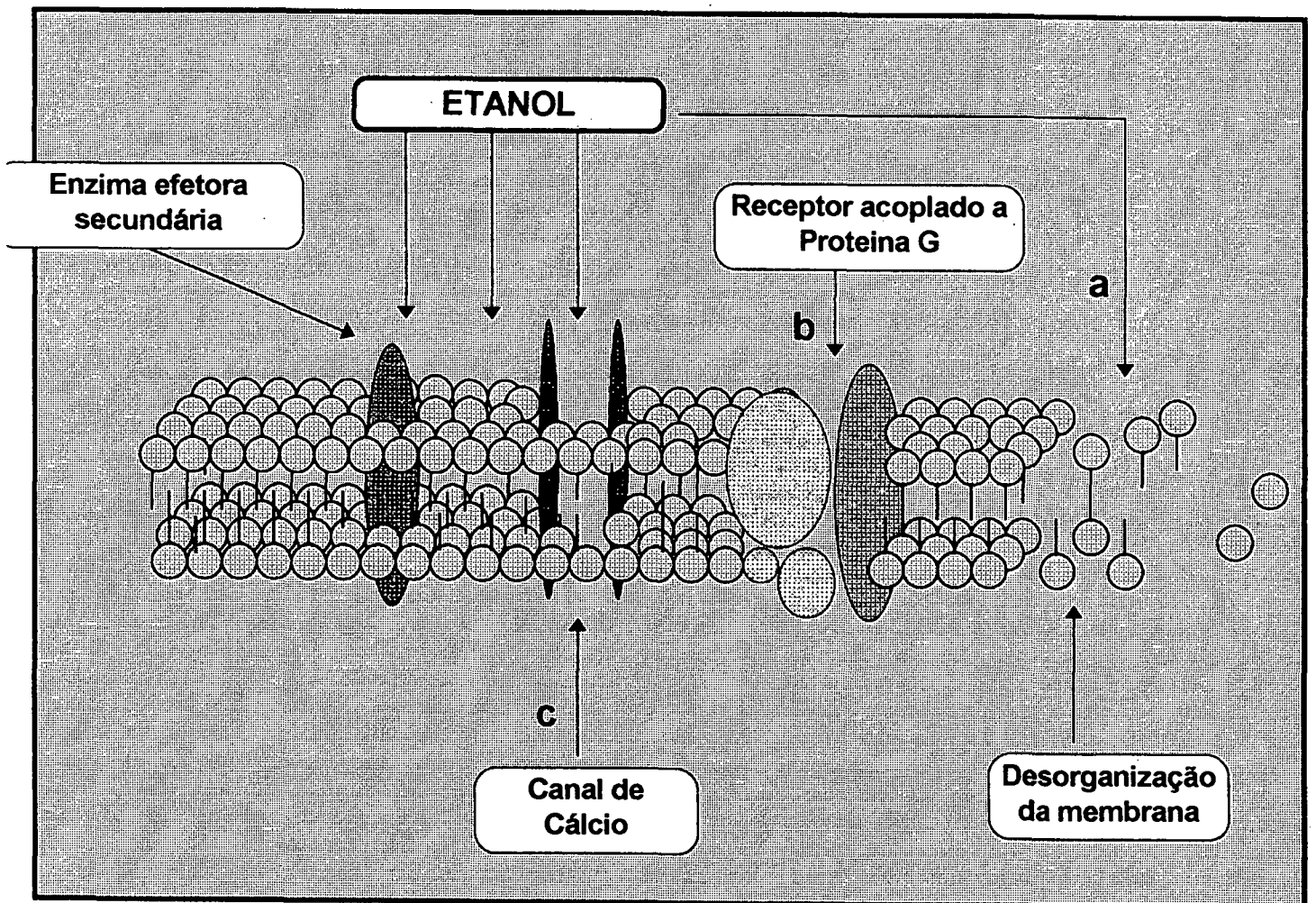
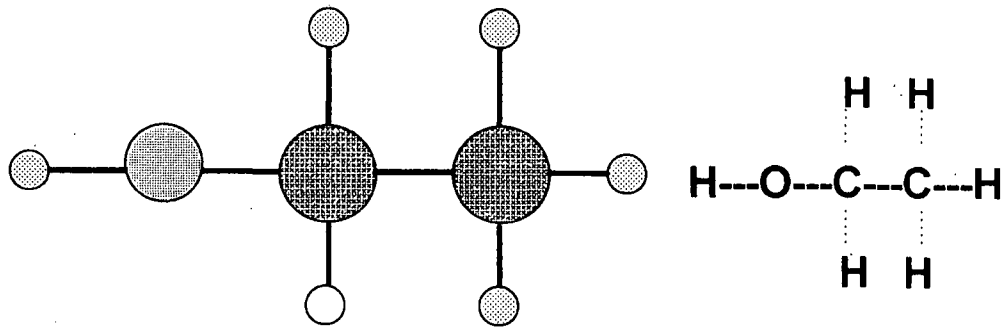


Figura 1 - Esquema ilustrativo dos possíveis locais de ação da molécula de EtOH:
 a) atuação direta na membrana produzindo uma desorganização; b) ativação ou inibição de receptores de membrana; c) bloqueio de canais de Ca^{++} .

irritabilidade e ataques de ansiedade com dor no peito, palpitações, dispnéia e depressão (Davis, 1971). Muitas vezes, o álcool alivia estes sintomas, resultando em um círculo vicioso entre a bebida, a depressão e, novamente, a bebida que pode levar à síndrome de retirada (Goodwin, 1992). Em relação a esta síndrome, Humble (1987) sugere que o dependente de álcool está passível de apresentar ataques de pânico e estes, por sua vez, podem deflagrar outras desordens (Figura 2) que poderiam, eventualmente, favorecer novamente a busca pela bebida alcoólica.

1.2. Fatores genéticos, hormonais, ambientais e de desenvolvimento nos efeitos do EtOH

Embora esteja estabelecido que os efeitos do EtOH sejam dependentes de fatores genéticos, hormonais, ambientais e de desenvolvimento (Wilson e Abrams, 1977; Abrams e Wilson, 1979; Bradlyn *et al.*, 1981; Engel, 1985; Frezza *et al.*, 1990; Dawson *et al.*, 1992; Kendler *et al.*, 1992; Van Haaren e Anderson, 1994), os mecanismos exatos para se compreender tais efeitos são pouco conhecidos. O estudo desses fatores tem fornecido novas informações e contribuído para o emprego de alternativas terapêuticas para esta condição patológica.

A influência de fatores genéticos na vulnerabilidade aos efeitos do álcool e ao alcoolismo tem sido amplamente investigada (Pardes *et al.*, 1989) e várias são

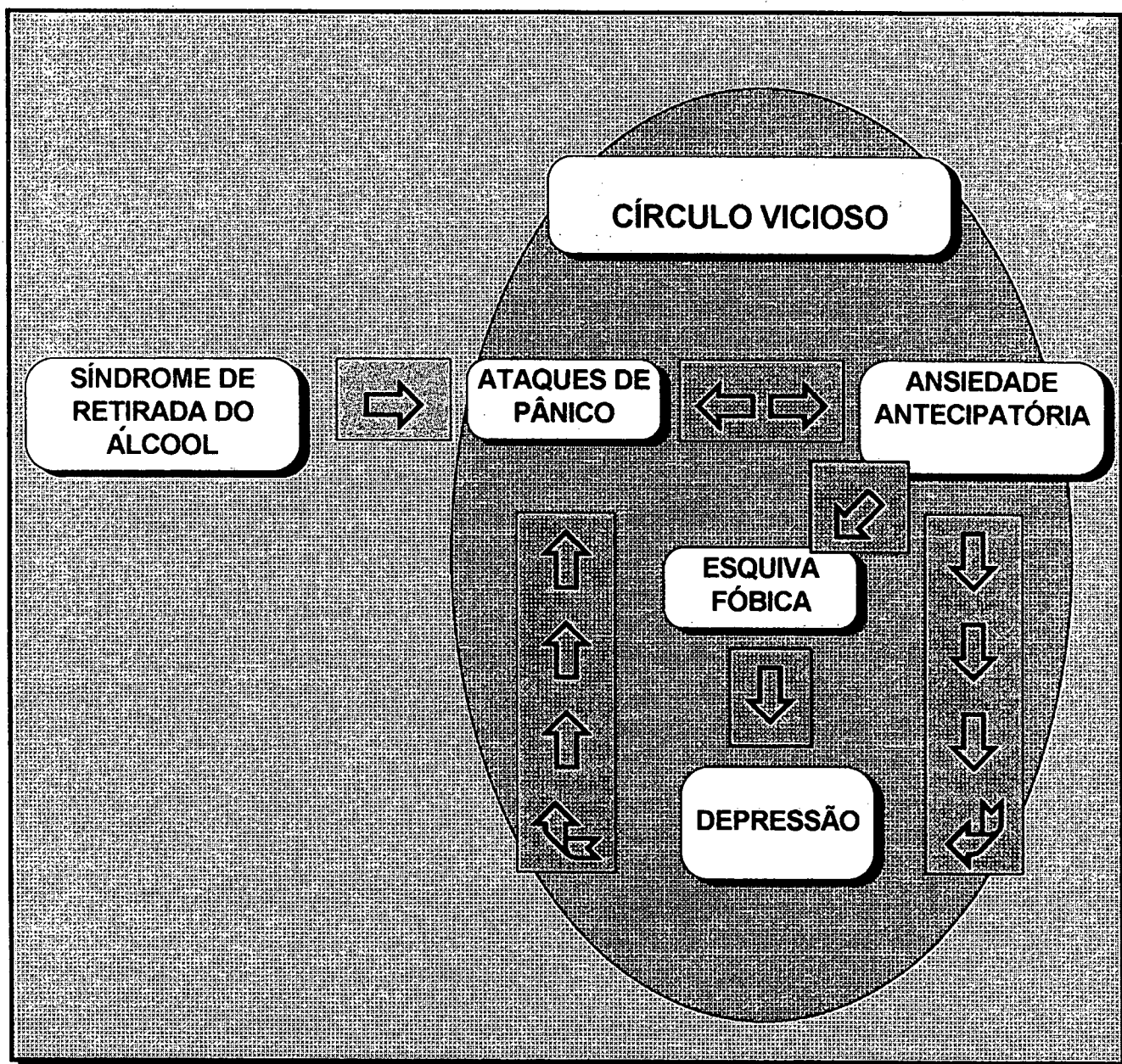


Figura 2 - Representação esquemática de um fator desencadeante nas desordens de pânico. O círculo vicioso é baseado no conceito interativo de pânico e ansiedade antecipatória. (Modificado de Humble, 1987)

as evidências demonstrando a importância dos fatores de risco genéticos no desenvolvimento do alcoolismo (Bohman *et al.*, 1987; Kaprio *et al.*, 1987). Estudos em familiares de dependentes do álcool têm demonstrado um risco 3 a 4 vezes maior para o alcoolismo em filhos e filhas dos dependentes, sem outras evidências de risco aumentado para outras doenças psiquiátricas (Goodwin, 1976; Cotton, 1979; Schuckit, 1986).

Fatores genéticos e hormonais importantes no desenvolvimento e manutenção das características específicas do sexo na função neuronal, interagem para produzir as diferenças sexuais observadas nas respostas para o álcool (Lancaster, 1994). Por exemplo, as concentrações alcoólicas sanguíneas após consumo de doses equivalentes, são maiores no sexo feminino do que no masculino (Frezza *et al.*, 1990), podendo ocasionar riscos aumentados das consequências médicas em decorrência do abuso do álcool, tais como doenças hepáticas, cerebrais e déficits comportamentais (Norton *et al.*, 1987; Harper *et al.*, 1990; Glenn e Parsons, 1992). Investigações da relação entre sistemas de neurotransmissores regionais, mecanismos de ação de droga e comportamentos potencialmente relacionados com a ansiedade ou depressão têm sido incluídas como focos de diferenças sexuais (Blanchard *et al.*, 1991; 1992), uma vez que as distúrbios de ansiedade acometem mais as mulheres que os homens (Raguram e Bhide, 1985). Lancaster (1994) discutiu a hipótese de que muitas das diferenças sexuais observadas em relação ao uso e abuso do álcool são determinadas por

diferenças sexuais no cérebro, as quais, de certa forma, diferencialmente influenciam as respostas comportamentais e neuroquímicas para o álcool entre os sexos.

A influência de fatores ambientais nos efeitos do álcool pode ser observada pelo fenômeno da tolerância. Há evidências, por exemplo, de que o desenvolvimento da tolerância aos efeitos do álcool, durante várias sessões de bebidas, é acelerado se o álcool for administrado sempre no mesmo ambiente, fenômeno chamado de tolerância dependente do ambiente. Assim, ratos que regularmente recebem álcool em um ambiente e um placebo em ambiente diferente demonstram tolerância aos efeitos produzidos pelo EtOH somente no ambiente específico em que o álcool foi administrado (Mansfield e Cunningham, 1980).

Em relação ao desenvolvimento, as mudanças na expressão de certos sistemas neuroquímicos que normalmente ocorrem nas crianças não são observadas em adultos, isto porque as mudanças morfológicas no desenvolvimento neural, nos neurotransmissores e seus receptores flutuam, em alguns casos marcadamente, durante a ontogênese (Insel, 1995). Portanto, o desenvolvimento do organismo parece ser um importante fator a ser considerado no estudo dos efeitos do EtOH. Durante o período do final da infância e adolescência, os níveis hormonais mudam drasticamente como um resultado do início da puberdade. Além disso, há um desenvolvimento incompleto dos

sistemas biológicos cerebrais (Witt, 1994). O EtOH pode alterar a síntese de novos receptores e esta possibilidade é importante pelo fato de que os receptores para o neurotransmissor glutamato (GLU) são marcadamente ativados durante o início da puberdade (Bourguignon *et al.*, 1990), período em que normalmente se dão os primeiros contatos entre as bebidas alcoólicas e o organismo.

1.3. *Mecanismos de ação do EtOH*

O avanço das pesquisas sobre os mecanismos moleculares nos sistemas de neurotransmissores do sistema nervoso central (SNC) tem permitido um melhor entendimento das ações do EtOH. Assim, há evidências de que o EtOH, induz uma alteração na permeabilidade das membranas neuronais (Figura 1). Esta droga produz uma alteração na estrutura da membrana celular, tornando-a mais fluida, e por isso, alterando o funcionamento da mesma (Chin e Goldstein, 1977; Goldstein, 1979; Sun, 1979; Littleton, 1980; Goldstein e Chin, 1981; Lyon *et al.*, 1981; Goldstein *et al.*, 1982; Franks e Lieb, 1984). Além disso, há relatos de que o EtOH reduz o influxo de cálcio (Ca^{++}), em canais de cálcio sensíveis à voltagem, reduzindo a excitabilidade da membrana celular (Wang *et al.*, 1991; Little *et al.*, 1988; Hoffman *et al.*, 1989; Leslie *et al.*, 1990). Ainda, o EtOH pode influenciar, ativando ou inibindo, a liberação de vários neurotransmissores, tais como a acetilcolina (Erickson e Graham, 1973), serotonina (Tabakoff *et al.*, 1977); dopamina - DA (Kiiianmaa e Tabakoff, 1983) e noradrenalina - NA

(Shefner e Tabakoff, 1985). Dados mais recentes mostram que o EtOH age afetando específica e seletivamente a função de certas proteínas de ligação da membrana, entre elas os receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA_A), inibitório, e do GLU, excitatório (Tabakoff e Hoffman, 1991), acoplados a canais iônicos, que têm sido muito sensíveis às ações desta droga (Korpi, 1994; Nevo e Hamon, 1995). Atualmente, várias evidências sugerem que os efeitos neurofisiológicos e patológicos do álcool sejam mediados, em grande parte pelo sistema glutamatérgico (Tsai *et al.*, 1995). No presente estudo maior ênfase será dada ao papel do sistema glutamatérgico nos efeitos do EtOH.

2. AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS E ÁLCOOL

2.1. Aminoácidos excitatórios

Estudos bioquímicos, farmacológicos e anatômicos sugeriram um papel neurotransmissor para os aminoácidos GLU e aspartato (ASP) nos sistemas corticofugais (Fagg e Foster, 1983; Streit, 1984). Através do uso de neuroquímica quantitativa e imunocitoquímica, tornou-se aparente que o maior sistema neuronal excitatório no cérebro, incluindo as células piramidais, aferentes primárias sensoriais, células granulares cerebelares, e vias excitatórias ascendente e descendente, usa o GLU ou outros aminoácidos excitatórios (AAE) como seus neurotransmissores (Cotman e Monaghan, 1987).

Os receptores do GLU podem ser classificados em duas grandes famílias, com base em seus mecanismos de transdução: 1) receptores ionotrópicos, os quais estão acoplados a canais iônicos, e 2) receptores metabotrópicos, acoplados ao inositol 1, 4, 5-trifosfato, mediados pela proteína G. Os ionóforos do GLU são uma família de receptores que parecem estar implicados em diversos efeitos do EtOH no SNC. São permeáveis a cátions, e podem ser subclassificados de acordo com os respectivos ligantes de alta-afinidade, em subtipos: N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato e ácido propiônico α -amino-3 hidroxi-5 metil-4 isoxazole (AMPA) (Fagg e Massieu, 1991; Gasic e Hollmann, 1992; Scatton, 1993). Há também os receptores glutamatérgicos que ativam sistemas de segundos mensageiros, mais notadamente a hidrólise de fosfatidilinositóis (Sladeczek *et al.*, 1985). Esses receptores metabotrópicos parecem existir nos sítios pré- e pós-sinápticos em certas regiões do cérebro (Lovinger, 1991; 1993).

O complexo receptor NMDA (Figura 3), consiste de um sítio de reconhecimento para o GLU, um canal iônico (Cotman e Iversen, 1987; Kemp *et al.*, 1987), bem como de outros sítios modulatórios como o sítio da glicina (GLI), que é insensível à estriçnina (Foster e Fagg, 1987; Johnson e Ascher, 1987; Monaghan *et al.*, 1989; Thomson, 1989; 1990) e de dois sítios distintos para cátions divalentes como o magnésio (Mg^{++}) e zinco (Zn^{++}). Além disso, há mais dois sítios onde, em um deles, as poliaminas podem atuar modulando a ativação do canal (Fagg e Massieu, 1991), e outro sítio para anestésicos dissociativos,

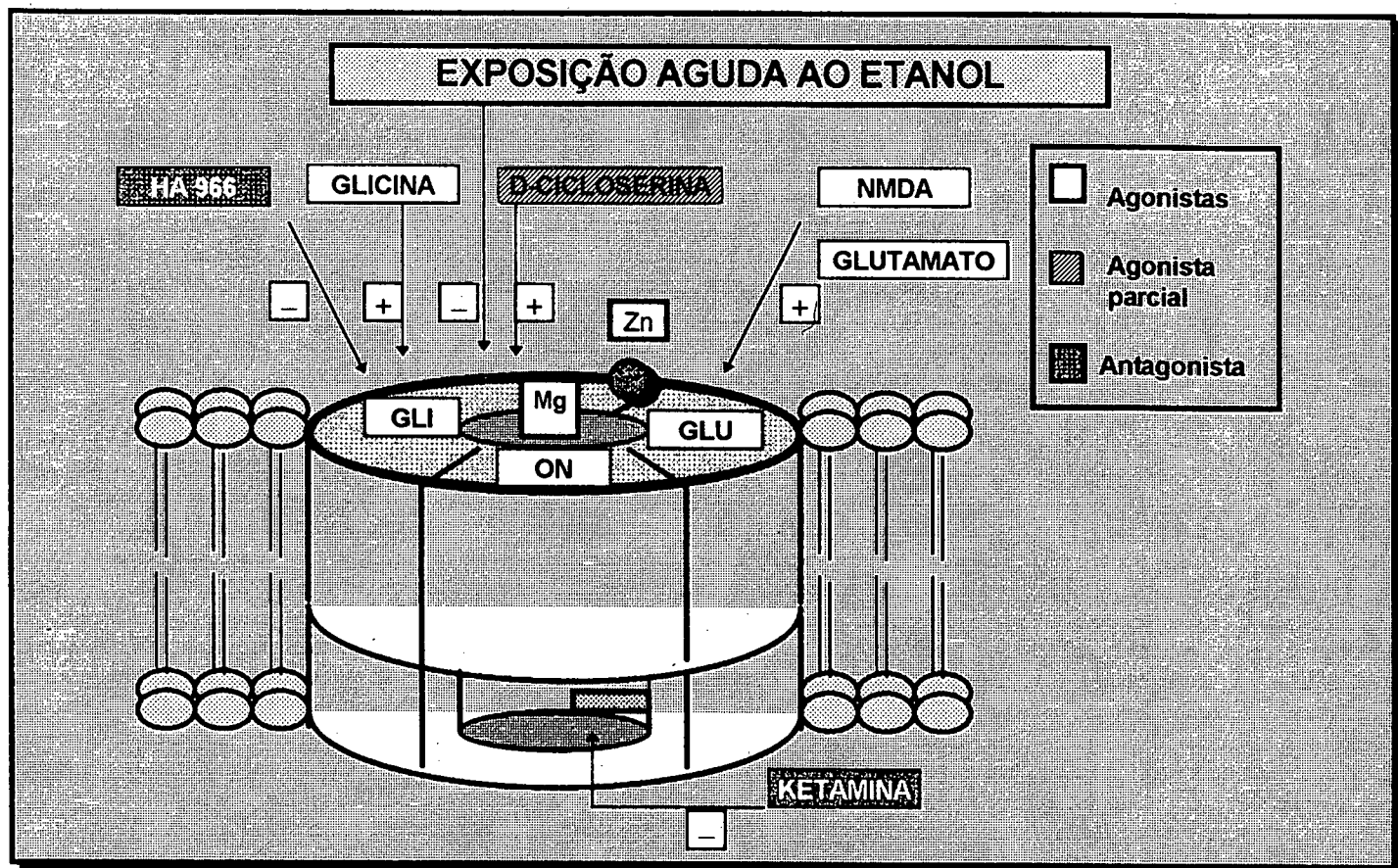


Figura 3 - Modelo esquemático para ilustrar a interação do EtOH, assim como outros agonistas e antagonistas, com o complexo receptor NMDA.

onde a fenciclidina (FEN) e a ketamina (KET) se ligam (Wong *et al.*, 1986; Anis *et al.*, 1983; Mayer, 1991), podendo atuar como antagonistas não competitivos do GLU. Mais recentemente, foram descritos uma região sensível ao pH, onde um íon hidrogênio pode interagir (Lipton e Rosenberg, 1994) e um sítio sensível ao óxido nítrico (Recasens, 1995).

Vários laboratórios têm mostrado as implicações do receptor NMDA, nos mecanismos responsáveis por um grande número de outros processos fisiológicos e patológicos, como o dano celular neuronal, aprendizagem e memória, atividade epileptogênica e neurotoxicidade (Simon *et al.*, 1984; Dingledine *et al.*, 1986; Cotman *et al.*, 1989; Monahan *et al.*, 1989; Lovinger, 1993).

2.2. *Álcool e Sistema NMDA*

Várias evidências indicam que o EtOH afeta a transmissão glutamatérgica por interferir com a neurotransmissão excitatória rápida (Tsai *et al.*, 1995). Um dos efeitos eletrofisiológicos predominantes do EtOH é reduzir a transmissão sináptica excitatória glutamatérgica, inibindo a corrente elétrica gerada pela ativação do receptor NMDA (Nie *et al.*, 1993). Esta inibição é dependente da concentração, e os níveis de EtOH associados com os efeitos “in vivo” correlacionam-se com aqueles que causam inibição da corrente de NMDA (Lovinger *et al.*, 1989). Esta ação parece ser dependente da região cerebral considerada. Assim, a administração aguda de EtOH não tem efeito na liberação,

recaptação ou concentração tecidual do GLU no prosencéfalo. Entretanto, causa diminuição significativa no ASP e GLU no mesencéfalo e tronco cerebral, e diminui a concentração tecidual de GLU no hipocampo (McCown *et al.*, 1986).

Embora seja geralmente aceito que o EtOH possa inibir a função do receptor NMDA, há pouca evidência do mecanismo pelo qual esta inibição é produzida. Nos últimos anos tem sido dada ênfase à ligação da GLI ao sítio de aminoácidos neutros que tem mostrado efeito regulatório relevante na neurotransmissão mediada pelo receptor NMDA (Thomson, 1990). Na ausência completa da GLI ou na presença de um antagonista da GLI, a resposta eletrofisiológica dos agonistas do NMDA é completamente bloqueada. Esta resposta pode ser restaurada pela adição de GLI (Verdoorn *et al.*, 1987; Kemp *et al.*, 1988). Como a GLI é um co-agonista desse receptor e absolutamente necessária para a ativação do receptor pelo GLU (Kemp e Leeson, 1993), várias linhas de pesquisa investigaram se o EtOH poderia estar atuando naquele sítio modulatório, interferindo, portanto, naquela ativação. Foi relatado que a GLI, a D-serina e D-cicloserina (DCS), agonistas daquele sítio, diminuem a inibição mediada pelo EtOH sobre o influxo de Ca^{++} estimulado pelo NMDA (Hood *et al.*, 1989; Rabe e Tabakoff, 1990).

Woodward e Gonzales (1990) sugeriram que o EtOH pode atuar no sítio de ligação da GLI insensível à estriçnina, onde uma interação entre o NMDA ou GLU e GLI pode ser necessária para os efeitos mediados pelo receptor NMDA

(Forsythe *et al.*, 1988), para produzir a inibição dos processos mediados por aquele receptor. Esta sugestão foi baseada no fato de que a GLI, quando adicionada exogenamente, reverte completamente os efeitos inibitórios do EtOH sobre a liberação de DA endógena estimulada pelo NMDA em fatias estriatais de rato (Woodward e Gonzales, 1990). Outros estudos reforçam esta hipótese pela demonstração da capacidade da GLI ou seus agonistas em reverter os efeitos inibitórios do EtOH no aumento de Ca^{++} intracelular estimulado pelo NMDA em neurônios de rato (Rabe e Tabakoff, 1990). Consistente com esses achados, o EtOH reduziu o aumento da estimulação do GLU pela GLI a produzir GMPc nas células granulares cerebelares, o qual é mediado pelo influxo de Ca^{++} através do receptor NMDA (Litten e Allen, 1991). Contudo, no hipocampo, a inibição da corrente ativada pelo NMDA produzida pelo EtOH, não envolveu uma interação competitiva com a GLI (Peoples e Weight, 1992; Woodward, 1994) e este aminoácido também não alterou os efeitos inibitórios do EtOH sobre a liberação de NA estimulada pelo NMDA (Gonzales, 1990).

Existem evidências de que o receptor NMDA está envolvido no desenvolvimento da tolerância ao álcool. Foi observado que antagonistas do receptor NMDA, como o (+) MK-801 e a ketamina bloqueiam a tolerância aos efeitos do EtOH sobre a coordenação motora e temperatura corporal, através de um efeito dependente da dose e estereoespecífico (Khanna *et al.*, 1991, 1992). Por outro lado, agonistas do receptor NMDA, como a DCS estimulam o

desenvolvimento da tolerância aos efeitos do EtOH, sendo esta ação bloqueada por antagonistas deste receptor (Khanna *et al.*, 1993a). Além disso, inibidores da óxido nítrico sintetase, como a L-nitroarginina e L-nitroarginina metil-éster, bloqueiam a tolerância aos efeitos do EtOH e também o aumento da tolerância induzido pela DCS (Khanna *et al.*, 1993b, 1995).

3. ANSIEDADE E ÁLCOOL

3.1. Ansiedade

A base biológica das desordens da ansiedade não é conhecida. Todavia, há boa razão para considerar que os mesmos sistemas neuronais estejam envolvidos na geração dos fenômenos dos estados de medo fisiológico agudo e do estado de ansiedade patológica, ainda que as situações e condições que levam à ansiedade fisiológica e patológica sejam diferentes (Haefely, 1990).

Sheehan (1982) propôs uma classificação da síndrome de ansiedade sugerindo que em sujeitos com ataques de pânico ou ataques com sintomas autonômicos similares, provavelmente haveria um erro de metabolismo inato, denominado de ansiedade endógena. Outras desordens de ansiedade, que são mais diretamente relacionadas a situações fóbicas, ou originadas de estímulos fóbicos, são classificadas como ansiedade exógena. Por outro lado, a existência de múltiplos tipos de desordens de ansiedade, cada qual com um padrão característico de resposta às drogas tem sido reconhecida (Fyer *et al.*, 1987) e

maiores avanços têm sido dados, recentemente, no entendimento da neurobiologia das respostas do medo (Fanselow, 1991; LeDoux, 1993).

A ansiedade, portanto, é um termo usado para descrever um estado emocional normal, associado com eventos estressantes ou ameaçadores, ou então associado com dificuldades psicológicas em condições patológicas. Quando a ansiedade é crônica, e não está claramente ligada a eventos bem-definidos, é geralmente considerada anormal e apropriada para intervenção psicológica ou psiquiátrica. Como uma condição clínica, a ansiedade é passível de análise biológica de bases psicológicas e bioquímicas (Sanger, 1991). Sabendo-se que os mecanismos neurais das respostas às circunstâncias que induzem medo, provavelmente são similares em humanos e animais, modelos animais de ansiedade podem ter um bom valor preditivo das respostas nas desordens de ansiedade (Handley, 1994). Estas, por sua vez, conhecidas por estarem afetadas em dependentes de álcool, têm sido investigadas em animais tratados com EtOH.

3.2. *Modelos animais de ansiedade*

Em pesquisas animais, tem sido relatado que as injeções agudas de EtOH têm um efeito ansiolítico em diferentes testes (Dickerson e Ferraro, 1976; Dudek *et al.*, 1986; Blanchard *et al.*, 1990, 1993; Coop *et al.*, 1990). Assim, injeções crônicas (Blokland *et al.*, 1992; File, 1994) ou pequeno tempo de ingestão de EtOH, parecem aumentar a atividade geral de animais no teste do campo aberto -

“open-field” (Bond e Di Guisto, 1975). Estes estudos estão de acordo com a “hipótese da redução da ansiedade” pelo consumo de EtOH (Cappell e Herman, 1972; Cappell e Greely, 1987). Outros modelos envolvendo atividades locomotora e exploratória de roedores têm sido muito usados para avaliação da ansiedade, incluindo o labirinto em Y (Marriott e Spencer, 1965), o campo aberto com orifícios no assoalho para exploração direcionada - “holeboard” (Nolan e Parkes, 1973) e a caixa claro-escuro (Crawley e Goodwin, 1980), pela rapidez do uso e não requererem equipamentos complexos e caros.

Tem sido proposto por vários pesquisadores (Montgomery, 1955) que roedores são motivados a investigar objetos e lugares novos, mas que a novidade também induz medo, o que pode tender a suprimir a exploração ou produzir fuga ativa da situação nova. Drogas (ou outras manipulações) que reduzem o presumível mecanismo inibitório podem aumentar, claramente, os níveis de exploração, sem afetar as respostas à novidade (Gray, 1977). Além disso, em vista das grandes evidências de diferenças sexuais na ansiedade basal e na resposta a certas drogas anti-ansiedade (Blanchard *et al.*, 1992), é importante que as manipulações experimentais sejam efetuadas com animais de ambos os sexos.

3.3. *Labirinto em cruz elevado*

O labirinto em cruz elevado (LCE) tem sido considerado como um teste sensível para o estudo do efeito ansiolítico do álcool em camundongos (Lister,

1987; 1988; Durcan e Lister, 1988) e ratos (Criswell *et al.*, 1994), assim como do efeito ansiogênico de outras drogas (Pellow *et al.*, 1985). Este modelo experimental é muito utilizado, não somente para o estudo de drogas ansiolíticas e/ou ansiogênicas, mas também para o estudo dos mecanismos neurobiológicos da ansiedade (Pellow e File, 1986; Kostowski *et al.*, 1989; Almeida *et al.*, 1991; Audi *et al.*, 1991; Guimarães *et al.*, 1991; Critchley *et al.*, 1992; Russo *et al.*, 1993; Matheus *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1995; Lopes-da-Silva *et al.*, 1996). Sua validação comportamental para ratos (Pellow *et al.*, 1985) e camundongos (Lister, 1987), foi feita a partir dos trabalhos pioneiros de Montgomery (1955) e de Handley e Mithani (1984). O LCE é baseado, entre outros fatores, na aversão natural que roedores apresentam pelos braços abertos do labirinto (Montgomery, 1955) pois, quando ratos são forçados a permanecerem nesses braços, mostram manifestações comportamentais e fisiológicas de medo, tais como congelamento, defecação, e aumento nos níveis de corticosteróides plasmáticos (Pellow *et al.*, 1985) e como uma consequência, permanecem um tempo maior nos braços fechados. A proporção da exploração total nos braços abertos determina uma medida de ansiedade, de tal modo que o aumento nas percentagens de tempo e de entradas nos braços abertos é considerado como indicativo de ação ansiolítica de drogas (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985).

Em uma série de estudos, Treit *et al.* (1993) indicaram que o fator de maior contribuição para esta “reação de medo” é a falta das paredes altas dos ramos

abertos, que impediria a tigmotaxia. Morrison e Stephenson (1970) relataram que drogas que diminuem o medo ou a ansiedade, como por exemplo clordiazepóxido, diazepam e pentobarbital, podem aumentar a frequência e a duração de entradas nos braços abertos de um labirinto em Y, ao contrário de outras drogas como anfetamina, nicotina, imipramina, atropina e clorpromazina.

A avaliação do comportamento de animais no LCE está sujeita a variações decorrentes do próprio organismo em estudo, ou do procedimento empregado (Rodgers e Cole, 1993). Assim, manipulações das condições de criação dos animais, ou fatores sexuais e ontogenéticos, podem interferir com as respostas comportamentais em relação às drogas sob investigação. Em nosso laboratório foi observado que ratos mantidos em isolamento social pós-desmame por 30 dias, apresentaram diferenças comportamentais quando submetidos ao LCE aos 2 meses de idade, em comparação com ratos criados em grupo (Lopes-da-Silva *et al.*, 1996). Por outro lado, considerando-se o sexo e a idade, outro estudo de nosso laboratório mostrou que ratos testados no LCE aos 2 meses de idade apresentaram respostas sugestivas de baixos níveis de ansiedade, enquanto aqueles testados aos 4 meses de idade ou mais, apresentaram respostas sugestivas de maiores níveis de ansiedade significativamente mais elevadas, independentemente do sexo. No entanto, aos 3 meses de idade, ratos machos apresentaram comportamento sugestivo de maiores níveis de ansiedade do que fêmeas (Imhof *et al.*, 1993). Foi também verificado que no LCE, a resposta a

drogas ansiolíticas ou ansiogênicas variou de acordo com a idade dos animais. Assim, o diazepam, droga ansiolítica, foi efetivo somente em animais de 4 meses, enquanto que o pentilenotetrazol, droga ansiogênica, foi efetivo preferencialmente em animais testados aos 2 meses, mostrando a dependência da idade nessa resposta (Lopes-da-Silva *et al.*, 1996).

3.4. *Álcool e Ansiedade*

O beber excessivo tem sido associado por alguns a um medo particular, bem como a depressão, a ansiedade e a problemas situacionais (Ludwing, 1972). Com isso, vários estudos clínicos têm sugerido que o EtOH reduz os estados de ansiedade, frustração ou estresse (Polivy *et al.*, 1976; Wilson e Abrams, 1977; Lepola, 1994).

Evidências para uma associação entre alcoolismo e ansiedade emergiram de estudos clínicos de pacientes com alcoolismo (Woodruff *et al.*, 1972; Mullaney e Trippett, 1979; Bowen *et al.*, 1984; Smail *et al.*, 1984; Weiss e Rosenburg, 1985; Chambless *et al.*, 1987) e pacientes com desordens de ansiedade (Lader, 1972; Marks e Lader, 1973). Através dos estudos epidemiológicos confirmou-se esta associação (Helzer e Pryzbeck, 1988; Regier *et al.*, 1990) e, mais recentemente, outros estudos surgiram a este respeito (Kushner *et al.*, 1990; Wesner, 1990; Cowley, 1992).

Lader (1972) observou que muitas drogas anti-ansiedade são auto-administradas, sendo o álcool o agente mais comum. Smail *et al.* (1984) e Stockwell *et al.* (1984), discutindo o possível mecanismo para esta associação, notaram que muitos pacientes com ansiedade relataram que haviam usado deliberadamente álcool para reduzir situações de medo. Baseados nas observações de que as pessoas com desordens de ansiedade tendem a fazer uso do álcool, numerosos estudos clínicos sugerem que as desordens de ansiedade podem ser etiologicamente associadas com alcoolismo (Blankfield, 1986; Merikangas *et al.*, 1994).

Kushner *et al.* (1990) concluíram que a associação entre as desordens de ansiedade e alcoolismo pode ser principalmente atribuída à ocorrência concomitante das desordens fóbicas e alcoolismo, havendo morbidade concomitante com estados de pânico e ansiedade generalizada. Estes dados concordam com observações anteriores de que o estado de ansiedade fóbica pode ser uma expressão do alcoolismo sintomático (Slater e Roth, 1969; Mullaney e Trippett, 1979).

4. SISTEMA NMDA, ANSIEDADE E ÁLCOOL

Em relação a agonistas ou antagonistas do NMDA, vários estudos têm sugerido que drogas que atuam no sítio modulatório da GLI insensível à estricnina, podem estar implicadas na modulação da ansiedade (Corbett e Dunn,

1993; Anthony e Nevins, 1993). No LCE, agonistas do sítio da GLI, acoplados ao receptor NMDA, têm demonstrado ação ansiogênica (Schmitt *et al.*, 1995). Já a administração de antagonistas competitivos deste sítio de ligação, como o ácido 7 cloro-quinurênico (7 Cl-Quin) e o 3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidinona (HA-966) têm apresentado ação ansiolítica (Trullas *et al.*, 1989; Matheus *et al.*, 1994).

Por outro lado, vários estudos têm relatado que antagonistas não competitivos do receptor NMDA, atuando em um sítio aparentemente no canal iônico, como o alucinógeno FEN (Anis *et al.*, 1983), o anticonvulsivante experimental dizocilpina (MK-801) (Wong *et al.*, 1986; Kemp *et al.*, 1987); e os anestésicos dissociativos entre eles a KET (Anis *et al.*, 1983; Honey *et al.*, 1985) podem prejudicar a aquisição da memória (Alessandri *et al.*, 1989; Heale e Harley, 1990; Kant *et al.*, 1991; Lalonde e Joyal, 1991), aumentar as taxas de respostas punidas em ratos e pombos (Chait *et al.*, 1981; Porter *et al.*, 1989) e podem apresentar um claro efeito ansiolítico em vários modelos animais de ansiedade (Dunn *et al.*, 1989; Trullas *et al.*, 1989; Blanchard *et al.*, 1992). Foi verificado que estes compostos aumentam a exploração nos braços abertos de um LCE, bem como a interação social em ratos pareados e bloqueiam o aumento do metabolismo de DA induzido pelo estresse (Dunn *et al.*, 1989; Serrano *et al.*, 1989).

Como podemos observar, os mecanismos de ação do EtOH sobre as respostas do receptor NMDA não estão ainda bem definidos, requerendo uma

melhor compreensão da heterogeneidade molecular dos receptores glutamatérgicos. Embora o EtOH seja um potente e seletivo inibidor de vários eventos transmembranares e da neurotransmissão, mediados pelo receptor NMDA, alguns pesquisadores questionam esse mecanismo. Estudos realizados por Criswell *et al.* (1994), usando o modelo do LCE, excluíram a participação do receptor NMDA no efeito ansiolítico do EtOH, uma vez que o perfil de ação desta droga se assemelhou ao de um agonista GABAérgico, mas foi diferente do perfil apresentado pelo MK-801. Por outro lado, Deutsch *et al.* (1992) demonstram claramente que o receptor NMDA é o que apresenta maior sensibilidade aos efeitos do EtOH, quando comparados com mecanismos envolvendo influxo de Ca^{++} e receptor $GABA_A$.

Pelas evidências aqui apresentadas, pode-se observar que apesar de existirem numerosos trabalhos sobre a participação do receptor NMDA nos efeitos do EtOH “in vitro”, são poucos os estudos sobre essa participação “in vivo”. Particularmente em relação ao efeito ansiolítico avaliado em modelos animais, os conhecimentos são ainda mais escassos. Considerando-se essas evidências, aliadas à existência de efeitos de drogas dependentes da idade e do sexo nas respostas comportamentais de ratos testados no LCE (Lopes-da-Silva *et al.*, 1996), o presente estudo foi realizado para investigar o envolvimento do sistema NMDA bem como das influências dos fatores idade e sexo no efeito ansiolítico do EtOH.

OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem por objetivos gerais investigar:

1. A participação do receptor NMDA no efeito ansiolítico do EtOH;
2. A influência do sexo e da idade no efeito ansiolítico do EtOH, avaliados em ratos machos e fêmeas no modelo do LCE.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir os objetivos gerais, serão considerados os seguintes objetivos específicos:

1. Estudar o efeito ansiolítico de diferentes doses de EtOH em ratos machos e fêmeas, aos 2, 3, 4 e 5 meses de idade, testados no LCE;
2. Estudar o efeito da DCS, um agonista parcial do sítio da glicina no complexo receptor NMDA, sobre a ação ansiolítica do EtOH;
3. Comparar os efeitos produzidos pelo EtOH com os efeitos produzidos pelo HA-966, um antagonista seletivo do sítio da GLI no complexo receptor NMDA;
4. Verificar se a DCS poderia interferir com a ação ansiolítica da KET, um antagonista não competitivo do receptor NMDA, a nível do canal iônico (sítio da fenciclidina).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, com 2, 3, 4 e 5 meses de idade, pesando respectivamente 190, 270, 310 e 340 g (ratos machos) e 160, 180, 200 e 210 gr (ratos fêmeas). Após o desmame, os animais foram separados por sexo, sendo alojados em grupos de 8 por gaiola de plástico (39x32x16 cm) com forração de serragem e mantidos em uma temperatura controlada de $23\pm 1^{\circ}$ C e um ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luz de 6:00 às 18:00 horas), tendo água e ração “ad libitum”. Todos os experimentos foram feitos entre 7:00 e 12:00 horas, com o objetivo de minimizar as influências circadianas. Em todos os experimentos o número de animais por grupo foi de 10.

2. DROGAS

O etanol (Merck Laboratory) foi preparado através da diluição com salina para obter uma concentração de 14% p/v. Os reagentes para dosagem alcoólica foram obtidos da Sigma Chem Co. D-cicloserina, (\pm)HA-966 e ketamina (Research Biochemical International - RBI) foram dissolvidas em solução salina. Todas as drogas ou seus veículos foram injetados por via intraperitoneal e as doses selecionadas através da literatura e/ou experimentos preliminares. Os

volumes de injeção do EtOH variaram de acordo com a dose empregada. Para as demais drogas foi usado o volume de 1 ml/kg de peso.

3. EQUIPAMENTOS

3.1. *Teste da atividade locomotora*

A avaliação da atividade locomotora foi realizada em uma caixa de madeira medindo 73x30x22 cm, com 3 células fotoelétricas instaladas a 3 cm de altura do piso em grade, espaçadas igualmente ao longo de sua extensão, e acoplada a um contador digital que registra o número de vezes que o rato interrompe os feixes de luz (cada interrupção do feixe de luz constitui uma medida da atividade). Somente os movimentos horizontais do animal foram detectados pelas fotocélulas. O teste foi desenvolvido em um ambiente com baixa intensidade luminosa.

3.2. *Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE) e arena*

O LCE é um aparato feito de madeira (figura 4), elevado 50 cm do chão, constituído por dois braços abertos (50 x10 cm) e dois fechados (50x10x40 cm), opostos entre si (Pellow *et al.*, 1985). Foi colocada uma proteção de acrílico com 1 cm de altura ao redor dos braços abertos, para minimizar a queda dos animais. O equipamento foi colocado em uma sala parcialmente escura, iluminada com luz vermelha de intensidade de 44 lux. Antes de ir para o LCE, o animal era colocado

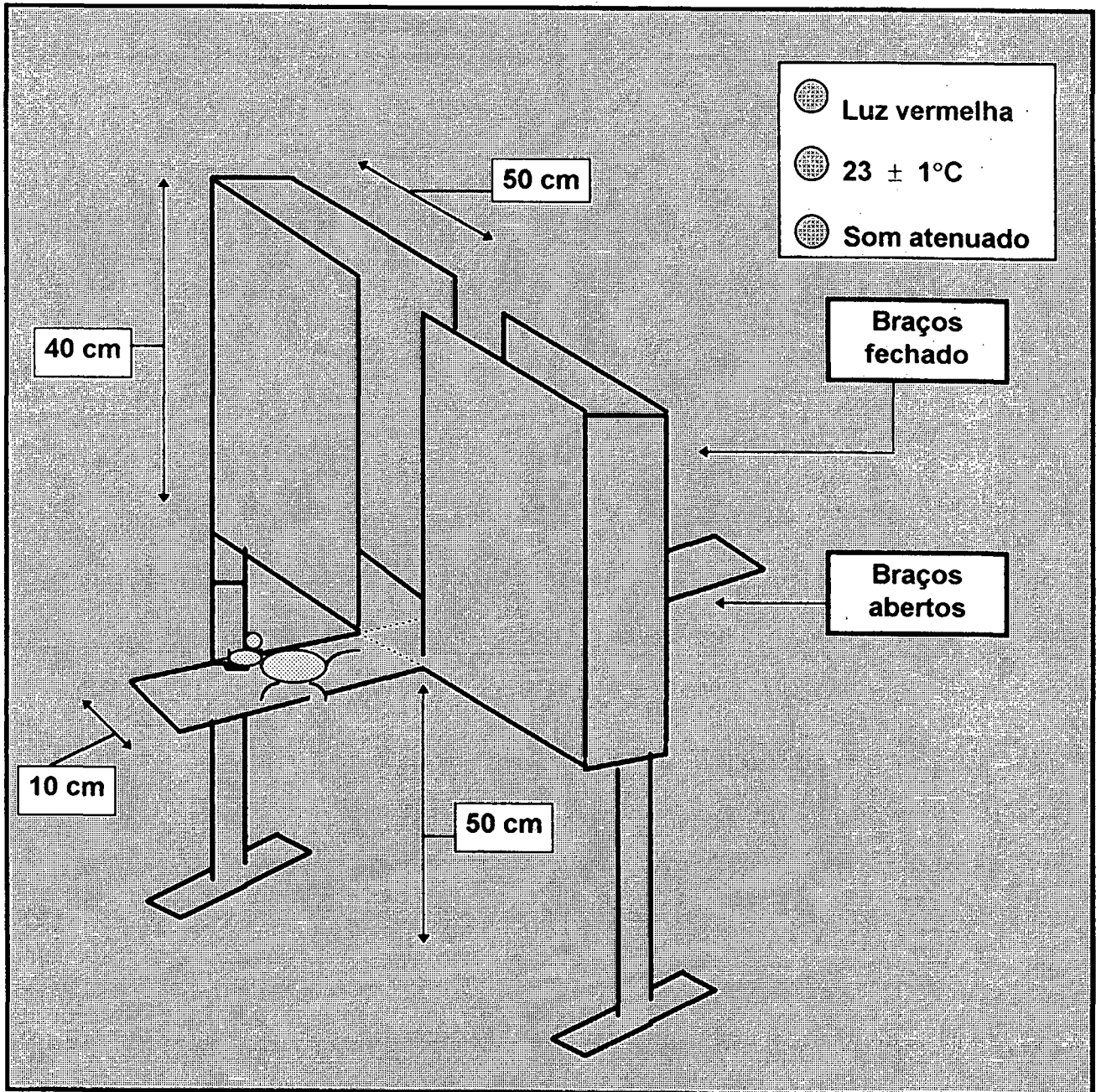


Figura 4 - Representação esquemática do labirinto em cruz elevado.

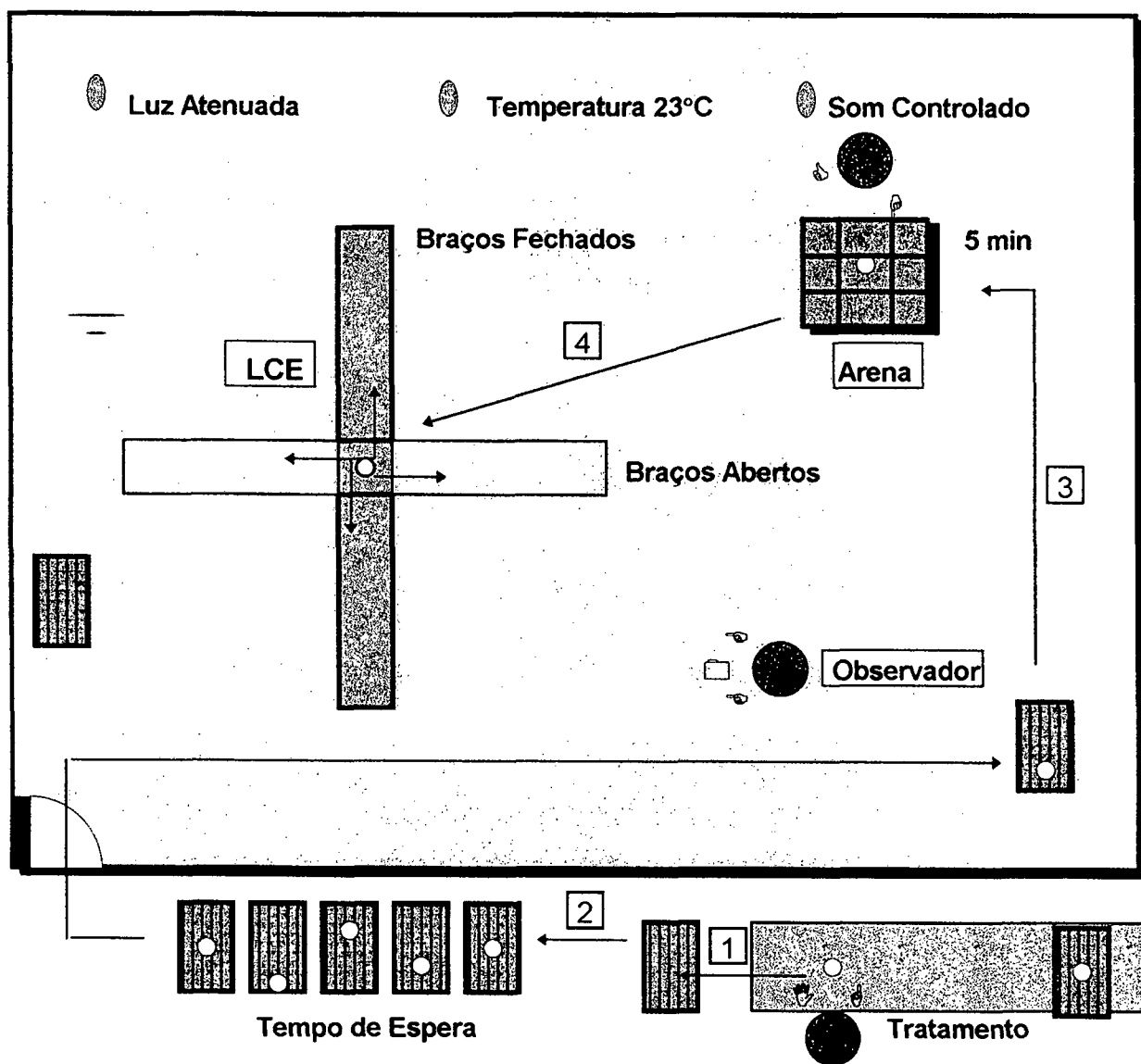


Figura 5 - Esquema das etapas dos procedimentos experimentais com ratos no labirinto em cruz elevado.

em uma arena de madeira, em forma de um campo aberto quadrado, medindo 60x60x35 cm, com o objetivo de aumentar a atividade locomotora e habituar o animal ao ambiente do teste (Lister, 1987). A arena foi dividida em 9 quadrados, através de linhas perpendiculares, utilizando-se para isto fita adesiva, com um segundo objetivo que era o de avaliar a atividade locomotora (Figura 5). Após o teste com cada animal, os equipamentos eram limpos com uma solução de EtOH a 10% v/v e então secos com papel absorvente.

Para este teste os animais primeiramente recebiam o tratamento em uma ante-sala, posteriormente eram levados para a sala de teste onde encontravam-se os equipamentos experimentais (figura 5) e em seguida eram colocados em um outro ambiente. Assim, os animais já testados ficavam em local separado daqueles ainda não testados, evitando-se uma eventual comunicação entre os mesmos através de vocalização ultrassônica. Estas vocalizações em frequências de 25 ou 50 kHz, são observadas em roedores adultos em várias situações, incluindo as aversivas.

4. PROCEDIMENTOS

Experimento 1 - Atividade locomotora

Neste experimento, ratos de ambos os sexos, de 2 e 4 meses de idade, foram injetados com 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 ou 1,6 g/kg de EtOH e colocados imediatamente dentro das caixas de movimentação. Os registros de medida de

atividade foram efetuados durante 60 minutos, em intervalos de 5 minutos, para se avaliar a faixa de doses a ser empregada no LCE.

Experimento 2 - Influência da idade e do sexo no efeito ansiolítico do EtOH

Ratos de ambos os sexos, com 2, 3, 4 e 5 meses de idade foram injetados com EtOH nas doses de 0,8; 1,0 e 1,2 g/kg em uma ante-sala (com iluminação de 720 lux). Dez minutos depois, cada animal, era levado à sala onde encontravam-se os equipamentos e colocados no campo aberto por 5 minutos, onde sua atividade locomotora era registrada. Considerávamos uma atividade locomotora toda vez que o animal colocava as quatro patas em um novo quadrado. Em seguida, era transferido diretamente para o centro do LCE, com a cabeça voltada para um dos braços fechados onde, por 5 minutos, se fazia o registro das medidas comportamentais (Pellow *et al.*, 1985), que consistia em verificar a frequência de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (FEA e TPA, respectivamente), e nos fechados (FEF e TPF, respectivamente). A dose que foi considerada ideal para os procedimentos experimentais posteriores foi a de 1,2 g/kg, com a qual o efeito ansiolítico foi mais evidente. As percentagens das frequências de entradas nos braços abertos (% FEA) e de tempo (%TPA) de permanência nesses braços foram calculadas de acordo com as fórmulas:

$$\% \text{ FEA} = \frac{\text{FEA}}{\text{FEA} + \text{FEF}} \times 100 \qquad \% \text{ TPA} = \frac{\text{TPA}}{\text{TPA} + \text{TPF}} \times 100$$

* O tempo de permanência na região de cruzamento dos braços não foi considerado.

Experimento 3 - Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pelo EtOH

Grupos de ratos, machos ou fêmeas, com 4 meses de idade, receberam uma injeção de DCS (doses de 3,0; 6,0 e 9,0 mg/kg para fêmeas e 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg/kg para machos), permanecendo na ante-sala, próxima ao local do LCE, durante 30 minutos. A seguir, cada grupo foi subdividido em dois outros grupos, que receberam injeção de EtOH (1,2 g/kg) ou salina, respectivamente. Após 10 minutos os animais foram, individualmente, submetidos à observação comportamental na arena por 5 minutos e então no LCE. Os demais procedimentos experimentais foram realizados como descrito no experimento 2.

Experimento 4 - Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pelo HA-966

Grupos de ratos, machos ou fêmeas, com 4 meses de idade, receberam uma injeção de DCS (doses que variaram de 3,0; 6,0 e 9,0 mg/kg para fêmeas e 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg/kg para machos) permanecendo na ante-sala, próxima ao local do LCE, durante 10 minutos. A seguir, cada grupo foi subdividido em dois outros grupos, que receberam HA-966 (2,0 mg/kg para fêmeas e 4,0 mg/kg para machos) ou salina, respectivamente. Após 30 minutos os animais foram submetidos à observação comportamental como descrita no experimento 2.

Experimento 5 - Efeito ansiolítico produzido pela KET

Grupos de animais, machos e fêmeas, com 4 meses de idade, foram tratados com KET e, após um período de 30 minutos, foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos nos experimentos 2. Através deste experimento foi possível realizar uma curva dose-resposta para a KET, com doses que variavam de 0,075 a 0,9 mg/kg para as fêmeas e 0,15 à 0,9 mg/kg, para os machos. As doses de KET selecionadas para dar continuidade aos demais procedimentos experimentais foram as de 0,075 mg/kg para as fêmeas e 0,3 mg/kg para os machos, doses estas que apresentaram melhor perfil de resposta ansiolítica.

Experimento 6 - Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pela KET

Grupos de ratos machos e fêmeas, de 4 meses de idade, foram pré-tratados respectivamente com 9,0 e 3,0 mg/kg de DCS, que foram as doses consideradas eficazes na reversão total do efeito ansiolítico produzido pelo EtOH. Após 10 minutos da administração da DCS, a KET (0,075 e 0,3 mg/kg, respectivamente para fêmeas e machos) foi administrada. Após 30 minutos os mesmos procedimentos experimentais de observação no LCE foram desenvolvidos, como descrito no experimento 2.

5. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS ALCOÓLICOS SANGÜÍNEOS

Grupos de ratos machos e fêmeas ($n = 5$), aos 2, 3, 4 e 5 meses de idade, foram tratados com EtOH (1,2 g/kg) e submetidos a avaliação no LCE. Outros grupos adicionais de animais de ambos os sexos, aos 2 e 4 meses, ou somente machos aos 4 meses de idade, foram pré-tratados com DCS (3,0 e/ou 6,0 e 9,0 mg/kg) e 30 minutos depois tratados com EtOH (1,2 g/kg), sendo submetidos também ao mesmo teste. A seguir amostras de sangue foram coletadas dos animais por punção direta da cauda, 20 minutos após a injeção do EtOH. As amostras de sangue foram centrifugadas em uma centrífuga Centrimicro mod. 212 (10.000 g), em uma rotação de 2.500 rpm, por 5 minutos. As concentrações de EtOH no soro sangüíneo foram avaliadas em um espectrofotômetro de fluxo, da Perkin-Elmer, mod. 35, através do método enzimático, baseado na conversão do EtOH a acetaldeído pela ação da desidrogenase alcoólica. Para isto, era utilizado 10 μ l de soro adicionado a 3 ml do reagente com a enzima desidrogenase alcoólica. Após um período de 10 minutos, a leitura era feita em um comprimento de onda de 340 nm (Poklis e Mackell, 1982, modificado).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) tendo como variáveis independentes: sexo, idade e tratamento, ou pré-tratamento e tratamento. As variáveis dependentes utilizadas foram: atividade locomotora na

arena, percentagem de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos e frequência de entradas nos braços fechados. A análise *post-hoc* foi realizada empregando-se os testes de Newman-Keuls, para comparações múltiplas, ou de Dunnett, para comparação com os grupos controles. Quando necessário o teste de Bonferroni foi empregado para comparação de duas amostras. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e a probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Experimento 1 - Atividade locomotora

Através deste experimento procuramos selecionar algumas doses que nos pudessem ser úteis na avaliação da atividade ansiolítica do EtOH no LCE. Os resultados obtidos com ratos de 2 e 4 meses de idade, no intervalo de 15 a 20 minutos após a injeção na caixa de motilidade, que corresponde ao tempo de permanência do animal no LCE estão ilustrados na figura 6. A análise estatística efetuada pela ANOVA de três vias, com os fatores sexo, idade e tratamento revelou um efeito significativo do sexo [$F_{(1,216)} = 10,83$; $p < 0.01$], idade [$F_{(1,216)} = 15,97$; $p < 0.001$] e tratamento [$F_{(5,216)} = 7,73$; $p < 0.0001$], porém não houve nenhuma interação significativa entre os fatores. A análise *post-hoc* para o fator tratamento revelou redução significativa da atividade locomotora somente com a dose de 1,6 g/kg para as fêmeas, em comparação com o grupo controle tratado com salina. A partir destes dados, as doses de EtOH, previamente selecionadas, foram as de 0,8; 1,0 e 1,2 g/kg para avaliação no LCE. Não houve diferenças significantes entre os sexos em animais de 2 meses. No entanto, aos 4 meses de idade nos grupos tratados com 0,4 e 0,8 g/kg de EtOH, a atividade locomotora das fêmeas foi significativamente maior que a dos machos.

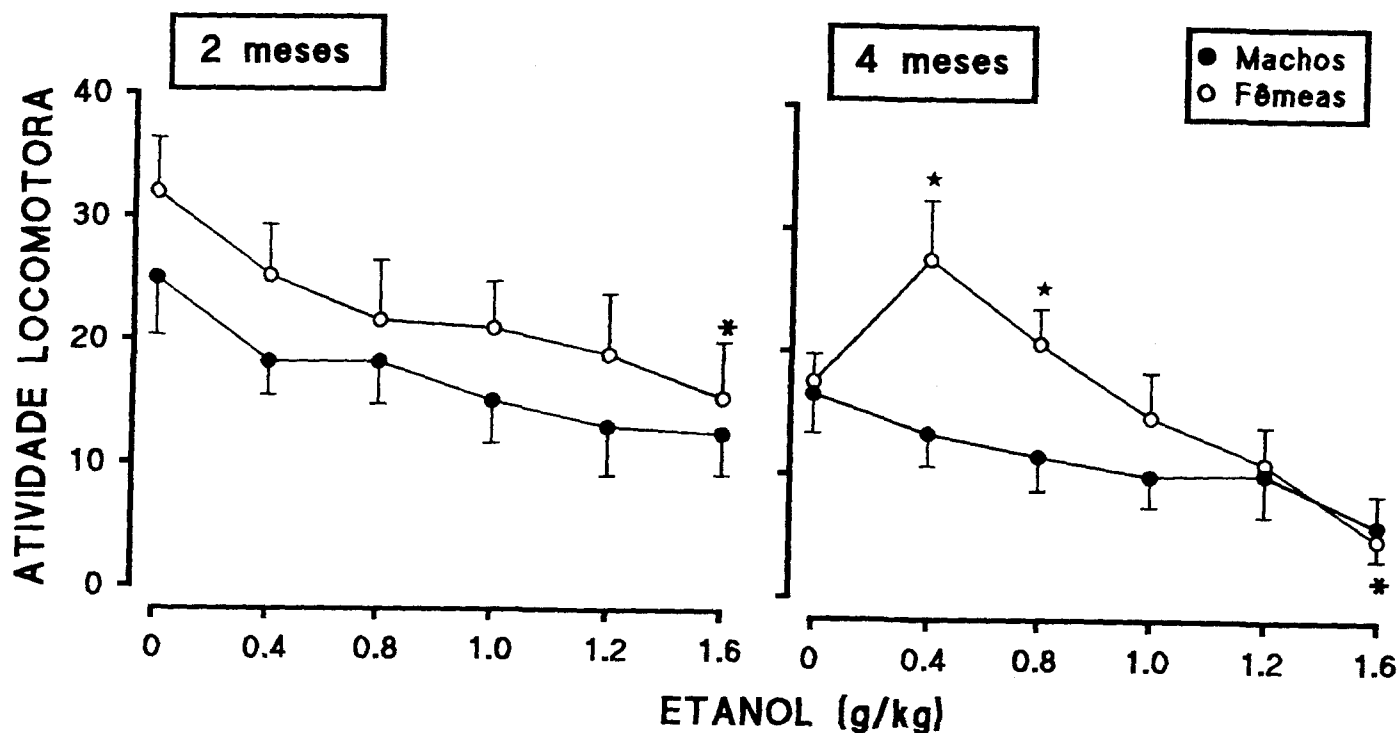


Figura 6 - Atividade locomotora de ratos machos (●) e fêmeas (○), com 2 e 4 meses de idade, administrados com diferentes doses de EtOH (0,4; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,6 g/kg) e testados na caixa de atividade locomotora. Cada valor representa a média \pm e.p.m. de 10 animais, que corresponde a motilidade no intervalo de 15-20 minutos. * $p < 0.05$ em comparação com o grupo tratado com salina (Teste de Dunnett). * $p < 0.01$ em comparação com os ratos machos (Teste t, correção de Bonferroni).

Experimento 2: Influência da idade e do sexo no efeito ansiolítico do EtOH

Este experimento foi realizado com o objetivo de se estudar o efeito ansiolítico de diferentes doses de EtOH em ratos de ambos os sexos, com 2, 3, 4 e 5 meses de idade que seriam testados no LCE. Como resultados verificamos, primeiramente, que para a atividade locomotora avaliada na arena que precede o LCE, a ANOVA de três vias revelou um efeito significativo do tratamento [$F_{(3,288)} = 7,10$; $p < 0.001$]; idade [$F_{(3,288)} = 3,80$; $p < 0.01$] e sexo [$F_{(1,288)} = 42,35$; $p < 0.00001$]. Entretanto, não houve interação significativa entre os fatores. Na tabela 1, nota-se que animais tratados com EtOH não mostraram nenhuma diferença estatística na ambulação, quando comparados com os tratados com salina. Ratos fêmeas tratados com salina apresentaram altos escores de ambulação quando comparados com ratos machos controles, em todas as idades. Em relação aos ratos tratados com EtOH, somente com algumas doses e com algumas idades é que houve diferença estatística, entre machos e fêmeas.

O tratamento com EtOH aumentou a % FEA e a % TPA no LCE, como demonstrado pela figura 7. Uma diferença geral foi revelada pela ANOVA para %FEA [tratamento: $F_{(3,288)} = 21,19$; $p < 0.00001$; idade $F_{(3,288)} = 10,03$; $p < 0.0001$; interação tratamento x idade: $F_{(9,288)} = 2,22$; $p < 0.05$]; a %TPA [tratamento: $F_{(3,288)} = 13,71$, $p < 0.00001$; idade: $F_{(3,288)} = 7,72$, $p < 0.001$]. Através da análise *post-hoc* foi possível verificar que o EtOH não produziu um aumento nas % de FEA e TPA em ratos de ambos os sexos, aos 2 meses de idade. Entretanto, um aumento

significante naqueles parâmetros foi detectado aos 4 e 5 meses de idade com doses de 0,8; 1,0 e 1,2 g/kg. Através da figura 7 também é possível observar que os ratos machos e fêmeas, com 4 e 5 meses de idade, tratados com salina, apresentaram redução nas % FEA e TEA, quando comparados com os de 2 meses de idade ($p < 0.01$, teste de Newman Keuls). Em relação a FEF a ANOVA não revelou diferenças estatisticamente significantes. O aumento das % de FEA e de TPA produzido pelo EtOH, associado à não alteração da FEF, sugere ação ansiolítica desta droga, independentemente de efeito sedativo. Além disso, esses dados sugerem uma ação diferencial dependente da idade.

Tabela 1 - Efeito do EtOH na atividade locomotora de ratos machos e fêmeas, de diferentes idades, testados na arena por 5 minutos, antes do LCE. Cada valor representa a média \pm e.p.m. de 10 animais. * $p < 0.05$ em comparação com ratos machos (Teste t, correção de Bonferroni).

Idade (meses)	EtOH (g/kg)	Arena	
		Machos	Fêmeas
2	Salina	47.4 \pm 3.3	69.2 \pm 7.0*
	0.8	52.8 \pm 6.3	57.2 \pm 5.3
	1.0	37.1 \pm 3.1	56.0 \pm 7.2*
	1.2	48.4 \pm 3.8	58.6 \pm 5.4
3	Salina	42.6 \pm 4.0	66.0 \pm 5.5*
	0.8	57.6 \pm 3.1	62.3 \pm 4.5
	1.0	34.7 \pm 6.6	50.1 \pm 5.8
	1.2	43.8 \pm 4.3	62.3 \pm 6.4*
4	Salina	48.1 \pm 4.4	66.8 \pm 5.7*
	0.8	41.4 \pm 4.3	56.7 \pm 7.1
	1.0	46.1 \pm 6.9	48.1 \pm 6.1
	1.2	39.9 \pm 4.8	45.5 \pm 7.0
5	Salina	45.1 \pm 5.3	62.1 \pm 6.2*
	0.8	42.9 \pm 5.4	46.6 \pm 6.2
	1.0	34.3 \pm 4.4	46.9 \pm 3.5*
	1.2	36.5 \pm 6.5	45.7 \pm 5.0

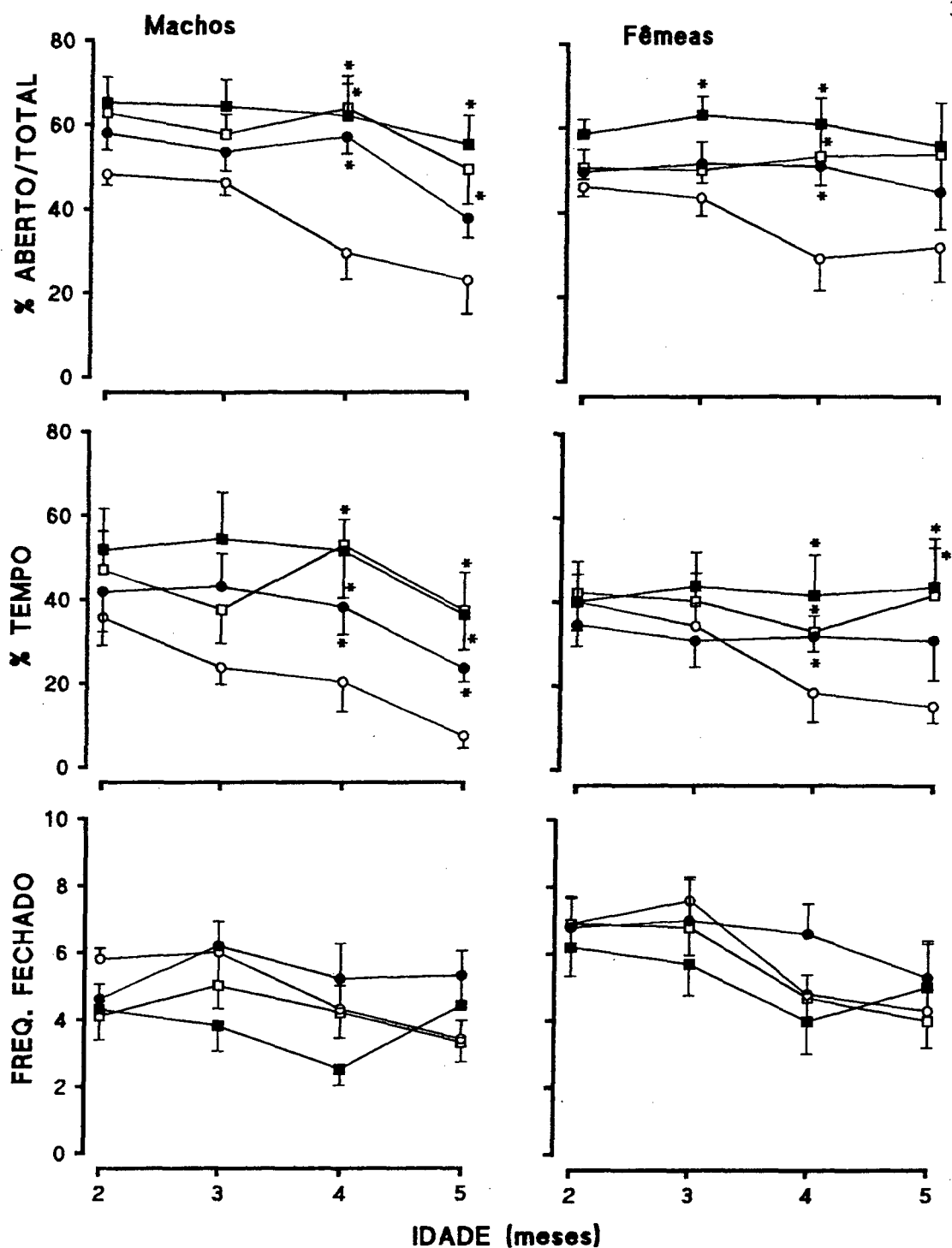


Figura 7 - Influência da idade sobre o comportamento exploratório de ratos Wistar machos (painéis esquerdos) e fêmeas (painéis direitos), aos 2, 3, 4 e 5 meses de idade, injetados com salina (○); 0,8 (●); 1,0 (□) ou 1,2 g/kg (■) de EtOH, i.p., quando testados no LCE por 5 minutos. Cada valor representa a média \pm e.p.m. de 10 animais obtida com a % FEA (painéis superiores), da % TPA (painéis centrais) e FEF (painéis inferiores). * $p < 0.05$ em comparação com o grupo salina (Teste de Dunnett).

Experimento 3: Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pelo EtOH

Para investigar a participação do receptor NMDA no efeito ansiolítico do EtOH, neste experimento utilizou-se a DCS, um agonista parcial do sítio da GLI e observou-se que a administração de diferentes doses de DCS produziu antagonismo do efeito ansiolítico do EtOH revelando uma curva em forma de “U”. Através da ANOVA de duas vias foi possível verificar que a administração de DCS, previamente ao EtOH, reduziu a % FEA [interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(3,72)} = 5,12$; $p < 0.01$] e % TPA [interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(3,72)} = 3,41$; $p < 0.01$], em fêmeas. Em machos, o efeito foi semelhante, havendo redução significativa da % FEA [interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(4,90)} = 5,52$; $p < 0.01$]; e da % TPA [$F_{(4,90)} = 7,35$; $p < 0.01$]. Nas doses de 3,0 mg/kg (para fêmeas) e 9,0 mg/kg (para machos) houve antagonismo total do efeito ansiolítico produzido pelo EtOH. Nas demais doses houve antagonismo parcial, sendo que 12,0 mg/kg, para os machos, a DCS produziu aumento da %FEA e de %TPA, possivelmente por efeito sedativo. Em fêmeas, a dose de 9,0 mg/kg de DCS não antagonizou os efeitos do EtOH e reduziu a FEF. O efeito antagonístico da DCS foi observado com doses dessa droga que não afetaram, por si só, nenhum daqueles parâmetros (Figura 8). Além disso, em outro estudo (dados não mostrados), a DCS não afetou o comportamento de ratos testados no LCE, aos 2 meses de idade.

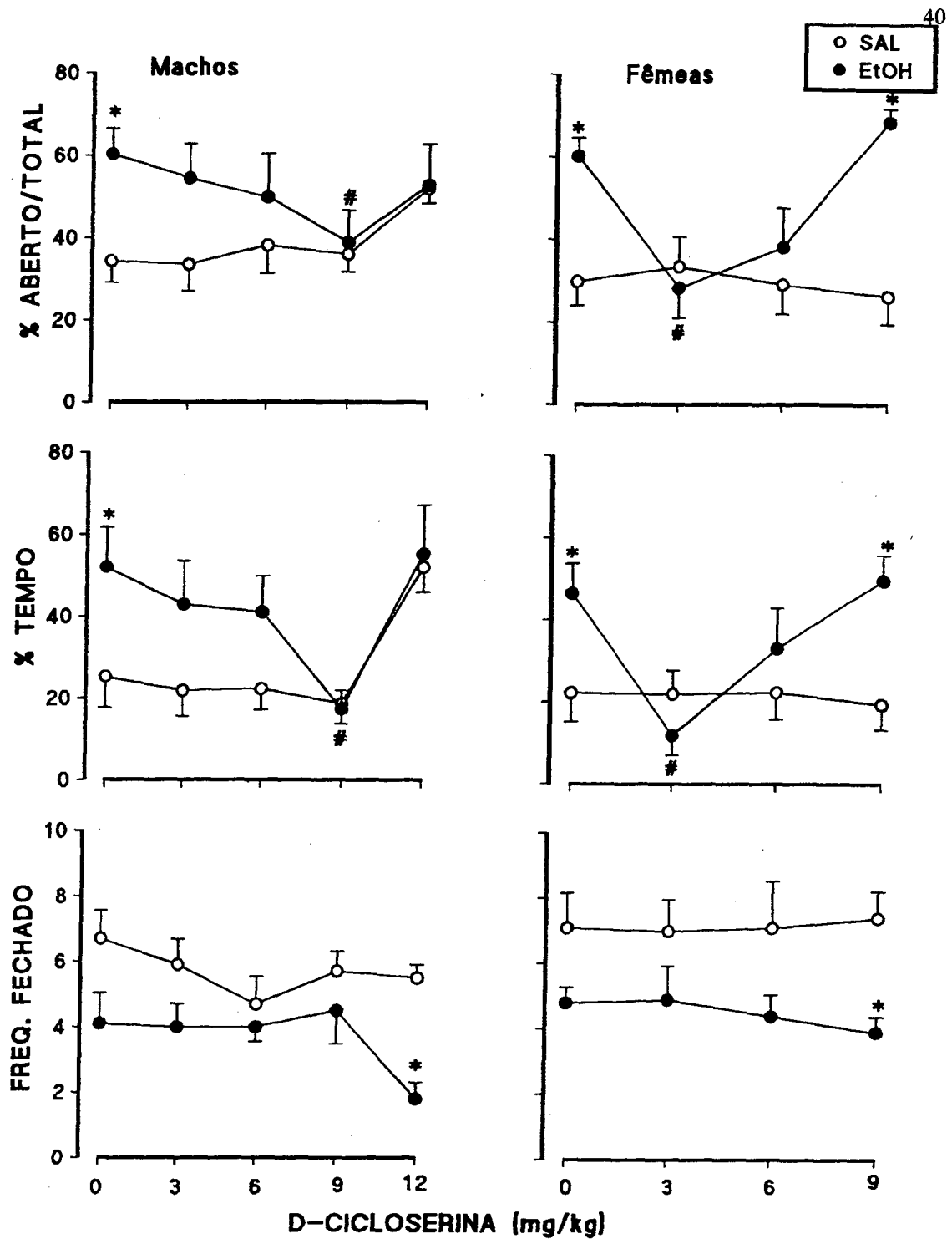


Figura 8 - Efeito do pré-tratamento com doses crescentes de DCS (3,0; 6,0; 9,0 e até 12,0 mg/kg para fêmeas (painéis direitos) e machos (painéis esquerdos), respectivamente) administradas 30 minutos antes do EtOH (1,2 g/kg, i.p.) sobre o comportamento de ratos com 4 meses de idade, testados no LCE por 5 minutos. Cada valor representa a média \pm e.p.m. de 10 animais. * $p < 0.05$ comparado com os grupos controles (Teste t, correção de Bonferroni). # $p < 0.05$ comparado com o grupo tratado com salina + EtOH (Teste de Newman Keuls).

A avaliação da concentração alcoólica sanguínea após a administração de 1,2 g/kg de EtOH em animais de ambos os sexos e diferentes idades não revelou diferenças significantes entre os grupos estudados (Tabela 2). Os dados foram analisados através da ANOVA de duas vias para os ratos machos e fêmeas de diferentes idades, tratados com EtOH, tendo os fatores sexo e idade como variáveis independentes. A ANOVA revelou um efeito significativo do fator sexo [$F_{(1,32)} = 8,07; p < 0.01$], mas não revelou efeitos significantes do fator idade ou da interação entre os fatores idade e sexo. Mais duas ANOVA foram feitas separadamente, uma para os resultados obtidos após tratamento com DCS3 + EtOH para ratos machos e fêmeas com 2 e 4 meses de idade e outra com os dados obtidos com ratos machos com 4 meses de idade, onde não se detectou nenhuma diferença estatística entre os grupos tratados com diferentes doses de DCS. Foi detectada diferença estatística na alcoolemia somente entre ratos machos e fêmeas tratados com 3,0 mg/kg de DCS + EtOH, aos 2 e 4 meses de idade (tabela 2).

Tabela 2 - Dosagem alcoólica feita com soro sanguíneo dos ratos, colhido 20 minutos após a injeção de EtOH (1,2 g/kg, i.p.), em ratos de diferentes idades (2, 3, 4 ou 5 meses) ou pré-tratados com DCS (3,0 e/ou 6,0 ou 9,0 mg/kg) ou salina, 30 minutos antes da administração do EtOH (1,2 g/kg). Cada valor representa a média \pm e.p.m. de 5 animais. * $p < 0.05$ em comparação com ratos machos sob mesmo tratamento (Teste t, correção de Bonferroni).

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO ALCOÓLICA SANGÜÍNEA (mg/dl)				
	SEXO	IDADE (meses)			
		2	3	4	5
Sal + EtOH	Machos	87 \pm 9	88 \pm 5	83 \pm 6	97 \pm 8
	Fêmeas	76 \pm 8	83 \pm 2	69 \pm 1	79 \pm 4
DC3 + EtOH	Machos	87 \pm 5	-	94 \pm 5	-
	Fêmeas	67 \pm 4*	-	72 \pm 3*	-
DC6 + EtOH	Machos	-	-	84 \pm 2	-
DC9 + EtOH	Machos	-	-	85 \pm 1	-

Experimento 4: Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pelo HA-966

Com o objetivo de se fazer um estudo comparativo do efeito ansiolítico do EtOH utilizou-se o HA-966, um antagonista seletivo do sítio da GLI no complexo receptor NMDA, para reforçar mais as implicações deste receptor naquela atividade ansiolítica. Como resultados observou-se que o tratamento com o HA-966 demonstrou um perfil ansiolítico similar ao apresentado pelo EtOH com um aumento da % FEA e %TPA, no LCE (Figura 9). A administração de DCS, 10 minutos antes do tratamento com HA-966, antagonizou o efeito ansiolítico desta droga produzindo uma diminuição na % FEA [interação pré-tratamento x tratamento: $[F_{(4,90)} = 5,42; p < 0.001]$ para machos e $[F_{(3,72)} = 5,14; p < 0.01]$ para fêmeas, e na % TPA $[F_{(4,90)} = 9,83; p < 0.0001]$ para machos e $[F_{(3,72)} = 6,30; p < 0.001]$ para fêmeas. Assim, os resultados revelaram também uma curva de antagonismo do efeito do HA-966 pela DCS em forma de “U”, sendo o antagonismo total obtido com a dose de 3,0 mg/kg de DCS para fêmeas e de 9,0 mg/kg para machos.

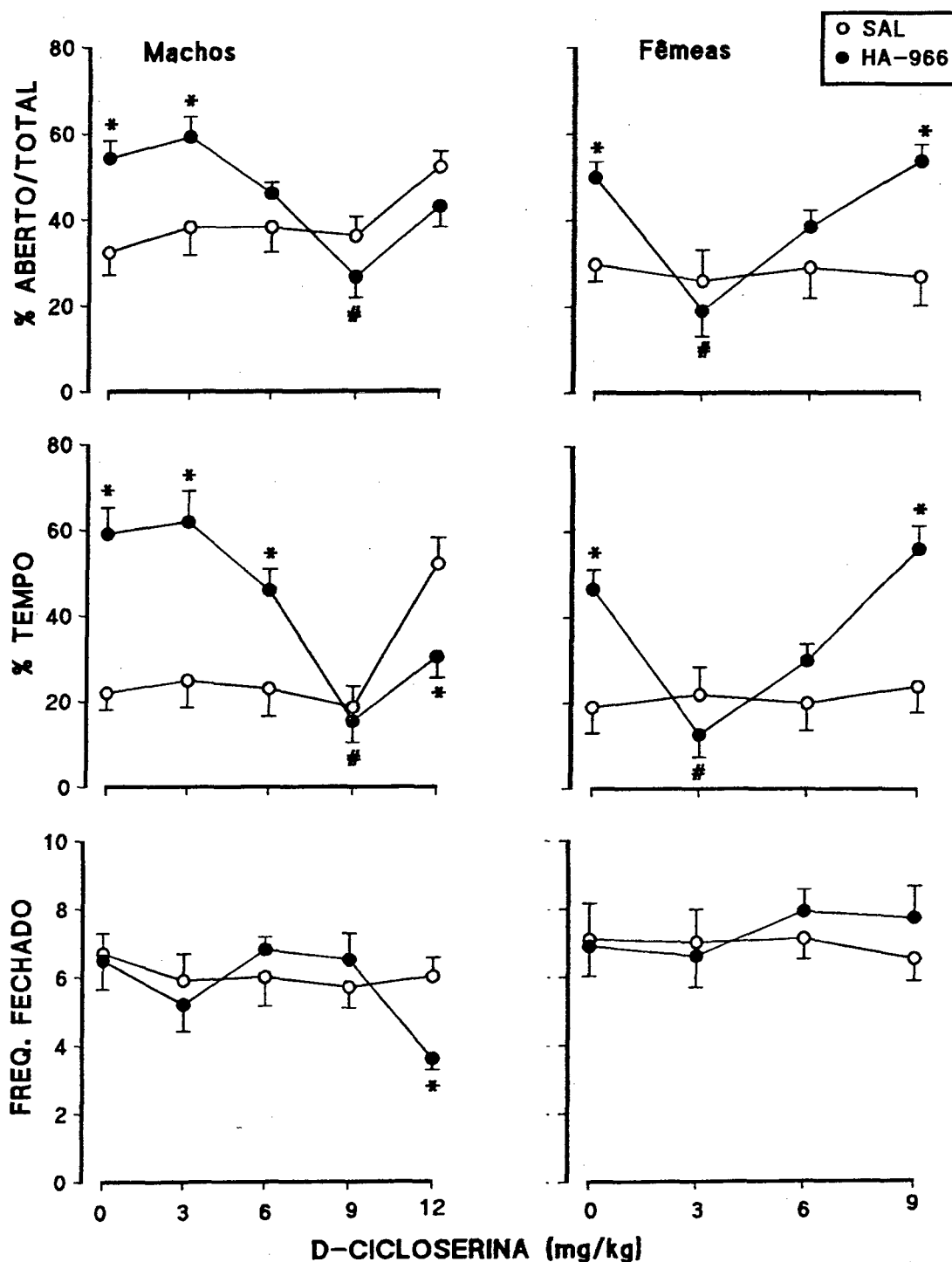


Figura 9 - Efeito do pré-tratamento com a DCS [3,0; 6,0; 9,0 e até 12,0 mg/kg para fêmeas (painéis direitos) e machos (painéis esquerdos), respectivamente] administrado 10 minutos antes do HA-966 (2,0 e 4,0 mg/kg, i.p., para fêmeas e machos, respectivamente) sobre o comportamento de ratos com 4 meses de idade, testados no LCE por 5 minutos. Cada valor representa a média \pm e.p.m. de 10 animais. * $p < 0.05$ comparado com os grupos controles (Teste t, correção de Bonferroni). # $p < 0.05$ comparado com o grupo salina + HA-966 (Teste de Newman Keuls).

Experimento 5: Efeito ansiolítico produzido pela KET

Para verificar se a ativação de outros sítios do complexo receptor não estaria interferindo na resposta ansiolítica do EtOH, realizou-se este experimento, onde o tratamento de ratos machos e fêmeas com doses crescentes de KET produziu um efeito ansiolítico dependente da dose (figura 10). A ANOVA revelou aumento significativo da %FEA {[$F_{(5,54)} = 4,03$; $p < 0.01$] para fêmeas, e [$F_{(4,45)} = 8,55$; $p < 0.01$] para machos} e da % TPA {[$F_{(5,54)} = 10,84$; $p < 0.01$] para fêmeas e [$F_{(4,45)} = 9,36$; $p < 0.01$] para machos}. A análise *post-hoc* revelou que as doses de 0,075 mg/kg para fêmeas e de 0,3 mg/kg para machos produziram efeitos ansiolíticos mais evidentes, e por isso foram empregadas nos experimentos subsequentes. Não foi verificada nenhuma alteração significativa na FEF, tanto nas fêmeas quanto nos machos, após tratamento com KET.

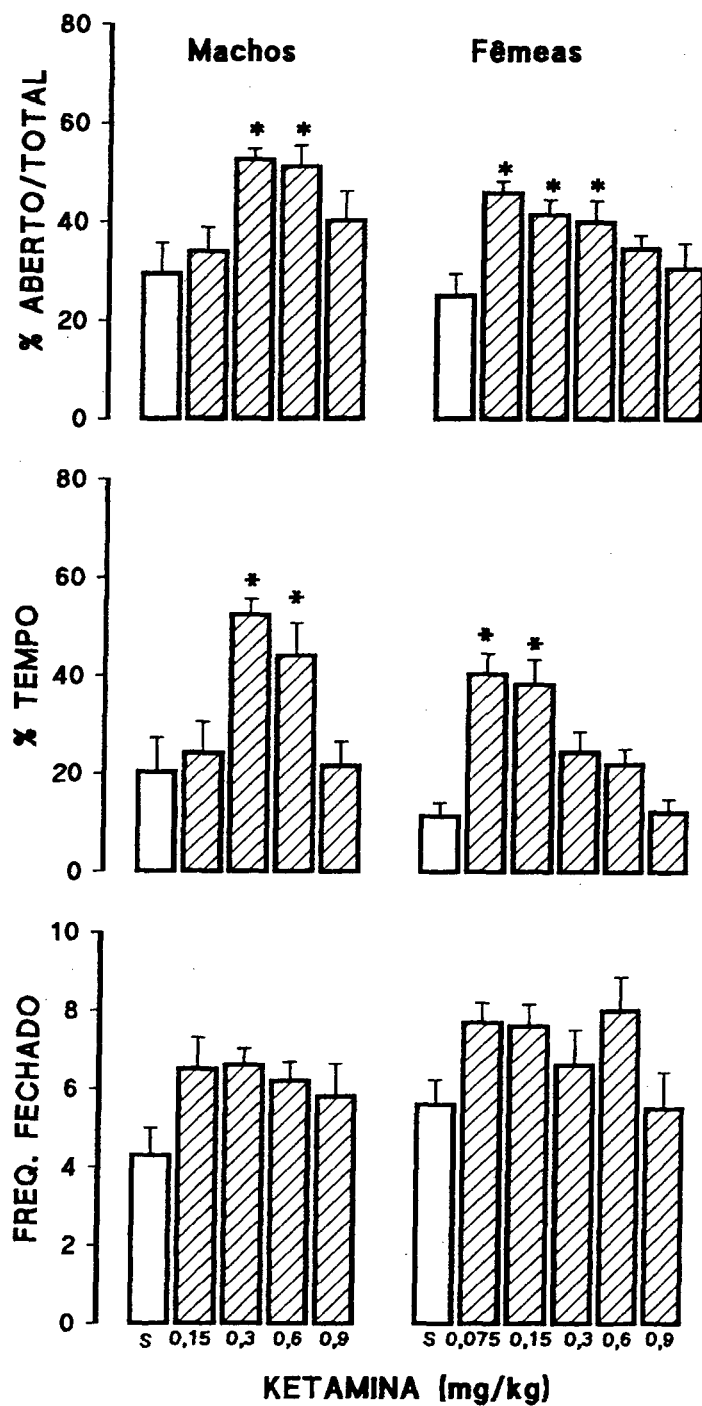


Figura 10 - Curva dose-resposta do efeito ansiolítico da KET [0,15; 0,3; 0,6 e 0,9 mg/kg, para machos (esquerda) e 0,075; 0,15; 0,3; 0,6 e 0,9 mg/kg, para fêmeas (direita)]. Cada valor representa a média \pm e.p.m. de 10 animais. * $p < 0.05$ comparado com os animais controles, tratados com salina (Teste de Dunnett).

Experimento 6: Efeito da DCS na resposta ansiolítica produzida pela KET

Na figura 11 são apresentados os resultados obtidos após tratamento com DCS previamente à KET, em animais submetidos ao LCE. A ANOVA de duas vias revelou que a DCS antagonizou o efeito ansiolítico produzido por KET nos ratos machos, observado pela redução da %FEA [interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)} = 6,99$; $p < 0.01$] e % TPA [interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)} = 4,53$; $p < 0.05$]. Entretanto, nenhum grau de antagonismo foi observado em fêmeas. Não houve nenhuma alteração na FEF.

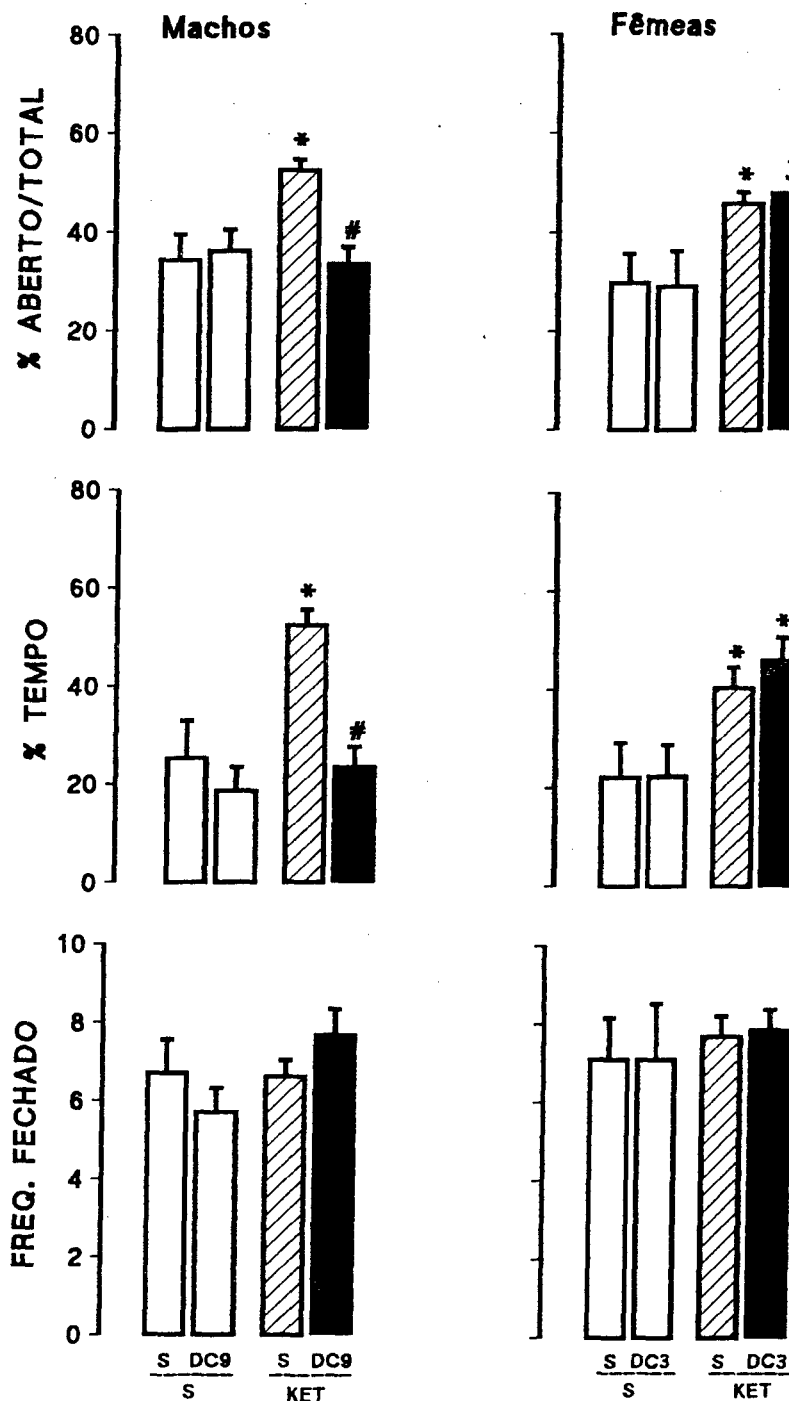


Figura 11 - Efeito do pré-tratamento com a DCS [3,0 mg/kg para fêmeas (painéis direitos) e 9,0 mg/kg para machos (painéis esquerdos)] administrada 10 minutos antes da KET (0,075 e 0,3 mg/kg, i.p., respectivamente, para fêmeas e machos) sobre o comportamento de ratos com 4 meses de idade, testados no LCE por 5 minutos. Cada valor representa a média \pm e.p.m. de 10 animais. * $p < 0.05$ comparado com os grupos controles, tratados com salina + salina (S/S), DC3 + salina (DC3/S) ou DC9 + salina (DC9/S). # $p < 0.05$ comparado com o grupo salina + KET (S/KET) (Teste de Newman Keuls).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que o EtOH aumentou a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos no teste do LCE, confirmando o efeito ansiolítico desta droga (Dudek *et al.*, 1986; Coop *et al.*, 1990; Lal *et al.*, 1991; Blanchard *et al.*, 1993; Criswell *et al.*, 1994; File, 1994). Mostraram, ainda, um claro efeito dependente da idade, já que não foi detectado em animais de ambos os sexos testados aos 2 meses de idade, mas sim em ratos mais velhos. As alterações na % FEA e na %TPA, juntamente com a ausência de efeito na FEF, sugerem que o efeito ansiolítico do EtOH tenha sido específico, e não dependente de um efeito sedativo, por exemplo.

Em recente estudo realizado em nosso laboratório foi observado que ratos machos e fêmeas apresentam um aumento de comportamentos ligados à ansiedade no LCE em função da idade, sugerindo que aos 2 meses de idade os animais são menos ansiosos que ratos com 4 e 5 meses, independentemente do sexo (Imhof *et al.*, 1993). Os resultados sobre a influência da idade obtidos com animais tratados com salina, no presente estudo, confirmam aqueles resultados.

É bem conhecido que, em ratos, o desenvolvimento total dos mecanismos de síntese, metabolismo e recaptção dos neurotransmissores GABA, DA, NA, GLI e GLU, bem como os receptores para estes neurotransmissores estão somente completos, aproximadamente, aos 2 meses de idade (Coyle e Enna, 1976; Rothe *et al.*, 1988; Shinohara *et al.*, 1989; Insel *et al.*, 1990; McDonald *et*

al., 1990; Bentivoglio *et al.*, 1991; Christensen e Fonnum, 1991, 1992; Daval *et al.*, 1991). Estudos ontogenéticos comportamentais têm mostrado que abaixo de 2 meses de idade muitos padrões adultos de comportamento defensivo não estão completamente estabelecidos (Masur *et al.*, 1980; Hard *et al.*, 1982). Os ajustes de muitos sistemas fisiológicos relevantes, incluindo as manifestações de comportamentos defensivos, usualmente ocorrem na puberdade (Farris, 1949), quando eles são substituídos pelos níveis encontrados nos adultos. Existem evidências de que em certas fases do desenvolvimento, embora os elementos sinápticos estejam completos, os mecanismos de transdução não estão plenamente formados (Insel, 1995). Em nosso estudo, as diferenças comportamentais observadas entre ratos de 2 meses e de 4 meses, quando observados no LCE, parecem ser funcionais, já que na idade de 2 meses os níveis de neurotransmissores e receptores cerebrais estão semelhantes aos dos adultos. Assim, no presente estudo, o efeito ansiolítico do EtOH, avaliado pelas mudanças nas % FEA e %TPA no LCE, não foi observado em ratos de 2 meses, possivelmente devido a alterações nos padrões de comportamento defensivo presentes nessa idade.

A ausência de um efeito ansiolítico do EtOH em ratos de 2 meses não foi conseqüente a uma dose insuficiente dessa droga, visto que o aumento da dose para 1,6 g/kg também não produziu um efeito ansiolítico (dados não

apresentados). Na realidade, esta dose diminuiu a % FEA e % TPA provavelmente devido a um efeito sedativo.

É bem conhecido que a toxicidade de uma droga aumenta em animais mais velhos, refletindo um aumento da sensibilidade tecidual (Nabeshima *et al.*, 1984). Os níveis de algumas drogas no soro e cérebro podem atingir altos valores e persistir por longo período em ratos mais velhos do que em ratos mais novos (Kato *et al.*, 1961). No entanto, o efeito diferencial do EtOH em ratos testados no LCE em diferentes idades não parece refletir variações no metabolismo do EtOH, visto que os níveis do EtOH no sangue foram similares entre os vários grupos. Os dados do presente estudo, mostrando uma dependência da idade na avaliação de drogas ansiolíticas em ratos submetidos ao LCE, estão de acordo com estudos prévios de nosso laboratório onde o diazepam produziu nítido efeito ansiolítico em ratos de 4 meses de idade, porém não alterou o comportamento de animais de 2 meses (Lopes-da-Silva *et al.*, 1996). Assim, nossos experimentos sobre os mecanismos de ação dos efeitos ansiolíticos induzidos pelo EtOH foram feitos em ratos de 4 meses de idade.

Em roedores, diferenças sexuais observadas em comportamentos ligados à emocionalidade, têm sido descritas em diferentes condições experimentais (Archer, 1975; Masur *et al.*, 1980; Pellow *et al.*, 1985; Einon e Potegal, 1991; Steenbergen *et al.*, 1990; 1991; Rodgers e Cole, 1993; Zimmerberg e Farley, 1993). Em alguns modelos, ratos fêmeas têm exibido menor comportamento

associado ao medo do que machos (Beatty e Fessler, 1976; Masur *et al.*, 1980; Johnston e File, 1991; Steenbergen *et al.*, 1991; Imhof *et al.*, 1993).

Examinando-se as diferenças sexuais em três modelos animais de ansiedade: interação social, LCE e teste de conflito de Vogel, observaram-se diferenças entre machos e fêmeas (Johnston e File, 1991). As fêmeas apresentaram-se menos “ansiosas” no LCE e mais “ansiosas” no teste de Vogel, com resultados contraditórios no teste de interação social. Estas evidências indicam, claramente, que a validação de modelos animais, particularmente de ansiedade, pode ser afetada pelo sexo dos animais considerados. Em estudo anterior de nosso laboratório, ratos fêmeas também mostraram-se menos ansiosas do que machos no LCE, quando testados aos 3 meses de idade, mas não em idades inferiores ou superiores, sugerindo que as diferenças sexuais são dependentes da idade (Imhof *et al.*, 1993). Por outro lado, outros investigadores têm relatado diferenças sexuais nas respostas farmacológicas de algumas drogas, tais como o pentobarbital, hexobarbital, carisoprodol, morfina e estriçnina que se mostraram mais intensas em ratos adultos fêmeas que em machos. Diferenças como estas, e muitas outras, podem ser atribuídas a maior capacidade dos ratos machos em metabolizar as drogas, já que os microsossomos hepáticos dos machos são mais ativos que os das fêmeas na metabolização de várias drogas (Testa e Jenner, 1976).

A atividade da desidrogenase alcoólica gástrica (ADH), primeiro passo do metabolismo do álcool, tem sido proposta como método para estimar o metabolismo do álcool pelas mulheres (Frezza *et al.*, 1990). Diferenças relacionadas ao sexo na concentração alcoólica sanguínea têm sido relatadas em humanos, com mulheres tendo maior valor que homens após uma dose oral equivalente (Jones e Jons, 1976). Diferenças no volume de distribuição também foram usadas como uma possível explicação para as diferenças relacionadas ao sexo. Contudo, tais explicações não são apropriadas quando as diferenças relacionadas ao sexo são obtidas após a administração intravenosa de álcool (Arthur *et al.*, 1984).

Já em roedores, estudos recentes mostraram que o metabolismo gástrico do EtOH é insignificante em ratos, e as diferenças sexuais nos níveis sanguíneos dessa droga podem ser devidas às diferenças na absorção do álcool (Smith *et al.*, 1992; Levitt, 1993). Relatos adicionais têm indicado que as diferenças sexuais observadas nos níveis sanguíneos alcoólicos e comportamentos de roedores são similares após administração de álcool por injeção intraperitoneal ou oral. No entanto, foi demonstrado que fêmeas são menos afetadas que os machos quanto aos efeitos estimulatório e depressivo do álcool, desconsiderando-se a via de administração, excluindo-se assim, as diferenças no metabolismo pela ADH gástrica como uma explicação para as diferenças sexuais na sensibilidade para o álcool em roedores (Middaugh *et al.*, 1992) e implicando diferenças sexuais no

cérebro (Lancaster, 1994). Assim, as diferenças sexuais nas respostas para o álcool podem ser influenciadas pelas muitas variações básicas na organização e modulação dos cérebros de animais de ambos os sexos (Allan, 1991; McGivern e Barron, 1991; Harford *et al.*, 1992; Jarvis, 1992).

Ao contrário dos resultados de vários estudos que relatam diferenças sexuais nos efeitos do EtOH e em comportamentos relacionados à emocionalidade (Wilson e Abrams, 1977; Masur *et al.*, 1980; Steenbergen *et al.*, 1990; Zimmerberg e Farley, 1993; Adams, 1995), no presente estudo a magnitude das respostas comportamentais exibidas por ratos de ambos os sexos tratados com EtOH no LCE, foram similares. Uma vez que os níveis alcoólicos sanguíneos foram semelhantes entre ratos machos e fêmeas, é possível que nossas condições experimentais não tenham sido sensíveis para detectar diferenças sutis ao nível do SNC entre os sexos. No entanto, como já mencionado, dados anteriores obtidos em nosso laboratório mostraram diferenças sexuais no comportamento de ratos avaliados no LCE somente aos 3 meses de idade, mas não aos 2 ou aos 4 meses (Imhof *et al.*, 1993). Desta forma, o fator idade parece ser fundamental para a detecção de diferenças sexuais neste modelo. A ação ansiolítica de um número de drogas parece ser diferente não somente entre os sexos, mas também entre fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral (Fernandez-Guasti e Picazo, 1990). Como não realizamos análise de esfregaços vaginais para determinar a fase do ciclo estral das fêmeas em nosso estudo, não podemos

descartar alguma interferência hormonal envolvendo a ação do EtOH, que pudesse interferir nos resultados obtidos.

Um outro aspecto abordado neste estudo foi a participação do sistema NMDA no efeito ansiolítico do EtOH em ratos avaliados no LCE e como já mencionado no item “Introdução” deste trabalho, há evidências de que os AAE, particularmente o NMDA, podem exercer um importante papel na etiologia e/ou expressão de muitas desordens do SNC como a ansiedade (Carobrez, 1987). Embora o EtOH possa interferir com vários sistemas de neurotransmissores, estudos recentes têm mostrado que os sistemas de receptores GABA_A e o GLU, são bastante sensíveis à modulação por esta droga (Nevo e Hamon, 1995; Tsai *et al.*, 1995). O EtOH atua como um antagonista do NMDA (Carboni *et al.*, 1993) bloqueando esses receptores no hipotálamo e em outras regiões do cérebro, tais como: o hipocampo (Lovinger *et al.*, 1989), córtex cerebral (Leslie *et al.*, 1990), septo medial (Simson *et al.*, 1991) e células íntegras de neurônios sensoriais (White *et al.*, 1990), e, assim, inibe o influxo de Ca⁺⁺ estimulado pelo NMDA e a resultante produção de GMPc (Hoffman *et al.*, 1989). Além disso, a habilidade do EtOH em inibir a atividade neuronal evocada pelo NMDA varia com a região do cérebro, pois ele inibe potencialmente de maneira dependente de corrente esta atividade no colículo inferior e hipocampo, mas não no septo lateral (Simson *et al.*, 1993). Há evidências, também, de que esta ação do EtOH esteja relacionada com o bloqueio do influxo de Ca⁺⁺ após a interação com o sítio de ligação da GLI

no complexo receptor NMDA e, possivelmente, com o sítio da FEN neste mesmo receptor (Rabe e Tabakoff, 1990; Dildy-Mayfield e Leslie, 1991).

Uma das drogas que apresenta propriedades agonísticas parciais no sítio de ligação da GLI insensível à estriçnina, no complexo receptor NMDA é a DCS (Emmett *et al.*, 1991; Hood *et al.*, 1989). É um agente antimicobacteriano (Monahan *et al.*, 1989) com boa disponibilidade (Hood *et al.*, 1989; Henderson *et al.*, 1990; Watson *et al.*, 1990), que atravessa livremente a barreira hematoencefálica (Mandell e Sarft, 1985). Desta forma, a DCS pode potenciar a transmissão mediada pelo NMDA no cérebro (Thomson, 1989), sem aumentar a excitotoxicidade (Schuster e Schmidt, 1992) e também afetar o desenvolvimento da tolerância ao prejuízo motor induzido pelo EtOH em ratos (Khanna *et al.*, 1993a; 1995), ou melhorar a aprendizagem e memória (Flood *et al.*, 1992).

Nossos dados também indicam uma interação relevante entre drogas que atuam no sítio modulatório da GLI. Um aspecto interessante dessa interação é que moduladores positivos podem potenciar a resposta excitatória do NMDA, mas sozinhos não resultam em excitação, reduzindo a possibilidade de respostas excitatórias, como visto com agonistas diretos do NMDA (Monahan *et al.*, 1989). As concentrações endógenas de GLI presentes no cérebro, relativamente em altos níveis, podem interferir com a ativação dos receptores, pois, uma vez saturados, não podem ser afetados por nenhuma droga adicional (Johnson e Archer, 1987; Foster e Kemp, 1989). Um dos principais achados de nosso estudo foi que a

DCS, bloqueou o aumento da % FEA e da %TPA induzido pelo EtOH em ratos de ambos os sexos, aos 4 meses de idade. Este efeito foi obtido com doses de DCS que não afetaram o desempenho de animais controles tratados com salina. Além disso, o fato da DCS não modificar a FEF em ratos tratados com EtOH ou salina no LCE, ou seus escores de ambulação na arena, sugere bloquear especificamente o efeito ansiolítico do EtOH.

Também foi verificado em nosso estudo que a DCS não modificou as concentrações sanguíneas de EtOH, determinadas após o término das sessões de teste no LCE, sugerindo que a influência modulatória da DCS está mais ligada a uma ação farmacodinâmica central. Entretanto, como os níveis sanguíneos de EtOH não foram medidos em outros tempos após sua administração, não podemos excluir, completamente, possíveis diferenças relacionadas à idade ou pré-tratamento na farmacocinética do EtOH.

Um outro dado que reforça a possibilidade de que o efeito ansiolítico do EtOH ocorre através do bloqueio do sítio da GLI, foi o resultado obtido com o HA-966. Este antagonista específico do sítio da GLI (Hood *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 1990) produziu ação ansiolítica significativa, confirmando dados da literatura (Corbett e Dunn, 1991; Matheus *et al.*, 1994). O efeito ansiolítico do HA-966 foi antagonizado pela DCS da mesma forma que o efeito ansiolítico do EtOH. Assim, em ambos os experimentos, a curva dose-resposta obtida com a DCS em animais tratados posteriormente com EtOH tinha forma de “U”, onde doses

baixas ou elevadas produziram pouco efeito, enquanto uma dose intermediária bloqueou completamente o efeito ansiolítico produzido tanto pelo EtOH como por HA-966. Outro aspecto interessante deste estudo foi que as doses de DCS que produziram bloqueio total do efeito ansiolítico do EtOH e do HA-966 foram diferentes entre machos e fêmeas, sugerindo que as fêmeas são mais sensíveis a esse efeito. Esses dados estão de acordo com os dados da literatura (Löscher e Hönack, 1992; Hönack e Löscher, 1993), demonstrando diferenças sexuais entre ratos machos e fêmeas utilizando-se o MK-801, com as fêmeas sendo muito mais sensíveis que os machos.

Corbett e Dunn (1991) verificaram atividade ansiolítica na forma racêmica do HA-966 em um modelo de conflito, o teste de interação social e o LCE. Posteriormente, foi verificado que os efeitos ansiolíticos da forma racêmica eram exclusivamente do enantiômero R-(+), enquanto que o enantiômero S(-) era responsável pelos efeitos sedativos (Dunn *et al.*, 1992). Embora a forma racêmica do HA-966 tenha sido utilizada no presente trabalho, não observamos redução do número de entradas nos braços fechados, sugerindo-se que os efeitos ansiolíticos observados não foram atribuídos a um efeito depressor geral induzido pela droga.

É interessante observar que doses maiores de DCS não antagonizaram o efeito ansiolítico do EtOH ou do HA-966, e além disso, por si só apresentaram ação ansiolítica. É possível que em doses mais elevadas a DCS comece a

apresentar uma alteração no seu perfil de ação passando a apresentar um efeito ansiolítico. A semelhança da ação antagonística do efeito ansiolítico do EtOH e do HA-966 pela DCS sugere que essas ações ocorram ao nível do sítio da GLI no complexo receptor NMDA. Além disso, implica fortemente a participação desse receptor na ação ansiolítica do EtOH. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Anthony e Nevins (1993) os quais demonstraram que a DCS em altas doses pode apresentar atividade ansiolítica, um efeito consistente com atividade antagonística. Esses dados são consistentes com aqueles obtidos por Emmett *et al.* (1991), que mostraram que a DCS podia exercer seus efeitos, seja agonistas ou antagonistas “in vivo”, em função da dose.

A KET, um análogo estrutural da FEN, é um anestésico dissociativo, que possui meia-vida reduzida no cérebro (White *et al.*, 1976; De Sarro e De Sarro, 1993) e apresenta propriedades analgésicas em animais e humanos (White *et al.*, 1982) e foi demonstrado que pode bloquear as respostas de NMDA (Church *et al.*, 1988). Embora Bennett e Amrick (1987) não tenham detectado efeito ansiolítico da KET em ratos, em nossos estudos esse efeito foi claro em ratos de ambos os sexos. As diferenças entre estes estudos podem ser atribuídas às diferentes doses e metodologias empregadas. Esse efeito foi antagonizado pela DCS apenas em ratos machos. Em fêmeas, a DCS não antagonizou o efeito ansiolítico da KET, mesmo quando a dose foi elevada para 6 mg/kg (dados não apresentados). Nossos dados discordam daqueles de Criswell *et al.*, 1994, que

demonstraram ser o efeito ansiolítico do EtOH muito semelhante ao do clordiazepóxido, sem, no entanto, se assemelhar aos efeitos da MK-801, droga que atua no mesmo sítio da KET no complexo receptor NMDA. Aqueles autores, por isso, descartaram uma ação dependente do bloqueio do receptor NMDA responsável pelo efeito ansiolítico no LCE, e sugeriram uma ação GABAérgica.

Tomados em conjunto, os dados do presente estudo, mostrando uma semelhança entre os efeitos do EtOH e HA-966, bem como a interação da DCS com EtOH e com o HA-966, sugerem fortemente que o efeito ansiolítico do EtOH é dependente de um antagonismo competitivo com a GLI ao nível deste sítio no receptor NMDA. No entanto, considerando os resultados em que o efeito ansiolítico da KET foi antagonizado pela DCS, não pode ser descartado também um antagonismo decorrente de uma ação em outros sítios do complexo receptor NMDA, como sugerido em estudos realizados “in vitro” (Daniell, 1992).

Em suma, os dados do presente estudo implicam a participação do receptor NMDA no efeito ansiolítico do EtOH, possivelmente por uma ação no sítio da GLI e confirmam resultados mostrando a dependência da idade e do sexo na avaliação do comportamento de ratos testados no LCE.

CONCLUSÕES

- 1- Os resultados confirmam trabalhos anteriores, mostrando um menor índice de ansiedade em animais mais jovens, observados no LCE.
- 2- A movimentação espontânea de ratos avaliados em caixa de motilidade não foi afetada com as doses de EtOH empregadas.
- 3- O efeito ansiolítico do EtOH no LCE foi mais evidente em ratos de 4 e 5 meses de idade, sugerindo-se, portanto, ser dependente da idade.
- 4- O efeito ansiolítico do EtOH em ratos de 4 meses de idade foi antagonizado pela DCS, sugerindo-se a participação do complexo receptor NMDA neste efeito.
- 5- O efeito ansiolítico do HA-966 em ratos de 4 meses de idade foi antagonizado pela DCS, de modo semelhante ao efeito ansiolítico do EtOH com a DCS.
- 6- A KET, um antagonista do receptor NMDA, produziu efeito ansiolítico que não foi antagonizado pela DCS em ratos fêmeas, porém foi antagonizado em ratos machos.

7- Apesar de nossos dados sugerirem que o efeito ansiolítico do EtOH é dependente de uma ação ao nível da GLI no complexo receptor NMDA, uma interação em outros sítios, como o da fenciclidina, não pode ser descartada para explicar este efeito.

RESUMO

O complexo receptor NMDA parece estar envolvido em diversas patologias no sistema nervoso central, incluindo a ansiedade. Vários trabalhos têm mostrado a interação do etanol (EtOH) com esse receptor. Por outro lado, em nosso laboratório foram demonstradas influências comportamentais relacionadas ao sexo e idade em ratos testados no labirinto em cruz elevado (LCE). O presente estudo foi desenvolvido para investigar: 1) os efeitos do EtOH (nas doses de 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,6 g/kg) sobre a atividade locomotora de ratos machos e fêmeas com 2 e 4 meses de idade; 2) os efeitos do EtOH (nas doses de 0,8; 1,0 e 1,2 g/kg) sobre o comportamento de ratos de ambos os sexos com 2, 3, 4 e 5 meses de idade, testados no LCE; 3) uma comparação entre os efeitos do EtOH (1,2 g/kg) e do HA-966, antagonista do sítio da glicina (2,0 e 4,0 mg/kg, para fêmeas e machos, respectivamente), e da ketamina, (0,075 e 0,30 mg/kg, para fêmeas e machos, respectivamente), antagonista do sítio da fenciclidina no receptor NMDA, associados ou não com um agonista do sítio da glicina nesse receptor, a D-cicloserina (DCS), no LCE. Todas as administrações foram feitas por via i.p. O teste consistia em avaliar os seguintes parâmetros: a percentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, assim como o número de entradas nos braços fechados. Os resultados demonstraram que o EtOH não afetou a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos nos ratos testados aos 2 meses de idade, mas aumentou aqueles parâmetros em animais com idade mais avançada, sugerindo que o

efeito do EtOH depende da idade em que o animal é testado. Por outro lado, os resultados mostraram também que a DCS, em doses que por si só não afetaram o comportamento dos animais controles, impediu o aumento daqueles parâmetros em animais experimentais testados aos 4 meses de idade. Nos ratos machos o efeito ansiolítico, tanto do EtOH quanto do HA-966, foram antagonizados pela dose de 9,0 mg/kg de DCS enquanto que em fêmeas, esse antagonismo pôde ser observado com apenas 3,0 mg/kg. Em altas doses, tanto em machos quanto em fêmeas, curiosamente observou-se efeito ansiolítico similar àquele apresentado pelo HA-966 e pelo EtOH. A DCS não interferiu com o efeito ansiolítico produzido pela ketamina em fêmeas, mas nos machos houve interferência com a dose de 9,0 mg/kg. Nossos resultados sugerem que o antagonismo dos efeitos ansiolíticos do EtOH e do HA-966 apresentado pela DCS, foi mais efetivo em fêmeas do que em machos. A semelhança dos perfis ansiolíticos observados para o EtOH e o HA-966, reforça as evidências para um efeito antagonístico do EtOH no sítio da glicina.

ABSTRACT

Among the several central neurotransmitter systems involved in the actions of ethanol, the NMDA-receptor system is particularly sensitive to blockade by ethanol. This receptor system is also involved importantly in the modulation of anxiety-related behaviors in rats. Recently we observed gender- and age-related behavioral influences in the behavior of rats tested on the elevated plus-maze apparatus. Considering these aspects, the present study was undertaken to investigate if the effects of ethanol (0.8, 1.0 or 1.2 g/kg; i.p.) on behavior of male and female rats tested, at different ages (2, 3, 4 or 5 months of age), in the elevated plus-maze are gender- and age-related, and if they could be influenced by pretreatment with D-cycloserine, an agonist at the glycine site of the NMDA-receptor complex. To help elucidate the actions of D-cycloserine, its influence on alterations in plus-maze performance induced by (\pm) HA-966, an antagonist at the glycine site of the NMDA receptor complex, and by ketamine, an antagonist at the phenciclidine site of the NMDA receptor complex, was also assessed. Ethanol did not affect the time spent (% TSO) or the frequency of entries (% OAE) on the open arms of the elevated plus-maze in either male or female rats with 2 months of age, but increased both parameters in older animals. This suggests that the anxiolytic effect of ethanol is more evident at 4 and 5 months of age. These effects were not dependent of an alteration in ethanol pharmacokinetics, since the blood ethanol concentrations were similar among

different age or gender groups. D-cycloserine, at doses that did not affect the behavior of control animals (3-9 mg/kg for females; and 3-12 mg/kg for males; given i.p. 30 min before ethanol), antagonized the increase in the % OAE and %TSO induced by ethanol in rats tested at 4 months of age, showing a U shaped dose-response curve. Similarly, D-cycloserine (injected 10 min before) also antagonized the anxiolytic effects of (\pm) HA-966 (2 or 4 mg/kg, i.p.), in 4-month old animals of both sexes. On the other hand, the anxiolytic effect produced by ketamine (0.075 mg/kg in females; 0.3 mg/kg in males), in 4-month old animals, was antagonized by D-cycloserine only in male rats. Our results demonstrate an age-related influence on the anxiolytic-like action of ethanol in rats tested in the elevated plus-maze, whereby older animals are more sensitive than younger ones to this effect. Moreover, the results suggest that the NMDA-receptor system contributes importantly to this anxiolytic-like effect of ethanol. Furthermore, the similar inhibitory influence of D-cycloserine on anxiolysis induced by ethanol and (\pm)HA-966 strongly suggests that ethanol acts upon the glycine site of the NMDA receptor complex. Finally, the modulation by DCS at ketamine-induced anxiolysis demonstrates significant interaction between distinct modulatory sites at the NMDA-receptor complex.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, D.B.; WILSON, G.T. Effects of alcohol on social anxiety in women: cognitive versus physiological processes. *J. Abnormal Psychol.*, **88**: 161-173, 1979.
- ADAMS, N. Sex differences and the effects of tail pinching on ethanol-drinking Maudsley rats. *Alcohol*, **12**: 463-468, 1995.
- ADAMS, W.L.; YUAN, Z.; BARBORIAK, J.J.; RIMM, A.A. Alcohol - related hospitalizations of elderly people. *JAMA*, **270**: 1222-5, 1993.
- ALESSANDRI, B.; BATTIG, K.; WELZ, H. Effects of ketamine on tunnel maze and water maze performance in the rat. *Behav. Neural Biol.*, **52**: 194-212, 1989.
- ALLAN, C.A. Psychological symptoms, psychiatric disorder and alcohol dependence amongst men and women attending a community-based voluntary agency and an alcohol treatment unit. *Br. J. Addict.*, **86**: 419-427, 1991.
- ALMEIDA, S.S.; DE OLIVEIRA, L.M.; GRAEFF, F.G. Early life protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity to anxiolytics. *Psychopharmacology*, **103**: 513-518, 1991.
- ANIS, N.A.; BERRY, S.C.; BURTON, N.R.; LODGE, D. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br. J. Pharmac.*, **79**: 565-575, 1983.
- ANTHONY, E.W.; NEVINS, M.E. Anxiolytic-like effects of N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor ligands in the rat potentiated startle test. *Eur. J. Pharmacol.*, **250**: 317-24, 1993.
- ARCHER, J. Rodent sex differences in emotional and related behavior. *Behav. Biol.*, **14**: 451-479, 1975.

- ARTHUR, M.J.; LEE, A.; WRIGHT, R. Sex differences in the metabolism of ethanol and acetaldehyde in normal subjects. *Clin. Sci.*, **67**: 397-401, 1984.
- AUDI, E.A.; DE OLIVEIRA, R.M.W.; GRAEFF, F.G. Microinjection of propranolol into the dorsal periaqueductal gray causes an anxiolytic effect in the elevated plus-maze antagonized by ritanserin. *Psychopharmacology*, **105**: 553-557, 1991.
- BEATTY, W.W.; FESSLER, R.G. Ontogeny of sex differences in open-field behavior and sensitivity to electric shock in the rat. *Physiol. Behav.*, **16**: 413-417, 1976.
- BENNETT, D.A.; AMRICK, C.L. Antagonists at the N-methyl-D-aspartate receptor produce anticonflict effects. In: Hicks, T.P.; Lodge, D. and McLennan, H. (eds), *Excitatory Amino Acid Transmission*, Liss, New York, 213-216, 1987.
- BENTIVOGLIO, M.; SPREAFICO, R.; ALVAREZ-BOLADO, G.; SANCHEZ, M.P.; FAIREN, A. Differential expression of Gaba_A receptor complex in the dorsal thalamus and reticular nucleus: an immunohistochemical study in the adult and developing rat. *Eur. J. Neurosci.*, **3**: 118-125, 1991.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; WEISS, S.M. Ethanol effects in an anxiety/defense test battery. *Alcohol*, **7**: 375-381, 1990.
- BLANCHARD, D.C.; SHEPHERD, J.K.; CAROBREZ, A.P.; BLANCHARD, R.J. Sex effects in defensive behavior: baseline differences and drug interactions. *Neurosc. Behav. Rev.*, **15**: 461-468, 1991.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; CAROBREZ, A.P.; VENIEGAS, R.; RODGERS, R.J.; SHEPHERD, J.K. MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male and female rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior. *Psychopharmacology*, **108**: 352-362, 1992.

- BLANCHARD, R.J.; MAGEE, L.; VENIEGAS, R.; BLANCHARD, C. Alcohol and anxiety: ethopharmacological approaches. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat*, **17**: 171-182, 1993.
- BLANKFIELD, A. Psychiatric symptoms in alcohol dependence: diagnostic and treatment implications. *J. Subst. Abuse Treat.*, **3**: 275-278, 1986.
- BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J.; RAAIJMAKERS, W. Reduced Level of anxiety in adult Lewis rats after chronic ethanol consumption. *Physiol. Behav.*, **51**: 245-248, 1992.
- BLUME, S.B. Women's health: issues in mental health, alcoholism and substance abuse. *Pub. Health Reports (Suppl. July-Aug.)*: 38-42, 1987.
- BOHMAN, M.; CLONINGER, R.; SIGVARDSSON, S.; VON KNORRING, A.L. The genetics of alcoholism and related disorders. *J. Psychiatr. Res.*, **21**: 447-452, 1987.
- BOND, N.W.; DI GUISTO, E.L. Changes in open-field behavior following short-term alcohol ingestion by rats. *Psychol. Rep.*, **37**: 575-578, 1975.
- BOURGUIGNON, J.P.; GERARD, A.; MATHIEU, J.; MATHIEU, A.; FRANCHIMONT, P. Maturation of the hypothalamic control of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion at onset of puberty. I Increased activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Endocrinology*, **127**: 873-881, 1990.
- BOWEN, R.C.; CIPYWNYK, D.; D'ARCY, C.; KEEGAN, D. Alcoholism, anxiety disorders, and agoraphobia. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **8**: 48-50, 1984.
- BRADLYN, A.S.; STRICKLER, D.P.; MAXWELL, W.A. Alcohol, expectancy and stress: methodological concerns with the expectancy design. *Addictive Behav.*, **6**: 1-8, 1981.
- CAPPELL, H.; HERMAN, P. Alcohol and tension reduction. *Q. J. Stud. Alcohol.*, **33**: 33-64, 1972.

- CAPPELL, H.; GREELY, J. Alcohol and tension reduction: update on research and theory. In: *Psychological Theories of Drinking and Alcoholism* (Eds Blanc, H.T. and Leonard, K.E.), Guilford Press, New York, 1987.
- CARBONI, S.; ISOLA, R.; GESSA, G.L.; ROSSETTI, Z.L. Ethanol prevents the glutamate release induced by N-methyl-D-aspartate in the rat striatum. *Neurosci. Lett.*, **152**: 133-136, 1993.
- CAROBREZ, A.P. Excitatory amino acid mediation of the defense reaction. In: Brandão, M.L. (ed.) *Neuroscience and Behavior*. Vitória: UFES, p. 21-29, 1987.
- CHAIT, L.D.; WENGER, G.R.; MCMILLAN, D.E. Effects of phencyclidine and ketamine on punished and unpunished responding by pigeons. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **15**: 145-148, 1981.
- CHAMBLESS, D.L.; CHERNEY, J.; CAPUTO, G.C.; RHEINSTEIN, B.J. Anxiety disorders and alcoholism: a study with inpatient alcoholics. *J. Anxiety Disord.*, **1**: 29-40, 1987.
- CHIN, J.H.; GOLDSTEIN, D.B. Effects of low concentrations of ethanol on the fluidity of spin-labeled erythrocyte and brain membranes by a series of short-chain alcohols. *Mol. Pharmacol.*, **13**: 435-441, 1977.
- CHRISTENSEN, H.; FONNUM, F. Uptake of glycine, Gaba and glutamate by synaptic vesicle isolated from different regions of rat CNS. *Neurosci. Lett.*, **129**: 217-220, 1991.
- CHRISTENSEN, H.; FONNUM, F. The ontogeny of the uptake systems for glutamate, Gaba, and glycine in synaptic vesicles isolated from the rat brain. *Neurochem. Res.*, **43**: 1195-1200, 1992.
- CHURCH, J.; ZEMAN, S.; LODGE, D. The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology*, **69**: 702-709, 1988.

- COOP, C.F.; MCNAUGHTON, N.; WARNOCK, K.; LAVERTY, R. Effects of ethanol and Ro 15-4513 in an electrophysiological model of anxiolytic action. *Neuroscience*, **35**: 669-674, 1990.
- CORBETT, R.; DUNN, R.W. Effects of HA-966 on conflict, social interaction, and plus maze behaviors. *Drug Dev. Res.*, **24**: 201, 1991.
- CORBETT, R.; DUNN, R.W. Effects of 5,7 dichlorokynurenic acid on conflict, social interaction and plus maze behaviors. *Neuropharmacology*, **32**: 461-6, 1993.
- COTMAN, C.W.; IVERSEN, L.L. Excitatory amino acids in the brain-focus on NMDA receptors. *TINS.*, **10**: 263-5, 1987.
- COTMAN, C.W.; MONAGHAN, D.T. Chemistry and anatomy of excitatory amino acid systems. In: *Psychopharmacology: The third generation of progress*. Edited by Meltzer, H.Y. New York, Raven Press, 1987.
- COTMAN, C.W.; BRIDGES, R.J.; TAUBE, J.S.; CLARK, A.S.; GEDDES, J.W.; MONAGHAN, D.T. The role of the NMDA receptor in central nervous system plasticity and pathology. *J. NIH Res.*, **1**: 65-74, 1989.
- COTTON, N.S. The familial incidence of alcoholism. *J. Stud. Alcohol.*, **40**: 89-116, 1979.
- COWLEY, D.S. Alcohol abuse, substance abuse, and panic disorder. *Am. J. Medic.*, Suppl. 1A: 41-48, 1992.
- COYLE, J.T.; ENNA, S.J. Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the rat brain, *Brain Res.*, **111**: 119-133, 1976.
- CRAWLEY, J.N.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **13**: 167-170, 1980.
- CRISWELL, H.E.; KNAPP, D.J.; OVERSTREET, D.H.; BREESE, G.R. Effects of ethanol, chlordiazepoxide, and MK-801 on performance in the elevated-plus

- maze and on locomotor activity. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **18**: 596-601, 1994.
- CRITCHLEY, M.A.E.; NJUNG'E, K.; HANDLEY, S.L. Actions and some interactions of 5-HT_{1A} ligands in the elevated X-maze and effects of dorsal raphe lesions. *Psychopharmacology*, **106**: 484-490, 1992.
- DANIELL, L. Ethanol effects on central N-methyl-D-aspartate receptors. In: Watson, R.R. (ed.), *Alcohol and Neurobiology/ receptors, membranes and channels*. CRC Press, Inc., 13-22, 1992.
- DAVAL, J.L.; WERK, M.C.; NEHLIG, A.; VASCONCELOS, A.P. Quantitative autoradiographic study of the postnatal development of benzodiazepine binding sites and their coupling to Gaba receptors in the rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **9**: 307-320, 1991.
- DAVIS, D. Mood changes in alcoholic subjects with programmed and free-choice experimental drinking. Recent advances in studies of alcoholism. Washington, D.C.: Government Printing Office, 1971.
- DAWSON, D.A.; HARFORD, T.C.; GRANT, B.F. Family history as a predictor of alcohol dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **16**: 572-575, 1992.
- DE SARRO, G.B.; DE SARRO, A. Anticonvulsant properties of non-competitive antagonists of the N-methyl-D-aspartate receptor in genetically epilepsy-prone rats: comparison with CPPene. *Neuropharmacology*, **32**: 51-58, 1993.
- DEUTSCH, S.I.; NORRIS, D.O.; O'CONNOR, D.A.; NOVITZKI, M.R.; LUKACS, L.G.; MASTROPAOLO, J. Effects of milacemide, a glycine prodrug, on ethanol's antiseizure efficacy. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **41**: 263-266, 1992.
- DICKERSON, L.L.; FERRARO, D.P. Effects of alcohol on specific and environmental fear. *Psychol. Rep.*, **39**: 1335-1342, 1976.

- DILDY-MAYFIELD, J.E.; LESLIE, S.W. Mechanism of inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated increases in free intracellular calcium by ethanol. *J. Neurochem.*, **56**: 1536-1543, 1991.
- DINGLELINE, R.; HYNES, M.A.; KING, G.L. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in epileptiform bursting in the rat hippocampal slice. *J. Physiol.*, **380**: 175-189, 1986.
- DUDEK, B.C.; MAIO, A.; PHILLIPS, T.J.; PERRONE, M. Naturalistic behavioral assessment of anxiolytic properties of benzodiazepines and ethanol in mice. *Neurosci. Lett.*, **63**: 265-270, 1986.
- DUNN, R.W.; CORBETT, R.; FIELDING, S. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.*, **169**: 1-10, 1989.
- DUNN, R.W.; FLANAGAN, D.M.; MARTIN, L.L.; KERMAN, L.L.; WOODS, A.T.; CAMACHO, F.; WILMOT, C.A.; CORNFELDT, M.L.; EFFLAND, R.C.; WOOD, P.L.; CORBETT, R. Stereoselective R-(+) enantiomer of HA-966 displays anxiolytic effects in rodents. *Eur. J. Pharmacol.*, **214**: 207-214, 1992.
- DURCAN, M.J.; LISTER, R.G. Time course of ethanol's effects on locomotor activity, exploration and anxiety in mice. *Psychopharmacology*, **96**: 67-72, 1988.
- EINON, D.; POTEHAL, M. Enhanced defense in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. *Aggress. Behav.*, **17**: 27-40, 1991.
- EMMETT, M.R.; MICK, S.J.; CLER, J.A.; RAO, T.S.; IYENGAR, S.; WOOD, P.L. Actions of D-cycloserine at the N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor site in vivo. *Neuropharmacology*, **30**: 1167-1171, 1991.
- ENGEL, J.A. Influence of age and hormones on the stimulatory and sedative effects of ethanol. *Alcohol and the Developing Brain*, edited by U. Rydberg et al. Raven Press. New York, pp. 57-67, 1985.

- ERICKSON, C.K.; GRAHAM, D.T. Alterations in cortical and reticular acetylcholine release by ethanol in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **185**: 583-593, 1973.
- FAGG, G.E.; FOSTER, A.C. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience*, **9**: 701-719, 1983.
- FAGG, G.E.; MASSIEU, L. Excitatory amino acid receptor subtypes. In: Meldrum, B.S. (ed): *Excitatory amino acid antagonists*. London, Blackwell Scientific Publications, pp. 39-63, 1991.
- FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal grey as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DePaulis, A.; Bander, R., editors. *The midbrain periaqueductal grey matter: functional, anatomical and neurochemical organisation*. New York: Plenum Press, 151-73, 1991.
- FARRIS, E.J. Breeding of the rat. In: E.J. Farris and J.Q. Griffith (Eds.), *The rat in laboratory investigation*, (J.B. Lippincott, Philadelphia), pp. 1-18, 1949.
- FERNANDEZ-GUASTI, A.; PICAZO, O. The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrus cycle phase. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **37**: 77-81, 1990.
- FILE, S.E. Chronic exposure to noise modifies the anxiogenic response, but not the hypoactivity, detected on withdrawal from chronic ethanol treatment. *Psychopharmacology*, **116**: 369-372, 1994.
- FLOOD, J.F.; MORLEY, J.E.; LANTHORN, T.H. Effect on memory processing by D-cycloserine, an agonist of the NMDA/glycine receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **221**: 249-254, 1992.
- FORSYTHE, I.D.; WESTBROOK, G.L.; MAYER, M.L. Modulation of excitatory synaptic transmission by glycine and zinc in cultures of mouse hippocampal neurons. *J. Neurosci*, **8**: 3733-3741, 1988.
- FOSTER, A.C.; FAGG, G.E. Taking apart NMDA receptors. *Nature*, **329**: 395-8, 1987.

- FOSTER, A.C.; KEMP, J.A. HA-966 antagonizes N-methyl-D-aspartate receptors through a selective interaction with the glycine modulatory site. *J. Neurosci.*, **9**: 2191-2196, 1989.
- FRANKS, N.P.; LIEB, W.R. Do general anesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature*, **310**: 599-601, 1984.
- FREZZA, M.; DI PADOVA, C.; POZZATO, G.; TERPIN, M.; BARAONA, E.; LIEBER, C.S. High blood alcohol levels in women: the role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *N. Engl. J. Med.*, **322**: 95-99, 1990.
- FYER, A.J.; MANNUZZA, S.; ENDICOTT, J. Differential diagnosis and assessment of anxiety: recent developments. In: Meltzer, H.Y., editor. *Psychopharmacology: the third generation of progress*. New York: Raven Press, 1177-91, 1987.
- GALDURÓZ, J.C.F.; D'ALMEIDA, V.; CARVALHO, V.; CARLINI, E.A. III Levantamento sobre o uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras - 1993. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina, 81p., 1994.
- GASIC, G.P.; HOLLMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev. Physiol.*, **54**: 507-536, 1992.
- GLENN, S.W.; PARSONS, O.A. Neuropsychological efficiency measures in male and female alcoholics. *J. Stud. Alcohol*, **53**: 546-552, 1992.
- GOLDSTEIN, D.B. Physical dependence on ethanol: Its relation to tolerance. *Drug Alcohol Depend.*, **4**: 33-42, 1979.
- GOLDSTEIN, D.B.; CHIN, J.H.; LYON, R.C. Ethanol disordering of spin-labeled mouse brain membranes: Correlation with genetically determined ethanol sensitivity of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 4231-4233, 1982.

- GOLDSTEIN, D.B.; CHIN, J.H. Interaction of ethanol with biological membrane. *Fed. Proc.*, **41**: 1073-1076, 1981.
- GONZALES, R.A. NMDA receptors excite alcohol research. *TIPS*, **11**: 137-139, 1990.
- GOODWIN, D.W. Is alcoholism hereditary? New York, Oxford University Press, 1976.
- GOODWIN, D.W. Alcohol: Clinical aspects. In: *Substance abuse. A Comprehensive Textbook*. Lowinson, J.H.; Ruiz, P.; Millman, R.B.; Langrod, J.G. (eds.). 2nd edition, 144-151, 1992.
- GRAY, J. Drug effects on fear and frustration. Possible limbic site of action of minor tranquilizers, in *Handbook of Psychopharmacology: Drugs, Neurotransmitters and Behavior* (Iversen, L.L.; Iversen, S.D. and Snyder, S.H., eds), Plenum, New York, vol. 8, pp. 433-529, 1977.
- GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology*, **103**: 91-94, 1991.
- HAEFELY, W.E. The GABA_A-benzodiazepine receptor complex and anxiety. In: *Anxiety. Psychobiological and Clinical Perspectives*. Sartorius, N.; Andreoli, V.; Cassano, G.; Eisenberg, L.; Kielholz, P.; Pancheri, P.; Racagni, G. (eds). Hemisphere Publishing Corporation, New York, 23-36, 1990.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **327**: 1-5, 1984.
- HANDLEY, S. Future prospects for the pharmacological treatment of anxiety. *CNS Drugs*, **2**: 397-414, 1994.

- HARD, E.; ENGEL, J.; MUSI, B. The ontogeny of defensive reactions in the rat: influence of the monoamine transmission systems. *Scand. J. Psychol.*, Suppl. 1, 90-96, 1982.
- HARFORD, T.C.; PARKER, D.A.; GRANT, B.F.; DAWSON, D.A. Alcohol use and dependence among employed men and women in the United States in 1988. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **16**: 146-148, 1992.
- HARPER, C.G.; SMITH, N.A.; KRIL, J.J. The effects of alcohol on the human brain: A neuropathological study. *Alcohol. Alcohol.*, **25**: 445-448, 1990.
- HEALE, V.; HARLEY, C. MK-801 and AP5 impair acquisition, but not retention, of the Morris milk maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **36**: 145-149, 1990.
- HELZER, J.E.; PRYZBECK, T.R. The co-occurrence of alcoholism with other psychiatric disorders in the general population and its impact on treatment. *J. Stud. Alcohol.*, **49**: 219-224, 1988.
- HENDERSON, G.; JOHNSON, J.W.; ASCHER, P. Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of the mouse N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Physiol. (London)*, **430**: 189-212, 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**: 1937-1940, 1989.
- HÖNACK, D.; LÖSCHER, W. Sex differences in NMDA receptor mediated responses in rats. *Brain Res.*, **620**: 167-170, 1993.
- HONEY, C.R.; MILJKOVIC, Z.; MACDONALD, J.F. Ketamine and phencyclidine cause a voltage-dependent block of responses to L-aspartic acid. *Neurosci. Lett.*, **61**: 135-9, 1985.
- HOOD, W.F.; COMPTON, R.P.; MONAHAN, J.B. D-cycloserine: a ligand for the N-methyl-D-aspartate coupled glycine receptor has partial agonist characteristics. *Neurosci. Lett.*, **98**: 91-95, 1989.

- HUMBLE, M. Aetiology and mechanisms of anxiety disorders. *Acta Psychiatr. Scand.*, **76**: 15-30, 1987.
- HUNT, W.A. Neuroscience Research: How has it contributed to our understanding of alcohol abuse and alcoholism? A review. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **17**: 1055-1065, 1993.
- IMHOF, J.T.; COELHO, Z.M.I.; SCHMITT, M.L.; MORATO, G.S.; CAROBREZ, A.P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus-maze apparatus. *Behav. Brain Res.*, **56**: 177-180, 1993.
- INSEL, T.R.; MILLER, L.P.; GELHARD, R.E. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain - I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*, **35**: 31-43, 1990.
- INSEL, T.R. The development of brain and behavior. In: *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, edited by Bloom, F.E. and Kupfer, D.J. Raven Press, Ltd., New York, 683-694, 1995.
- JARVIS, T.J. Implications of gender for alcohol treatment research: A quantitative and qualitative review. *Br. J. Addict.*, **87**: 1249-1261, 1992.
- JOHNSON, J.W.; ARCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature (Lond.)*, **325**: 529-531, 1987.
- JOHNSTON, A.L.; FILE, S.E. Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol. Behav.*, **49**: 245-250, 1991.
- JONES, B.M.; JONS, M.K. Male and female intoxication levels for three alcohol doses or do women really get higher than men? *Alcohol Tech. Rep.*, **5**: 11-14, 1976.
- KANT, G.J.; WRIGHT, W.L.; ROBINSON III, T.N.; D-ANGELO, C.P. Effects of MK-801 and learning and memory as assessed using a novel water maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **39**: 479-485, 1991.

- KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M.; LANGINVAINIO, H.; ROMANO, K.; SARNA, S.; ROSE, R.J. Genetic influences on use and abuse of alcohol: A study of 5638 adult Finnish twin brothers. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **11**: 349-356, 1987.
- KATO, R.; CHIESARA, E.; FRONTINO, G. Induced increase of meprobamate metabolism in rats pretreated with phenobarbital or phenaglycodol in relation to age. *Experientia*, **17**: 520, 1961.
- KEMP, J.A.; LEESON, P.D. The glycine site of the NMDA receptor - five years on. *TIPS*, **141**: 20-25, 1993.
- KEMP, J.A.; FOSTER, A.C.; WONG, E.H.F. Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. *TINS*, **10**: 294-298, 1987.
- KEMP, J.A.; FOSTER, A.C.; LEESON, P.D.; PRIESTLEY, T.; TRIDGETT, R.; IVERSEN, L.L.; WOODRUFF, G.N. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 6547-6550, 1988.
- KENDLER, K.S.; HEATH, A.C.; NEALE, M.C.; KESSLER, R.C.; EAVES, L.J. A population-based twin study of alcoholism in women. *JAMA*, **268**: 1877-1882, 1992.
- KHANNA, J.M.; WU, P.H.; WEINER, J.; KALANT, H. NMDA antagonist inhibits rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, **26**: 643-645, 1991.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; SHAH, G.; CHAU, A. Effect of (+)MK-801 and ketamine on rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, **28**: 311-314, 1992.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; SHAH, G.; CHAU, A. Effect of D-cycloserine on rapid tolerance to ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **45**: 983-986, 1993a.
- KHANNA, J.M.; MORATO, G.S.; SHAH, G.; CHAU, A.; KALANT, H. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, **32**: 43-47, 1993b.

- KHANNA, J.M.; MORATO, G.S.; CHAU, A.; SHAH, G. Influence of nitric oxide synthetase inhibition on the development of rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, **37**: 599-604, 1995.
- KIIANMAA, K.; TABAKOFF, B. Neurochemical correlates of tolerance and strain differences in the neurochemical effects of ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **18**: 383-388, 1983.
- KORPI, E.R. Role of GABA_A receptors in the actions of alcohol and in alcoholism: recent advances. *Alc. Alcohol*, **29**: 115-129, 1994.
- KOSTOWSKI, W.; PLAZNIK, A.; STEFANSKI, R. Intra-hippocampal buspirone in animal models of anxiety. *Eur. J. Pharmacol.*, **186**: 393-396, 1989.
- KUSHNER, M.G.; SHER, K.J.; BEITMAN, B.D. The relations between alcohol problems and the anxiety disorders. *Am. J. Psychiat.*, **147**: 685-695, 1990.
- LADER, M. The nature of anxiety. *Br. J. Psychiat.*, **121**: 481-491, 1972.
- LAL, H.; PRATHER, P.L.; REZAZADEH, M. Anxiogenic behavior in rats during acute and protracted ethanol withdrawal: reversal by buspirone. *Alcohol*, **8**: 467-471, 1991.
- LALONDE, R.; JOYAL, C.C. Effects of ketamine and l-glutamic acid diethyl ester on concept learning in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **39**: 829-833, 1991.
- LANCASTER, F.E. Gender differences in the brain: implications for the study of human alcoholism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **18**: 740-746, 1994.
- LEDOUX, J.E. Emotional memory: in search of systems and synapses. *Ann NY Acad. Sci.*, **702**: 149-57, 1993.
- LEPOLA, U. Alcohol and depression in panic disorder. *Act. Psychiatr. Scand.*, **377**: 33-35, 1994.
- LESLIE, W.; BROWN, L.M.; DILDY, J.E.; SIMS, J.S. Ethanol and neuronal calcium channels. *Alcohol*, **7**: 233-236, 1990.

- LEVITT, M.D. Review article: Lack of clinical significance of the interaction between H₂-receptor antagonists and ethanol. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **7**: 131-138, 1993.
- LIEBER, C.S. Medical and nutritional complications of alcoholism: mechanisms and management. New York: Plenum Press, 1992.
- LIEBER, C.S. Medical disorders of alcoholism. *New Engl. J. Med.*, **333**: 1058-1065, 1995.
- LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Engl. J. Med.*, **330**: 613-622, 1994.
- LISTER, R.G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, **92**: 180-185, 1987.
- LISTER, R.G. Interactions of three benzodiazepine receptor inverse agonists with ethanol in a plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **30**: 701-706, 1988.
- LITTEN, R.Z.; ALLEN, J.P. Pharmacotherapies for alcoholism: promising agents and clinical issues. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **15**: 620-633, 1991.
- LITTLE, H.J.; DOLIN, S.J.; WHITTINGTON, M.A. Possible role of calcium channels in ethanol tolerance and dependence. *Ann NY Acad. Sci.*, **560**: 465-466, 1988.
- LITTLETON, J.M. Development of membrane tolerance to ethanol may limit intoxication and influence dependence liability. In: Sandler, M. (ed.) *Psychopharmacology of Alcohol*, New York: Raven Press, pp. 121-127, 1980.
- LOPES-DA-SILVA, N.; FERREIRA, V.M.M.; CAROBREZ, A.P.; MORATO, G.S. Social isolation modifies the performance of young rats in the elevated plus-maze apparatus. *Physiol. Behav.*, 1996, in press.
- LÖSCHER, W.; HÖNACK, D. The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. *Eur. J. Pharmacol.*, **215**: 199-208, 1992.

- LOVINGER, D.M.; WHITE, G.; WEIGHT, F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, **243**: 1721-1724, 1989.
- LOVINGER, D.M. Trans-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic (t-ACPD) decreases synaptic excitation in rat striatal slices through presynaptic action. *Neurosci. Lett.*, **129**: 17-21, 1991.
- LOVINGER, D.M. Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **17**: 19-27, 1993.
- LUDWING, A.M. On and off the wagon. *Q.J. Stud. Alcohol.*, **33**: 91-96, 1972.
- LYON, R.C.; MCCOMB, J.A.; SCHREURS, J.; GOLDSTEIN, D.B. A relationship between alcohol intoxication and the disordering of brain membranes by a series of short-chain alcohols. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **218**: 669-675, 1981.
- MANDELL, G.L.; SARDT, M.A. In: Goodman Gilman, A., et al., eds. The pharmacological basis of therapeutics. New York: Macmillan, 1203, 1985.
- MANSFIELD, J.G.; CUNNINGHAM, C.L. Conditioning and extinction of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **94**: 962-969, 1980.
- MARKS, I.; LADER, M. Anxiety states (anxiety neurosis): a review. *J. Nerv. Ment. Dis.*, **156**: 3-18, 1973.
- MARRIOTT, A.S.; SPENCER, P.S. Effects of centrally acting drugs on exploratory behaviour in rats. *Brit. J. Pharmacol.*, **25**: 432-441, 1965.
- MASUR, J.; SCHUTZ, M.T.; BOERNGEN, R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. *Dev. Psychobiol.*, **13**: 107-110, 1980.
- MATHEUS, M.G.; NOGUEIRA, R.L.; CAROBREZ, A.P.; GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology*, **113**: 565-569, 1994.
- MAYER, M.L. Physiology and biophysics of the NMDA receptor channel complex. In: Meldrum, B.S. (ed.) *Excitatory Amino Acid Antagonists*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, pp.: 64-83, 1991.

- MCCOWN, T.J.; FRYE, G.D.; BREESE, G.R. Evidence for site specific ethanol actions in the CNS. *Alcohol. Drug Res.*, **6**: 423-429, 1986.
- MCDONALD, J.W.; JOHNSTON, M.V.; YOUNG, A.B. Differential ontogenetic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Exp. Neurol.*, **110**: 237-247, 1990.
- MCGIVERN, R.F.; BARRON, S. Influence of prenatal alcohol exposure on the process of neurobehavioral sexual differentiation. *Alcohol Health Res. World*, **15**: 115-125, 1991.
- MERIKANGAS, K.R.; RISCH, N.J.; WEISSMAN, M.M. Comorbidity and co-transmission of alcoholism anxiety and depression. *Psychol. Medic.*, **24**: 69-80, 1994.
- MIDDAUGH, L.D.; FRACKELTON, W.F.; BOGGAN, W.O.; ONOFRIO, A.; SHEPHERD, C.L. Gender differences in the effects of ethanol on C57BL/6 mice. *Alcohol*, **9**: 257-260, 1992.
- MONAGHAN, D.T.; BRIDGES, R.J.; COTMAN, C.W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **29**: 365-402, 1989.
- MONAHAN, J.B.; HANDELMANN, G.E.; HOOD, W.F.; CORDI, A.A. D-cycloserine, a positive modulator of the N-methyl-D-aspartate receptor, enhances performance of learning tasks in rats. *Pharmacol. Bioch. Behav.*, **34**: 649-653, 1989.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **48**: 254-260, 1955.
- MORGAN, M.Y.; SHERLOCK, S. Sex-related differences among 100 patients with alcoholic liver disease. *Br. Med. J.*, **1**: 939-941, 1977.
- MORRISON, C.F.; STEPHENSON, J.A. Drug effects on a measure of unconditioned avoidance in the rat. *Psychopharmacologia*, **18**: 133-143, 1970.

- MULLANEY, J.A.; TRIPPETT, C.J. Alcohol dependence and phobias: clinical description and relevance. *Brit. J. Psychiat.*, **135**: 565-573, 1979.
- NABESHIMA, T.; YAMAGUCHI, K.; YAMADA, K.; HIRAMATSU, M.; KUWABARA, Y.; FURUKAWA, H.; KAMEYAMA, T. Sex-dependent differences in the pharmacological actions and pharmacokinetics of phencyclidine in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **97**: 217-227, 1984.
- NEVO, I.; HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism, *Neurochem. Int.*, **26**: 305-336, 1995.
- NIE, Z.; YUAN, X.; MADAMBA, S.G.; SIGGINS, G.R. Ethanol decreases glutamatergic synaptic transmission in rat nucleus accumbens in vitro: naloxone reversal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**: 1705-1712, 1993.
- NOLAN, N.A.; PARKES, M.W. The effects of benzodiazepines on the behaviour of mice on a holeboard. *Psychopharmacologia*, **29**: 277-288, 1973.
- NORTON, R.; BATEY, R.; DWYER, T.; MACMAHON, S. Alcohol consumption and the risk of alcohol related cirrhosis in women. *Br. Med. J. Clin. Res.*, **295**: 80-82, 1987.
- PARDES, H.; KAUFMANN, C.A.; PINCUS, H.A.; WEST, A. Genetics and psychiatry: past discoveries, current dilemmas, and future directions. *Am. J. Psychiat.*, **146**: 435-443, 1989.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.*, **14**: 149-167, 1985.
- PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **24**: 525-529, 1986.

- PEOPLES, R.W.; WEIGHT, F.F. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate-activated ion current in rat hippocampal neurons is not competitive with glycine. *Brain Res.*, **571**: 342-344, 1992.
- POLIVY, J.; SCHUENEMAN, A.L.; CARLSON, K. Alcohol and tension reduction: cognitive and physiological effects. *J. Abn. Psychol.*, **85**: 595-600, 1976.
- PORTER, J.H.; WILEY, J.; BALSTER, R.L. Effects of phencyclidine-like drugs on punished behavior in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**: 987-1002, 1989.
- RABE, C.S.; TABAKOFF, B. Glycine site-directed agonists reverse the actions of ethanol at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol. Pharmacol.*, **38**: 753-757, 1990.
- RAGURAM, R.; BHIDE, A.Y. Patterns of phobic neurosis: a retrospective study. *Br. J. Psychiat.*, **147**: 557-560, 1985.
- RECASENS, M. Putative molecular mechanisms underlying long term potentiation (LTP): the key role of excitatory amino acid receptors. *Thérapie*, **50**: 19-34, 1995.
- REGIER, D.A.; FARMER, M.; RAE, D.; LOCKE, B.; KEITH, S.; JUDD, L.; GOODWIN, F. Comorbidity of mental disorders with alcohol and drug abuse. *J. Am. Med. Assoc.*, **240**: 2511-2518, 1990.
- RODGERS, R.J.; COLE, J.C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol. Behav.*, **54**: 729-736, 1993.
- ROTHER, T.; MIDDLETON-PRICE, H.; BIGL, V. The ontogeny of Gaba receptors and glutamic acid decarboxylase in regions of the rat brain. *Neuropharmacology.*, **27**: 661-667, 1988.
- RUSSO, A.S.; GUIMARÃES, F.S.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. *Psychopharmacology*, **110**: 198-202, 1993.
- SANGER, D.J. Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. In: Boulton, A.; Baker, G. and Martin-Iverson, M.

- Animal Models in Psychiatry, II*. The Humana Press Inc., vol. 19: 147-198, 1991.
- SCATTON, B. The NMDA receptor complex. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 7: 389-400, 1993.
- SCHMITT, M.L.; COELHO, W.; LOPES-DE-SOUZA, A.S.; GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Neurosci. Lett.*, 189: 93-96, 1995.
- SCHUCKIT, M.A. Genetic and clinical implications of alcoholism and affective disorder. *Am. J. Psychiatry*, 143: 140-147, 1986.
- SCHUSTER, G.; SCHMIDT, W.J. D-cycloserine reverses the working memory impairment of hippocampal-lesioned rats in a spatial learning task. *Eur. J. Pharmacol.*, 224: 97-98, 1992.
- SERRANO, A.; D'ANGIO, M.; SCATTON, B. NMDA antagonists block restraint-induced increase in extracellular DOPAC in rat nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.*, 162: 157-166, 1989.
- SHEEHAN, D.V. Current concepts in psychiatry, panic attacks and phobias. *N. Engl. J. Med.*, 307: 156-158, 1982.
- SHEFNER, S.A.; TABAKOFF, B. Basal firing rate of rat locus coeruleus neurons affects sensitivity to ethanol. *Alcohol*, 2: 239-243, 1985.
- SHINOHARA, K.; NISHIKAWA, T.; ISHII, S.; YAMAZAKI, K.; TAKAHASHI, K. Ontogeny of amino acids related to excitatory aminoacidergic transmission in the rat forebrain. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 14: 381-386, 1989.
- SIMON, R.P.; SWAN, J.H.; GRIFFITHS, T.; MELDRUM, B.S. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science*, 226: 850-852, 1984.

- SIMSON, P.E.; CRISWELL, H.E.; JOHNSON, K.B.; HICKS, R.E.; BREESE, G.R. Ethanol Inhibits NMDA-evoked electrophysiological activity in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**: 225-231, 1991.
- SIMSON, P.E.; CRISWELL, H.E.; BREESE, G.R. Inhibition of NMDA-evoked electrophysiological activity by ethanol in selected brain regions: evidence for ethanol-sensitive and ethanol-insensitive NMDA-evoked responses. *Brain Res.*, **607**: 9-16, 1993.
- SINGH, L.; DONALD, A.E.; FOSTER, A.C.; HUTSON, P.H.; IVERSEN, L.L.; IVERSEN, S.D.; KEMP, J.A.; LEESON, P.D.; MARSHALL, G.R.; OLES, R.J.; PRIESTLEY, T.; THORN, L.; TRICKLEBANK, M.D.; VASS, C.A.; WILLIAMS, B.J. Enantiomers of HA-966 (3-amino-1-hydroxypyrrolid-2-one) exhibit distinct central nervous systems effects: (+)-HA-966 is a selective glycine/N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, but (-)-HA-966 is a potent gamma-butyrolactone-like sedative. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 347-351, 1990.
- SLADCEK, F.; PIN, J.P.; RECASENS, M.; BOCKAERT, J.; WEISS, S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature*, **317**: 717-719, 1985.
- SLATER, E.; ROTH, M. *Clinical Psychiatry*. London: Balliere, Tindall and Cassel, 3rd ed., p. 395, 1969.
- SMAIL, P.; STOCKWELL, T.; CANTER, S.; HODGSON, R. Alcohol dependence and phobic anxiety states. I. A prevalence study. *Brit. J. Psychiat.*, **144**: 53-57, 1984.
- SMITH, T.; DEMASTER, E.G.; FURNE, J.K.; SPRINGFIELD, J.; LEVITT, M.D. First-pass gastric mucosal metabolism of ethanol is negligible in the rat. *J. Clin. Invest.*, **89**: 1801-1806, 1992.
- STEENBERGEN, H.L.; HEINSBROEK, R.P.W.; VAN HEST, A.; VAN DE POLL, N. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-

- escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol. Behav.*, **48**: 571-576, 1990.
- STEENBERGEN, H.L.; FARABOLLINI, F.; HEINSBROEK, R.P.W.; VAN DE POOL, N.E. Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Behav. Brain Res.*, **43**: 159-165, 1991.
- STOCKWELL, T.; SMAIL, P.; HODGSON, R.; CANTER, S. Alcohol dependence and phobic anxiety states. II. A retrospective study. *Brit. J. Psychiat.*, **144**: 58-63, 1984.
- STREIT, P. Glutamate and aspartate as transmitter candidates for systems of the cerebral cortex. In: E.G. Jones and A. Peters (Eds.) *Cerebral Cortex. Functional Properties of Cortical Cells*, Plenum Press, New York, vol. 2, pp. 119-143, 1984.
- SUN, A.Y. Biochemical and biophysical approaches in the study of ethanol-membrane interaction. in: Majchrowicz, E. and Noble, E.P. (Eds.) *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol, Vol. 2*, (New York: Plenum Press), pp. 81-100, 1979.
- TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L.; MOSES, F. Neurochemical correlates of ethanol withdrawal: alterations in serotonergic function. *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**: 471-476, 1977.
- TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. Neurochemical effects of alcohol. In Frances, R.J.; Miller, S.I. (eds), *Clinical Textbook of Addictive Disorders*. New York: Guilford Press, pp. 501-525, 1991.
- TESTA, B; JENNER, P. Sex differences in drug metabolism in: *Drug Metabolism: Chemical and Biochemical Aspects* (Marcel Dekker Inc., New York and Basel), p. 389, 1976.
- THOMSON, A.M. Glycine modulation of the NMDA receptor/channel complex. *TINS*, **12**: 349-353, 1989.

- THOMSON, A.M. Glycine as a coagonist at the NMDA receptor channel complex. *Prog. Neurobiol.*, **35**: 53-74, 1990.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **44**: 463-9, 1993.
- TRULLAS, R.; JACKSON, B.; SKOLNICK, P. Anxiolytic properties of l-aminocyclopropanecarboxylic acid, a ligand at strychnine insensitive glycine sites. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **34**: 313-316, 1989.
- TSAI, G.; GASTFRIEND, D.R.; COYLE, J.T. The glutamatergic basis of human alcoholism. *Am. J. Psychiatry*, **152**: 332-340, 1995.
- VAN HAAREN, F.; ANDERSON, K. Sex differences in schedule-induced alcohol consumption. *Alcohol*, **11**: 35-40, 1994.
- VERDOORN, T.A.; KLECKNER, N.W.; DINGLEDINE, R. Rat brain N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Science*, **238**: 1114-1116, 1987.
- VON WARTBURG, J.P. On the importance of the psychotropic effects of alcohol. *Drug Alcohol Depend.*, **25**: 135-139, 1990.
- WANG, X.; LEMOS, J.R.; DAYANITHI, G.; NORDMANN, J.J.; TREISTMAN, S.N. Ethanol reduces vasopressin release by inhibiting calcium currents in nerve terminals. *Brain Res.*, **551**: 338-341, 1991.
- WATSON, G.B.; BOLANOWSKI, M.P.; BAGANOFF, M.A.; DEPPELER, C.L.; LANTHORN, T.H. D-cycloserine acts as a partial agonist at the glycine modulatory site of the NMDA receptor expressed in *Xenopus oocytes*. *Brain Res.*, **510**: 158-160, 1990.
- WEISS, K.J.; ROSENBERG, D.J. Prevalence of anxiety disorder among alcoholics. *J. Clin. Psychiat.*, **46**: 3-5, 1985.
- WESNER, R.B. Alcohol use and abuse secondary to anxiety. *Psychiat. Clin. North Am.*, **13**: 699-713, 1990.

- WHITE, P.F.; MARIETTA, M.P.; PUDWILL, C.R.; WAY, W.L.; TREVOR, A.J. Effects of halothane anaesthesia on the biodisposition of ketamine in rats. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **196**: 545-555, 1976.
- WHITE, P.F.; WAY, W.L.; TREVOR, A.J. Ketamine - its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology*, **56**: 119-136, 1982.
- WHITE, G.; LOVINGER, D.M.; WEIGHT, F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated current but does not affect Gaba-activated current in an isolated adult mammalian neuron. *Brain Res.*, **507**: 332-336, 1990.
- WILSON, G.T.; ABRAMS, D.B. Effects of alcohol on social anxiety and physiological arousal: cognitive versus pharmacological processes. *Cognitive Ther.Res.*, **1**: 195-210, 1977.
- WITT, E.D. Mechanisms of alcohol abuse and alcoholism in adolescents: A case for developing animal models. *Behav. Neur. Biol.*, **62**: 168-177, 1994.
- WONG, E.H.F.; KEMP, J.A.; PRIESTLEY, T.; KNIGHT, A.R.; WOODRUFF, G.N. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 7104-7108, 1986.
- WOODRUFF, R.A.; GUZE, S.B.; CLAYTON, P.J. Anxiety neurosis among psychiatric outpatients. *Compreh. Psychiat.*, **13**: 165-170, 1972.
- WOODWARD, J.J.; GONZALES, R.A. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated endogenous dopamine release from rat striatal slices: reversal by glycine. *J. Neurochem.*, **54**: 712-715, 1990.
- WOODWARD, J.J. A comparison of the effects of ethanol and the competitive glycine agonist 7-chlorokynurenic acid on N-methyl-D-aspartic acid-induced neurotransmitter release from rat hippocampal slices. *J. Neurochem.*, **62**: 987-991, 1994.
- ZIMMERBERG, B.; FARLEY, M.J. Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. *Physiol. Behav.*, **54**: 1119-1124, 1993.