



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Patrícia Sobierajski Barreto

**Influência do bloqueio do receptor NMDA e da síntese
do óxido nítrico sobre a tolerância rápida ao etanol
em camundongos submetidos ao teste do rota-rod**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia Orientador:
*Professora Dra. Gina Struffaldi
Morato*

Florianópolis 1997

BARRETO, Patrícia Sobierajski. *Influência do bloqueio do receptor NMDA e da síntese do óxido nítrico sobre a tolerância rápida ao etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod*. Florianópolis, 1997. 104p. Dissertação (mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Gina Struffaldi Morato

Defesa: 26/09/97

A [tolerância rápida] (TR) é observada, cerca de 8-24 hs, após desaparecerem os efeitos da primeira dose. Drogas antagonistas do receptor NMDA, podem prejudicar a aprendizagem e bloquear o desenvolvimento da TR. Neste trabalho estudou-se o bloqueio da TR em [camundongos suíços fêmeas], submetidos ao rota-rod. Nos testes, inicialmente foi caracterizado o desenvolvimento da TR à incoordenação motora ao etanol (EtOH). Administração prévia de antagonistas do NMDA, (cetamina e (+)MK-801) interferiu com o desenvolvimento da TR ao EtOH. Considerando a influência dos [receptores NMDA e do óxido nítrico] (NO) sobre a aprendizagem e as semelhanças entre [aprendizagem e tolerância], investigou-se a interferência da via do NO no desenvolvimento da tolerância ao EtOH, utilizando o 7-nitroindazol (7-NI). O pré tratamento com 7-NI inibiu a tolerância de forma dependente da dose. O pré-tratamento com L-arginina (L-arg) antes do 7-NI, impediu o bloqueio da TR, o mesmo não foi visto com a D-arginina, indicando que o efeito da L-arg sobre a TR é resultado da inibição da NO sintase. A administração de 7-NI, após ao teste no Dia 1, não afetou a tolerância, sugerindo que o 7-NI interfere com processos que ocorrem durante o teste. A TR ao EtOH, no Dia 2, parece não ser relacionado com um aprendizado dependente de estado, pois a TR foi bloqueada com 7-NI, antes do EtOH, em ambos os dias, mas a injeção de 7-NI só no Dia 2, não interferiu com a TR ao EtOH. Os resultados reforçam a hipótese de que a aprendizagem possa estar relacionada com a TR.

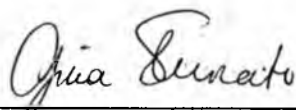
**“INFLUÊNCIA DO RECEPTOR NMDA E DA SÍNTESE DO ÓXIDO
NÍTRICO SOBRE A TOLERÂNCIA RÁPIDA AO ETANOL EM
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TESTE DO ROTA ROD”**

POR

PATRÍCIA SOBIERAJSKI BARRETO

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

Banca Examinadora:



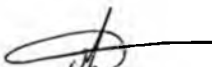
Gina Struffaldi Morato

(FMC/UFSC-Membro-Titular)



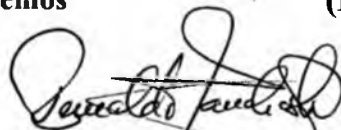
José Roberto Leite

(EPM/UNIFESP)-Membro-Titular)



Tadeu Lemos

(FMC/UFSC)-Membro Titular)



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Farmacologia, em exercício**

Florianópolis, setembro de 1997.

*"Enquanto tem esperança,
o homem conta com um rumo, a
energia para se movimentar, e o
mapa para se orientar. Possui
cem alternativas, mil caminhos e
uma infinidade de sonhos. Com
esperança, ele está na metade do
caminho para onde quer ir; sem
esperança, ele está perdido para
sempre."*

(Leo Buscaglia)

Dedicatória

*Ao meu esposo,
Orlando José Tobias,
pois "Quem sonha um
sonho só, sonha sempre
um sonho só, quem sonha
um sonho a dois, sonha
realidade."*

(Raul Seixas)

Agradecimentos

A *DEUS*, autor da Vida, e que incutiu no ser humano o desejo e a capacidade de construir um mundo melhor

A professora Dra. *Gina Struffaldi Morato*, pela orientação e incentivo durante o mestrado, e por me ensinar a lutar com convicção.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia da UFSC, em especial ao professor Dr. *Tadeu Lemos*, por sua prestimosa atenção e apoio.

Ao professor Dr. *Edelton Flávio Morato*, pela orientação no desenvolvimento da técnica da dosagem alcóolica

Aos funcionários e amigos, pela amizade e pela contribuição, no decorrer do Curso de Pós Graduação, especialmente, aos meus companheiros de caminhada, *Anna Paula, Karina, Rodrigo, Sandro e Solange*.

A meus pais, *Carlos Frederico e Maria Theresinha*, por dispensarem parte da sua existência à minha existência.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro

SUMÁRIO

SUMÁRIO	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELA	x
RESUMO	xii

INTRODUÇÃO

ASPECTOS GERAIS SOBRE O ÁLCOOL E O ALCOOLISMO	1
METABOLISMO DO ETANOL	3
MECANISMOS DE AÇÃO DO ETANOL	6
MECANISMOS GERAIS	6
SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	10
ÓXIDO NÍTRICO	17
MECANISMOS DE TOLERÂNCIA	21
PAPEL DO SISTEMA NMDA E DO ÓXIDO NÍTRICO NA TOLERÂNCIA RÁPIDA. .	27

OBJETIVOS

MATERIAIS E MÉTODOS

EQUIPAMENTO	32
ANIMAIS	33
DROGAS	33
PROCEDIMENTO GERAL	34
TREINAMENTO DOS CAMUNDONGOS	34
TESTE NO APARELHO DO ROTA-ROD	34
DOSAGEM ALCÓOLICA	35
ANÁLISE ESTATÍSTICA	36

EXPERIMENTOS E RESULTADOS.	38
EXPERIMENTO 1: <i>Efeito agudo do etanol sobre a coordenação motora de camundongos.</i>	38
EXPERIMENTO 2: <i>Tentativa de induzir a tolerância rápida em camundongos submetidos ao teste do rota-rod, após a administração de doses únicas de etanol no Dia 1.</i>	41
EXPERIMENTO 3: <i>Indução da tolerância rápida ao etanol com emprego de duas doses, no Dia 1, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.</i>	43
EXPERIMENTO 4: <i>Influência do aumento da dose total de etanol no desenvolvimento da tolerância rápida.</i>	46
EXPERIMENTO 5: <i>Tolerância rápida com diferentes doses adicionais de etanol.</i>	48
EXPERIMENTO 6: <i>Tolerância rápida ao etanol em camundongos machos e fêmeas.</i>	50
EXPERIMENTO 7: <i>Efeito da cetamina sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod.</i>	52
EXPERIMENTO 8: <i>Efeito do (+) MK-801 e (-) MK-801 sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod.</i>	55
EXPERIMENTO 9: <i>Efeito do 7-nitroindazol sobre a tolerância rápida ao etanol.</i>	59
EXPERIMENTO 10: <i>Efeito da administração prévia do L-arginina sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo 7-NI.</i>	63
EXPERIMENTO 11: <i>Efeito da administração prévia da D-arginina sobre a interferência da 7-NI na tolerância rápida ao etanol.</i>	66

EXPERIMENTO 12: <i>Comparação dos efeitos da administração de 7-nitroindazol antes ou após o teste sobre a tolerância rápida ao etanol</i>	68
EXPERIMENTO 13: <i>Influência da administração de 7-NI nos dias 1 e 2, sobre a tolerância rápida.</i>	70
EXPERIMENTO 14: <i>Dosagem de Álcool.</i>	73
DISCUSSÃO	75
CONCLUSÕES	90
ABSTRACT	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE	Aminoácido excitatório
AMPA	α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol proprionato
ASP	Aspartato
BH₄	tetrahidrobiopterina
Ca⁺²	Cálcio
CAM	Calmodulina
CET	Cetamina
CID	Classificação Internacional das Doenças
D.O.	Densidade óptica
D-arg	D-arginina
DA	Dopamina
DSM	Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais
e.p.m.	Erro padrão da média
EtOH	Etanol
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina adenina mononucleotídeo
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
Gln	Glutamina
I.p.	Intraperitoneal
K⁺	Potássio
L-arg	L-arginina

L-NAME	L-nitroarginina-metil-ester
L-N-Arg	L-nitro-arginina
7-NI	7-nitroindazol
MEOS	Sistema microsômico de oxidação do etanol
Mg²	Magnésio
MK-801	dizolcipina
Na⁺	Sódio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Fosfato-dinucleotídeo-adenina-nicotinamida reduzida
NMDA	N-metil-d-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS_e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS_i	Óxido nítrico sintase induzida
NOS_n	Óxido nítrico sintase neuronal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PG	Proteína G
PG_(i)	Proteína G inibitória
PG_(s)	Proteína G estimulatória
PLD	Potenciação de longa duração
r.p.m.	Rotação por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TR	Tolerância rápida

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Modelo esquemático do metabolismo do etanol.	5
Figura 2: Biossíntese do glutamato.	12
Figura 3: Modelo esquemático do receptor NMDA.	15
Figura 4: Biossíntese do óxido nítrico.	18
Figura 5: Modelo esquemático da potenciação de longa duração (LTP) . . .	20
Figura 6: (A,B) Aparelho de rota-rod.	32
Figura 7: Efeito agudo do etanol sobre a coordenação motora de camundongos, em vários intervalos de tempo.	40
Figura 8: Efeito agudo do etanol sobre a coordenação motora de camundongos aos 5' (rpm).	40
Figura 9: Tentativa de induzir a tolerância rápida em camundongos submetidos ao teste do rota-rod sob ação de doses únicas de etanol no Dia 1.	42
Figura 10: Desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol com emprego de duas doses de etanol, no Dia 1.	45
Figura 11: Comparação do desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol com a dose de 3,0 e 4,0 g/kg.	47
Figura 12: Efeito de diferentes doses adicionais de etanol no desenvolvimento da tolerância rápida.	49
Figura 13: Efeito da variável sexo no fenômeno de desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.	51

Figura 14: Efeito da cetamina no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol	54
Figura 15: Curva dose-resposta do efeito das diferentes doses de cetamina sobre a tolerância rápida ao etanol	55
Figura 16: Efeito do tratamento com isômeros do MK-801 na tolerância rápida ao etanol	58
Figura 17: Curva dose-resposta do efeito de diferentes doses de MK-801 sobre a tolerância rápida ao etanol	59
Figura 18: Efeito do 7-nitroindazol sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol	62
Figura 19: Curva dose-resposta do efeito de 7-nitroindazol para diferentes doses sobre a tolerância rápida ao etanol	63
Figura 20: Efeito da administração prévia da L-arginina sobre a interferência da 7-NI na tolerância rápida ao etanol	65
Figura 21: Efeito da administração prévia da D-arginina sobre a interferência da 7-NI na tolerância rápida ao etanol	67
Figura 22: Comparação dos efeitos da administração de 7-nitroindazol antes ou após o teste sobre a tolerância rápida ao etanol	70
Figura 23: Influência da administração de 7-NI nos dias 1 e/ou 2, sobre a tolerância rápida	73
Tabela 1: Dosagem de Alcól	74

RESUMO

O fenômeno da tolerância pode ser definido como um processo adaptativo do organismo, onde os efeitos de uma droga diminuem após um período em que ela é administrada repetidamente. A tolerância rápida aos efeitos de uma segunda dose de etanol é observada, cerca de 8-24 hs, após desaparecerem os efeitos da primeira dose e é capaz de predizer características importantes da tolerância crônica, evitando o tratamento prolongado. Vários estudos têm demonstrado que drogas antagonistas do receptor NMDA, que prejudicam a aprendizagem, bloqueiam o desenvolvimento da tolerância rápida e crônica.

Neste trabalho estudou-se a tolerância rápida em camundongos suíços fêmeas. Os animais foram submetidos a um treinamento diário, durante cinco dias, no aparelho de rota-rod, até que atingissem linha de base estável. Nos testes, primeiramente, era feito o registro da medida basal, que consistia em avaliar em que velocidade o animal caía do eixo giratório.

Inicialmente, caracterizou-se o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora ao etanol, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod, utilizando a dose de 1,75 + 1,25 g/kg de etanol, no Dia 1 de experimento. O antagonismo da tolerância foi avaliado através da administração prévia de antagonistas do receptor NMDA, a cetamina (1,0 à 5,0 mg/kg) e o (+)MK-801, (0,015 à 0,060 mg/kg), o bloqueio da tolerância rápida pela cetamina e (+)MK-801 foi dependente da dose. Além disso, o bloqueio parece ser específico, uma vez que foi obtido com (+) MK-801, mas não pelo isômero (-) MK-801.

Considerando a influência dos receptores NMDA e do óxido nítrico sobre a aprendizagem e as numerosas semelhanças entre aprendizagem e tolerância, investigou-se a possível interferência da via do óxido nítrico no desenvolvimento

da tolerância ao etanol, utilizando o 7-nitroindazol (7-NI), bloqueador específico da óxido nítrico sintase neuronal. O pré tratamento com 7-NI (5,0 à 25,0 mg/kg) inibiu a tolerância de forma dependente da dose. O pré-tratamento com L-arginina antes do 7-NI, impediu o bloqueio da tolerância rápida ao etanol. Tal efeito não foi obtido com a D-arginina, indicando que o efeito da L-arginina sobre a tolerância é resultado da inibição da óxido nítrico sintase. Por outro lado a administração de 7-NI, posteriormente ao teste no Dia 1, não afetou a tolerância, sugerindo que a droga interfere com processos que ocorrem durante a execução do teste. O desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no Dia 2, parece não ser relacionado com um aprendizado dependente de estado, pois a tolerância foi bloqueada com a administração de 7-NI, antes do etanol, em ambos os dias, mas a injeção de 7-NI apenas no Dia 2, não interferiu no desenvolvimento da tolerância ao etanol.

Os resultados demonstram que os antagonistas do receptor NMDA como a cetamina e a dizolcipina (MK-801), e inibidores da óxido nítrico sintase neuronal, como o 7-NI, bloqueiam o desenvolvimento da tolerância aos efeitos do etanol, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. Uma vez que esses sistemas estão envolvidos com a aprendizagem, os resultados do presente estudo reforçam a hipótese de que a aprendizagem possa estar relacionada com o desenvolvimento da tolerância rápida.

INTRODUÇÃO

ASPECTOS GERAIS SOBRE ÁLCOOL E ALCOOLISMO

O etanol, álcool etílico ou simplesmente álcool*, é uma molécula orgânica pequena presente em bebidas alcólicas. Essa molécula é uma droga psicotrópica, que devido as características de fornecer energia e reduzir o apetite, aliadas ao baixo custo, torna-se uma droga bem mais atraente do que as demais. O álcool possui propriedades lipossolúvel e hidrossolúvel, podendo distribuir-se amplamente pelo organismo, por isso pode causar, após o uso prolongado, uma série de efeitos prejudiciais à saúde do ser humano.

Desde que a humanidade faz uso de bebidas alcólicas, os efeitos prejudiciais do etanol sobre o organismo humano têm sido alvo do interesse de pesquisadores. O uso freqüente de doses elevadas de etanol interfere em várias funções orgânicas, sendo associado a altas taxas de câncer (principalmente no esôfago e estômago), úlceras, hepatite, cirrose, entre outras e funções comportamentais como prejuízo nos relacionamentos com a família e o trabalho (Schuckit, 1985). Após ingestão aguda, o etanol também causa uma grande variedade de efeitos relacionados com os sistemas sensorial, motor, endócrino, cardiovascular, gastrintestinal, sendo a incoordenação motora um dos efeitos mais evidentes dessa droga.

* o termo alcool ou etanol serão usados indistintamente neste estudo

Muitas sociedades toleram o consumo de álcool de maneira moderada, mas seu uso excessivo é considerado um risco à própria saúde e segurança pública (Penã-Alfaro, 1993). O maior problema decorrente do uso das bebidas alcóolicas é a dependência do álcool ou alcoolismo, relacionado com o uso prolongado. Já em 1849, o médico sueco Magnus Huss postulou clinicamente que a “alta ingestão de álcool provocava doenças físicas e mentais”. Por outro lado, têm se observado que, com o passar do tempo, o organismo humano torna-se menos sensível aos efeitos do álcool, e o estudo dessas adaptações é fundamental para a compreensão do alcoolismo (Bertolote, 1991). O alcoolismo tem sido um dos grandes problemas mundiais, em saúde pública, e uma das maiores causas de morte clínica em muitos países (Williams *et al.*, 1992).

O conceito de alcoolismo, nos dois últimos séculos, tem se modificado, apresentando variações que vão desde interpretações religiosas até propostas bioquímico-genéticas. Além das alterações conceituais, a classificação de alcoolismo, como doença sofreu modificações ao longo do tempo. A Classificação Internacional de Doenças (CID) da Organização Mundial de Saúde (OMS), publicada periodicamente, já classificou o termo alcoolismo de várias formas. O conceito de dependência ao álcool apareceu pela primeira vez na CID-9, em 1977. A CID-10, (1993) reuniu todas as substâncias psicoativas na mesma categoria, inclusive o álcool (Ramos e Bertolote, 1997). Atualmente, de acordo com o DSM-IV - Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais (IV versão) e conforme a CID-10, para a

determinação da dependência a uma substância, é necessário o agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos, indicando que o indivíduo continua utilizando determinada substância, apesar dos problemas causados pelo seu uso.

O termo alcoolismo tem sido, gradativamente, substituído por síndrome de dependência do álcool ou eventos associados ao consumo de álcool. O alcoolismo não deixou de ser considerado uma doença, mas os problemas relacionados ao consumo de álcool, ampliaram o conceito de alcoolismo, colocando-o numa perspectiva histórico-social. Assim, quando o tema é investigado pelas ciências sociais e comportamentais, o fenômeno passa a ser visto como tendo uma natureza multifacetada (Bertolote, 1992).

METABOLISMO DO ETANOL

O metabolismo do etanol possui um papel importante no consumo de álcool e seus efeitos adversos. A capacidade individual de metabolizar o etanol pode determinar a duração dos efeitos do álcool sobre o cérebro e outras regiões do corpo (Tabakoff *et al.*, 1986). É possível, desta forma, correlacionar o metabolismo com os prejuízos nos processos motores causados pelo etanol, tanto no homem como em animais.

Após ser ingerido, o etanol é rapidamente absorvido, sendo que cerca de 90% de etanol sofre metabolização no corpo e cerca de 5 a 10% é

excretado, sem sofrer modificações, através do ar expirado e da urina. O estômago absorve uma considerável quantidade de etanol e uma fração substancial é removida do sangue por metabolismo hepático de primeira passagem. A biotransformação do etanol ocorre principalmente no fígado, onde pode sofrer a ação de três diferentes enzimas: a álcool desidrogenase, as enzimas do sistema microssômico de oxidação do etanol (MEOS) e a catalase. Essas enzimas estão localizadas, preferencialmente, em diferentes compartimentos subcelulares. A álcool desidrogenase encontra-se principalmente, no citosol. O sistema microssômico de oxidação localiza-se no retículo endoplasmático rugoso e a catalase nos peroxissomos (Chambers, 1990; Tabakoff *et al.*, 1996).

A maior parcela de etanol, cerca de 75 %, é metabolizada através da ação da enzima álcool desidrogenase, que oxida o etanol a acetaldeído, usando NAD^+ como cofator, pela redução do NAD^+ em NADH (Tabakoff *et al.*, 1996). Sendo que quase todo o acetaldeído produzido é convertido no fígado (Figura 1). A oxidação do etanol ocorre em taxas limitadas e independe da concentração de etanol presente no fígado, ou seja, a taxa de metabolização depende mais da disponibilidade de NAD^+ do que da saturação enzimática (Lieber, 1991; Tabakoff *et al.*, 1996). As duas moléculas de NADH formadas nesta reação doam, no fim, os seus equivalentes redutores à cadeia respiratória mitocondrial. O acetato formado a partir do etanol, é então ativado no fígado pela acil-CoA sintetase de cadeia curta para formar acetil-CoA, a qual é oxidada no ciclo do ácido cítrico.

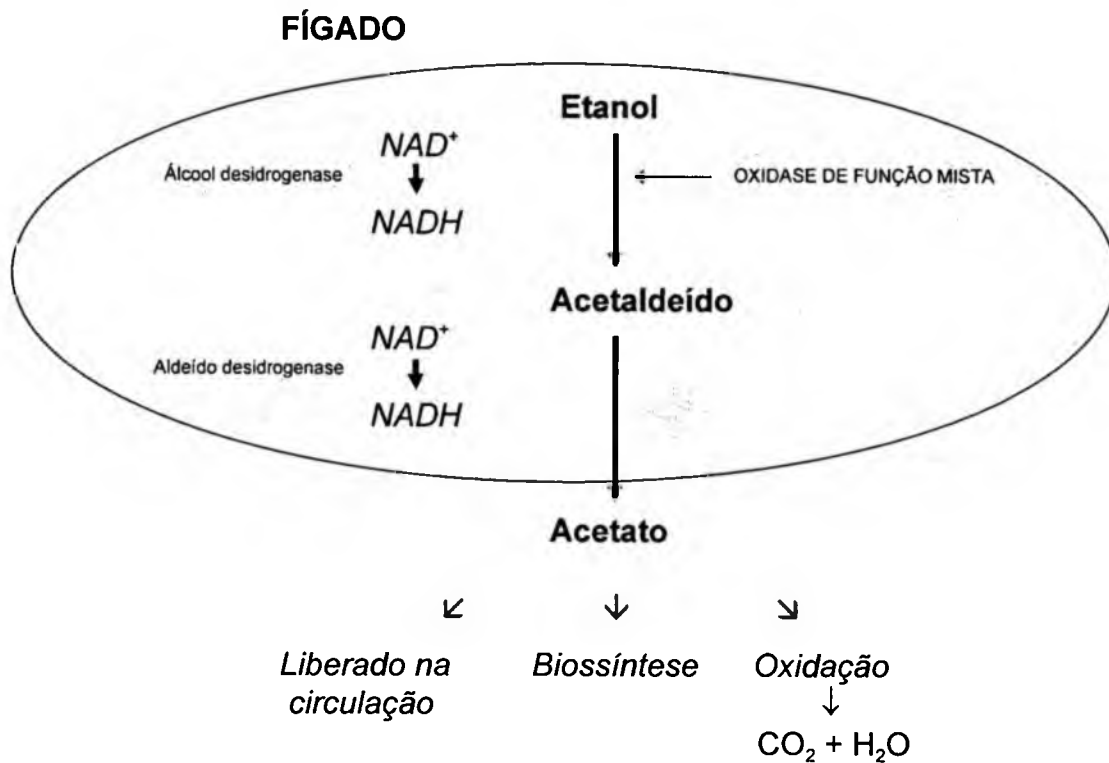


Figura 1. Esquema da metabolização do etanol. O etanol é metabolizado principalmente no fígado. Cerca de 75% de etanol é metabolizado através da ação da enzima álcool desidrogenase, que oxida o etanol a acetaldeído, usando NAD^+ como cofator, através da redução do NAD^+ em NADH . Sendo que quase todo o acetaldeído produzido é convertido em acetato pela aldeído-desidrogenase. Parte do etanol (cerca de 25%) é metabolizada pelo sistema microssômico de oxidação do etanol. O acetato formado a partir do etanol pode seguir vários caminhos metabólicos.

O álcool possui desvantagens como fonte de energia ou alimento. Produz cerca de 7,1 kcal/g quando oxidado, e sua energia é biologicamente disponível na forma de ATP, através de vias metabólicas bem conhecidas. As calorias produzidas além da necessidade calórica diária, são convertidas em gordura via acetil-CoA. O etanol não é convertido em glicose ou glicogênio no organismo, por outro lado, o consumo agudo de etanol pode

induzir à hipoglicemia, pela inibição da neoglicogênese a partir do lactato e aminoácidos (Huttunen e Kortelaine, 1988; 1990).

Secundariamente, ocorre a oxidação dos 25% restante de etanol pelo sistema microssômico de oxidação do etanol. Este sistema contém o citocromo P450 IIE1, e requer como cofatores o NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleotideo-fosfato) e o oxigênio molecular (Tabakoff *et al.*, 1996). A contribuição deste sistema de oxidação é muito maior, após o consumo crônico de álcool, ou de outras drogas devido o fenômeno de indução. A terceira enzima do sistema de metabolismo do etanol é a catalase, enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. No tecido intacto, a catalase aparentemente não desempenha um papel muito significativo, no metabolismo do etanol (Chambers, 1990) e parece atuar somente na presença de altas concentrações de etanol. O papel da catalase, na metabolização do álcool, ainda não está bem evidenciado (Tabakoff *et al.*, 1996).

MECANISMOS DE AÇÃO DO ETANOL

MECANISMOS GERAIS

O etanol é uma droga capaz de afetar todas as células do organismo e os seus principais efeitos ocorrem dentro do sistema nervoso central. Por isso, um grande número de pesquisas tem sido feito, a fim de elucidar melhor os possíveis mecanismos de ação do álcool. Uma das hipóteses, é que o

álcool produz uma perturbação nos lipídeos, dentro da membrana celular, tornando-a mais fluida e com isso, alterando a permeabilidade das membranas neuronais (Hunt e Maychrowicz 1985; Tabakoff e Hoffmam, 1983; Seemam, 1972). Entretanto, o mais provável é que as ações do etanol dependam, basicamente, de seus efeitos sobre os canais iônicos e os receptores de membrana (Leslie *et al.*, 1990).

Em nível de segundos mensageiros verifica-se que a administração aguda do etanol, altera a regulação da atividade da adenilato ciclase pela ação da proteína G inibitória (Gi). Já, a exposição crônica ao etanol pode resultar em uma modificação na estrutura da proteína G estimulatória (Gs) ou alterar as interações entre as subunidades da proteína G, interferindo na estimulação da atividade da adenilato ciclase e, conseqüentemente na produção de AMPc, dentro do desenvolvimento da tolerância ao etanol (Tabakoff *et al.*, 1996).

Existem evidências de que o etanol pode causar alterações na função neuronal, por inibição dos canais de cálcio (Harris e Hood, 1980), alterando a função dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Leslie *et al.*, 1983) ou operados por receptores (Randoll *et al.*, 1996). A perturbação da transmissão sináptica, associada com a inibição dos canais de cálcio, pode contribuir para os efeitos agudos da intoxicação por etanol e a exposição crônica ao etanol faz com que ocorra uma resposta adaptativa dos canais de cálcio em várias regiões do cérebro (Leslie *et al.*, 1990).

Vários neurotransmissores estão envolvidos com os efeitos do etanol no SNC, entre eles, a acetilcolina (Erikson e Graham, 1973), a serotonina (Tabakoff *et al.*, 1977), a, dopamina (Kiianmaa e Tabakoff, 1993) e noradrenalina (Shefiner e Tabokoff, 1985). Em 1975, Frankel *et al.*, apresentaram a primeira evidência de que os neurotransmissores serotoninérgicos estariam envolvidos com a tolerância aos efeitos do etanol, utilizando para-cloro-fenilalanina, inibidor da síntese de serotonina. Substâncias precursoras de serotonina, como 5-hidroxitriptofano e triptofano são capazes de reduzir o consumo de etanol em humanos e animais de laboratório. Um estudo com lesão de células serotoninérgicas resultou num aumento do consumo de etanol em linhagem de ratos que não possuíam preferência por etanol (Ferreira e Soares da Silva, 1991). Khanna *et al.*, (1987; 1994b) demonstraram que a serotonina esta envolvida com o desenvolvimento da tolerância ao etanol e com a tolerância cruzada entre o etanol e outras drogas hipnótico-sedativas.

Em virtude da implicação do sistema colinérgico com a cognição e a memória, vários estudos foram realizados, buscando comprovar o envolvimento da acetilcolina nos prejuízos cognitivos, induzidos pelo etanol (Drachman, 1977; Hoffman *et al.*, 1986). A administração de etanol, cronicamente provoca perda da memória e prejuízo cognitivo no homem (Lishmam, 1990), bem como distúrbios nos processos de memória em vários modelos animais (Hodges *et al.*, 1991).

O envolvimento da noradrenalina no alcoolismo, tem sido bem estudado e existem trabalhos sugerindo que o sistema noradrenérgico possa estar relacionado com a auto-administração de etanol e outras drogas (Brown e Amit, 1977). Lesões neuroquímicas, de neurônios noradrenérgicos ou inibição da síntese de noradrenalina resultam na supressão do consumo voluntário de etanol. A ingestão crônica de etanol, geralmente, resulta em um aumento dos níveis de noradrenalina no cérebro durante o tempo em que o animal está intoxicado que permanece até vinte quatro horas após a dissipação do efeito do etanol (Hoffmam e Tabakoff, 1985).

O sistema dopaminérgico central está relacionado com o potencial de abuso das drogas no cérebro, principalmente os neurônios dopaminérgicos mesolímbicos, envolvidos numa das vias de recompensa, atuando como um reforço positivo. O etanol, como outras drogas capazes de produzir dependência, aumenta a liberação de dopamina no núcleo accumbens. Numerosos estudos evidenciam que o álcool atua como um reforçador das ações centrais, aumentando a auto-administração de etanol, em ratos, que preferem o consumo de etanol (Nevo e Hamon, 1995). Em 1974, Seeman e Lee demonstraram que o aumento da concentrações de etanol poderia liberar dopamina dentro do corpo estriado, embora a diminuição ou moderação da concentração de etanol não causasse esse efeito. Estudos comprovaram um aumento da ações da dopamina e da sua liberação no núcleo accumbens, durante a síndrome de abstinência do álcool (Imperato e Di Chiara, 1986).

A partir da década de 80, muitos estudos foram realizados com o objetivo de elucidar o papel dos aminoácidos neurotransmissores cerebrais com relação aos efeitos do etanol sobre os esses aminoácidos, a maior parte dos estudos concentrou-se nas ações sobre o sistema do ácido γ -aminobutírico (GABA) e sobre o sistema glutamatérgico (principalmente envolvendo o receptor n-metil-d-aspartato (NMDA) (Nevo e Hamon, 1995). Há evidências de que o etanol bloqueia o receptor NMDA, em concentrações entre 5 e 30 mM (Deutsch *et al.*, 1991), e potencializa as ações do GABA em concentrações acima de 50 mM (Tabakoff e Hoffmam, 1996).

O GABA é o neurotransmissor inibitório mais abundante no cérebro e seu efeito é mediado, principalmente, por receptores GABA_A, que estão acoplados diretamente aos canais de ânions (Tabakoff *et al.*, 1996). Esses receptores possuem sítios de ação para drogas sedativas, anestésicas e ansiolíticas, como barbitúricos e benzodiazepínicos. Segundo alguns autores, o efeito do etanol sobre esse tipo de receptor pode contribuir para sua ação ansiolítica e sedativa (Allan e Harris, 1987; Allan *et al.*, 1991).

SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

Curtis *et al* (1959) foram os primeiros a verificar o efeito excitatório causado pelo glutamato e pelo aspartato sobre os neurônios. Esses aminoácidos excitatórios (AAE) foram considerados neurotransmissores do SNC, há menos de duas décadas (Moraghan *et al.*, 1989).

O glutamato está distribuído, de forma ampla e uniforme, pelo sistema nervoso central (SNC) e é incapaz de transpor a barreira hematoencefálica, sendo liberado por neurônios piramidais, no córtex cerebral e em várias áreas do hipocampo (Tsai *et al.*, 1995). As ações do glutamato são mediadas por receptores pós-sinápticos. Esse neurotransmissor é capaz de promover uma alteração conformacional de um canal iônico da membrana pós-sináptica, tornando-o mais permeável aos cátions, promovendo a despolarização da membrana e, conseqüentemente, aumentando a probabilidade de células pós-sinápticas deflagrarem seu potencial de ação. daí o fato das vias glutamatérgicas estarem envolvidas em processos e distúrbios diversos como epilepsia, isquemia cerebral, aprendizado e memória; além de interferir no desenvolvimento das sinapses normais no cérebro (Karcz-Kubicha e Liljequist, 1995).

As principais fontes de glutamato e aspartato são os intermediários do ciclo de Krebs, embora o glutamina (Gln) também sirva de fonte. O glutamato é sintetizado a partir da glicose e outros precursores. As enzimas responsáveis pela síntese e pelo metabolismo do glutamato são encontradas tanto nos neurônios quanto nas células da glia. O glutamato é armazenado em vesículas sinápticas e parte do neurotransmissor, liberado por exocitose calcio-dependente na fenda sináptica, é recaptado através da membrana pré-sináptica (Figura 2). Tanto nos neurônios quanto nas células gliais a captação de glutamato é dependente de sódio, processo que pode ser

inibido por substâncias que alterem o gradiente eletroquímico (Nevo e Hamon, 1995; Dingledine e McBain, 1993).

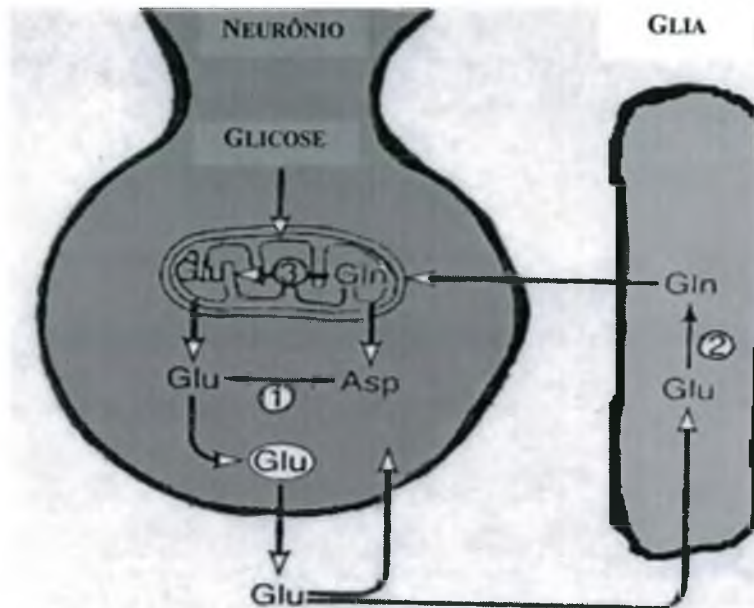


Figura 2. Biossíntese do glutamato. O glutamato é sintetizado a partir da glicose e outros precursores. As enzimas responsáveis pela síntese e pelo metabolismo do glutamato são encontradas tanto no neurônio quanto nas células da Glia. O glutamato é armazenado em vesículas sinápticas. Uma vez liberado na fenda sináptica, parte é recaptado através da membrana pré-sináptica e parte vai atuar em neurônios pós sinápticos. A captação de glutamato nos neurônios e nas células gliais é dependente de sódio.

A principal evidência da ação neurotransmissora do glutamato provem da observação de que, em pequenas concentrações, ele excita a maioria das células do SNC. Estudos fisiológicos revelaram que a interação do glutamato com seus receptores é bastante complexa, devido a existência de inúmeros subtipos de receptores glutamatérgicos no SNC, com a mesma densidade pós-sináptica. Esses subtipos possuem uma localização estrutural próxima, sugerindo que é possível resultar em ativação simultânea desses receptores (Deutsch *et al.*, 1991).

De acordo com o mecanismo de transdução, os receptores glutamatérgicos estão classificados em duas grandes famílias: os receptores ionotrópicos e os receptores metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos pertencem à família dos receptores acoplados a canais iônicos e os metabotrópicos estão acoplados a proteína G, que atua através de segundos mensageiros (Farooqui e Horrocks, 1991). Dentre os receptores ionotrópicos do glutamato estão os subtipos: NMDA, AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isodipropionato) e o Cainato (Alexander e Peters, 1997).

O receptor NMDA, o mais estudado, de todos os receptores glutamatérgicos, e está acoplado a um canal iônico de membrana, que é permeável aos íons Na^+ , K^+ e ao Ca^{+2} , sendo um dos receptores para neurotransmissão regulado por maior número de ligantes. A condutância de cálcio pelo canal é dez vezes maior do que para o sódio (Mayer e Westbrook, 1987). A ativação do receptor NMDA é caracterizada eletrofisiologicamente, pelo aumento de cálcio intracelular (Daniell, 1991). Este canal constitui-se numa formação heteromérica, dividindo-se em duas classes de subunidades de receptor, a subunidade NMDAR1 (amplamente distribuída no SNC) e a subunidade NMDAR2 (restritamente distribuída, que é subdividida em: NMDAR2_A, NMDAR2_B, NMDAR2_C e NMDAR2_D). Essa formação determina as características fisiológicas e farmacológicas dos receptores (Sucher *et al.*, 1996). A subunidade NMDAR2_B, tem sido relacionada à propriedade do etanol em inibir o receptor NMDA. Utiliza-se o agente farmacológico *ifenprodil*

para identificar os neurônios que contenham essa subunidade do receptor NMDA, sensível ao etanol (Yang *et al.*, 1996).

O complexo receptor NMDA é um receptor inotrópico, e é controlado por vários sítios regulatórios, entre eles: um sítio de reconhecimento para o glutamato; um sítio modulatório para glicina; um sítio para cada cátion divalente (magnésio e zinco); um sítio para modulação do canal pelas poliaminas e outro para os antagonistas do receptor NMDA, como a fenciclidina, cetamina ou o MK-801 (Tsai *et al.*, 1995, Morato e Khanna, 1996) e ainda um sítio sensível ao óxido nítrico, também, tem sido descrito, mas sua função gera controvérsias (Recasesns, 1995). Parece existir também no receptor regiões pH-sensíveis que podem resultar em uma interação com o ion hidrogênio (Morato e Khanna, 1996).

Ascher *et al.*, 1987, demonstraram várias propriedades do receptor NMDA, entre elas, a alta permeabilidade ao cálcio e o bloqueio pelo magnésio, quando o neurônio está polarizado. Este bloqueio desaparece, quando ocorre despolarização do neurônio. A abertura do canal requer glicina, além do glutamato, e por isso a glicina tem sido considerada como um co-agonista do receptor NMDA (Kleckner e Digledine, 1988), ou seja, quem ativa o receptor NMDA é o glutamato, mas para isso é preciso a presença da glicina. Alguns pesquisadores têm sugerido que o etanol pode atuar no sítio de ligação da glicina (Woodward e Gonzales, 1994) e, desta forma, inibir a função do receptor NMDA. A abertura do canal pode ser

impedida pela utilização de bloqueadores seletivos dos canais operados pelo receptor NMDA, como fenciclidina (PCP), cetamina e dizocilpina (Leslie, 1994). Esse bloqueio impede o influxo de cálcio para o interior do neurônio (Figura 3).

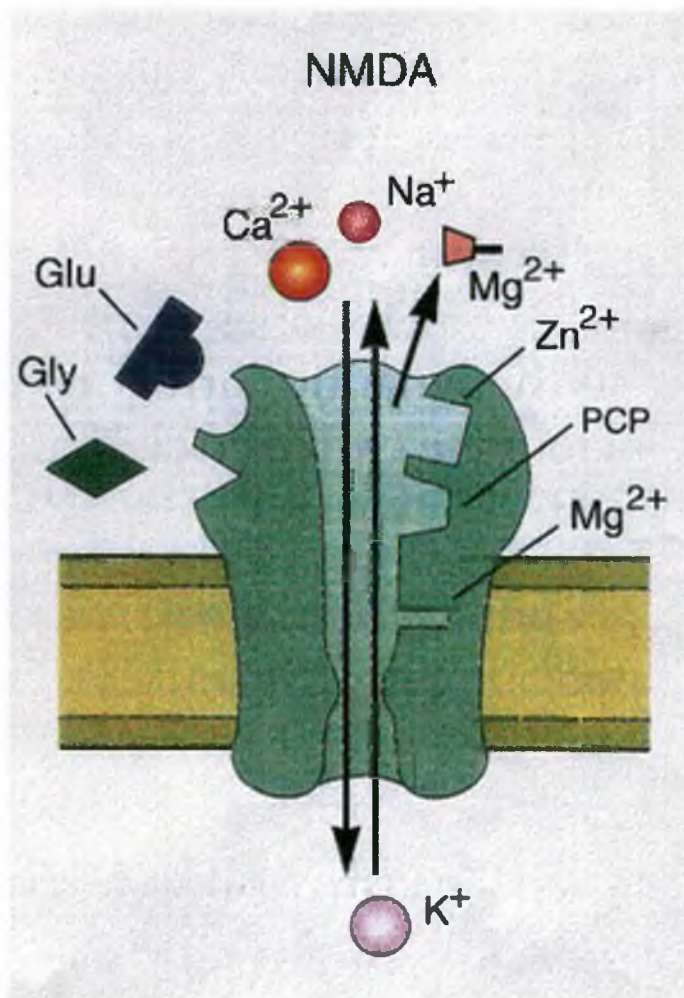


Figura 3. Modelo esquemático do receptor NMDA, com alguns dos seus sítios de ação: O receptor NMDA possui um canal iônico sensível aos íons cálcio (Ca^{2+}), sódio (Na^+) e potássio (K^+), e sítios para o glutamato ou o NMDA, um sítio para a glicina, um para o magnésio (Mg^{2+}), e um sítio para os antagonistas não competitivos do receptor NMDA como o MK-801 e a cetamina (adaptada de Kandel, 1994).

A concentração de Mg^{+2} , no meio extracelular do cérebro, é suficiente para abolir o fluxo iônico no receptor, mesmo na presença de glutamato e glicina. Assim, embora o glutamato esteja ligado ao sítio receptor do canal ativado, a entrada de Mg^{+2} no poro do canal bloqueia a movimentação de íons monovalentes através do mesmo. Com o potencial menos negativo, a afinidade do Mg^{+2} por seu sítio diminui e o bloqueio é inefetivo (Dingledine e McBain, 1993). A alta permeabilidade dos receptores NMDA a cátions bivalentes tem muitas implicações, na função celular, como a potenciação de longa duração (PLD) que é considerado a base celular da memória (Zalutsky e Nicoll, 1990).

Um estudo, realizado por Randoll *et al* (1996), demonstrou que a estimulação por NMDA, em quatro diferentes regiões do cérebro, causa um aumento do influxo de cálcio similar em todas as regiões, mas a sensibilidade à inibição pelo etanol é diferente em cada região. A região mais sensível foi o hipocampo que foi inibido por baixas concentrações de etanol (20 mM). As regiões cerebelar e cortical só foram inibidas com aumento das concentrações de etanol (>80 mM) e o tronco cerebral não exibiu resposta significativa ao etanol.

Vários estudos têm demonstrado o efeito do etanol sobre o complexo receptor NMDA (Grany *et al.*, 1990). O etanol inibe o influxo de cálcio mediado pelo NMDA, nos neurônios hipocámpais *in vivo*, (Lovinger *et al.*, 1989) e *in vitro* (Dildy-Mayfield e Leslie, 1989). O receptor NMDA está

envolvido nos processos de memória e aprendizagem (Clugnet e LeDoux, 1990). O envolvimento específico do receptor NMDA nesses processos é confirmado pelo fato que antagonistas deste receptor prejudicam a aprendizagem e a memória, em modelos experimentais com roedores (Venable e Kelly, 1990; Estall *et al.*, 1993) e isso ocorre pelo mecanismo de indução da potenciação de longa duração (PLD), que é considerado como fundamental para formação da memória (Izquierdo, 1991).

As demais classes de receptores glutamatérgicos não serão apresentadas com detalhes no presente estudo, mas informações adicionais podem ser obtida em trabalhos da literatura (Farroqui e Horrocks, 1991; Alexander e Peters, 1997; Sucher *et al.*, 1996; Barnard, 1997; Karcz-Kubicha e Liljequist, 1995).

ÓXIDO NÍTRICO

A descoberta do papel do óxido nítrico (NO) como mensageiro neuronal no final da década de 1980 tem atraído o interesse de vários pesquisadores, por ser um gás de pequeno tamanho, lipossolúvel, instável e se encontrar amplamente distribuído pelos tecidos do SNC e periférico (Hökfelt *et al.*, 1994; Paakkari e Lindsberg, 1995; Moore, 1996; Moncada *et al.*, 1991; Moncada, 1994). Nos tecidos o óxido nítrico é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina e do oxigênio molecular pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS), e requer ainda fosfato-dinucleotídeo-adenina-nicotinamida reduzida (NADPH), e os cofatores tetrahydrobiopterina (BH₄),

flavina adenina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), grupamento Heme e a presença da calmodulina (Figura 4) (Knowles e Moncada, 1994; Kwon *et al.*, 1990; Leone *et al.*, 1991).

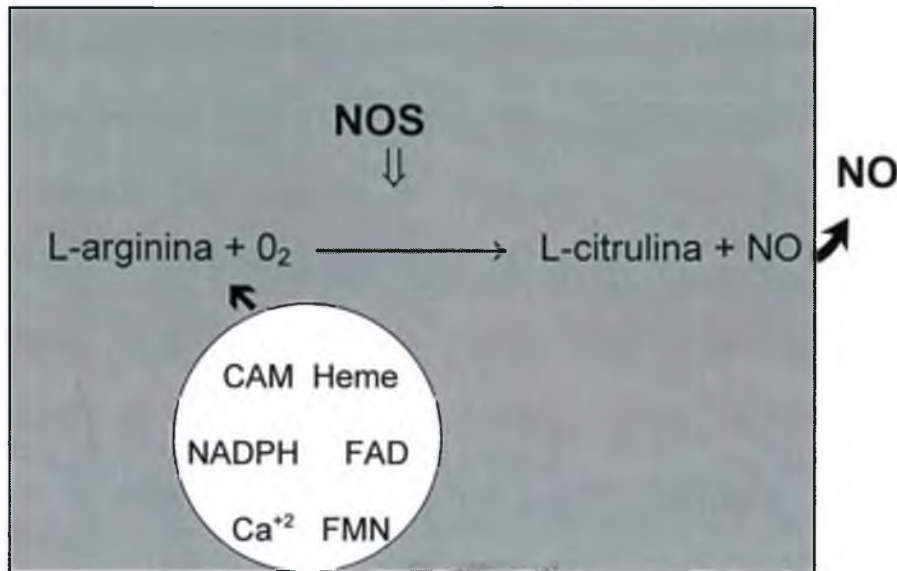


Figura 4: Biossíntese do óxido nítrico. O óxido nítrico (NO) é formado a partir do substrato L-arginina e pelo oxigênio molecular, utilizando como cofatores NADPH, BH₄, FMN, FAD, CaM e grupamento Heme, e pela ação da enzima NOS, o óxido nítrico formado vai atuar em outras regiões. (Figura adaptada de Moore, 1997)

A sintase do óxido nítrico já foi clonada e purificada e verificou-se a existência de três tipos de isoformas estruturalmente distintas, a neuronal (NOS_n), endotelial (NOS_e) e a induzida (NOS_i). Essa descoberta permitiu novas pesquisas sobre os inibidores seletivos para essas isoformas (Moore, 1996; Knowles e Moncada 1994). São denominadas de isoformas constitutivas as enzimas NOS_n e NOS_e, cujas funções são predominantemente fisiológicas, como: modificação da percepção da dor, mediação na PLD e memória, ingestão de líquidos e alimentos, inibição

plaquetária, relaxamento da musculatura lisa, entre outras. A isoforma induzida (NOSi), como o próprio nome sugere está associada a situações patofisiológicas, como respostas defensivas do organismo a doenças e infecções (Morley e Flood, 1991; Squadrito *et al.*, 1993; Calapai *et al.*, 1996).

As isoformas diferem entre si pelo número de aminoácidos da cadeia, e possuem em comum alguns sítios de ligação, entre eles, dois sítios para NADPH, dois sítios para FAD, um sítio para FNM e um sítio para calmodulina. A primeira enzima clonada e purificada em ratos foi a NOSn. Essa enzima é dependente de cálcio-calmodulina, produz baixos níveis de NO, depois da estimulação mediada por cálcio e possui alta atividade no cérebro; Paakkari e Lindsberg, 1995). A NOSn está presente no SNC, em neurônios específicos no cerebelo, hipocampo e lobos olfatórios e em nervos não-adrenérgicos e não colinérgicos (NANC).

O NO pode ser produzido em locais pós-sinápticos em resposta à ativação de receptores de aminoácidos excitatórios como os receptores NMDA (Paakkari e Lindsberg, 1995; Moore, 1996). Muitas evidências têm sugerido que o NO liberado no neurônio pós-sináptico participa da PLD, atuando como mensageiro retrógrado no neurônio pré-sináptico e proporcionando a liberação do neurotransmissor glutamato. O glutamato liberado na fenda sináptica despolariza a membrana pós-sináptica e esta despolarização é capaz de desfazer o bloqueio exercido por íons magnésio

sobre os receptores NMDA, permitindo assim a entrada de cálcio no meio intracelular (Figura 5) (Paakkari e Lindsberg, 1995; Hölscher, 1997a;1997b).

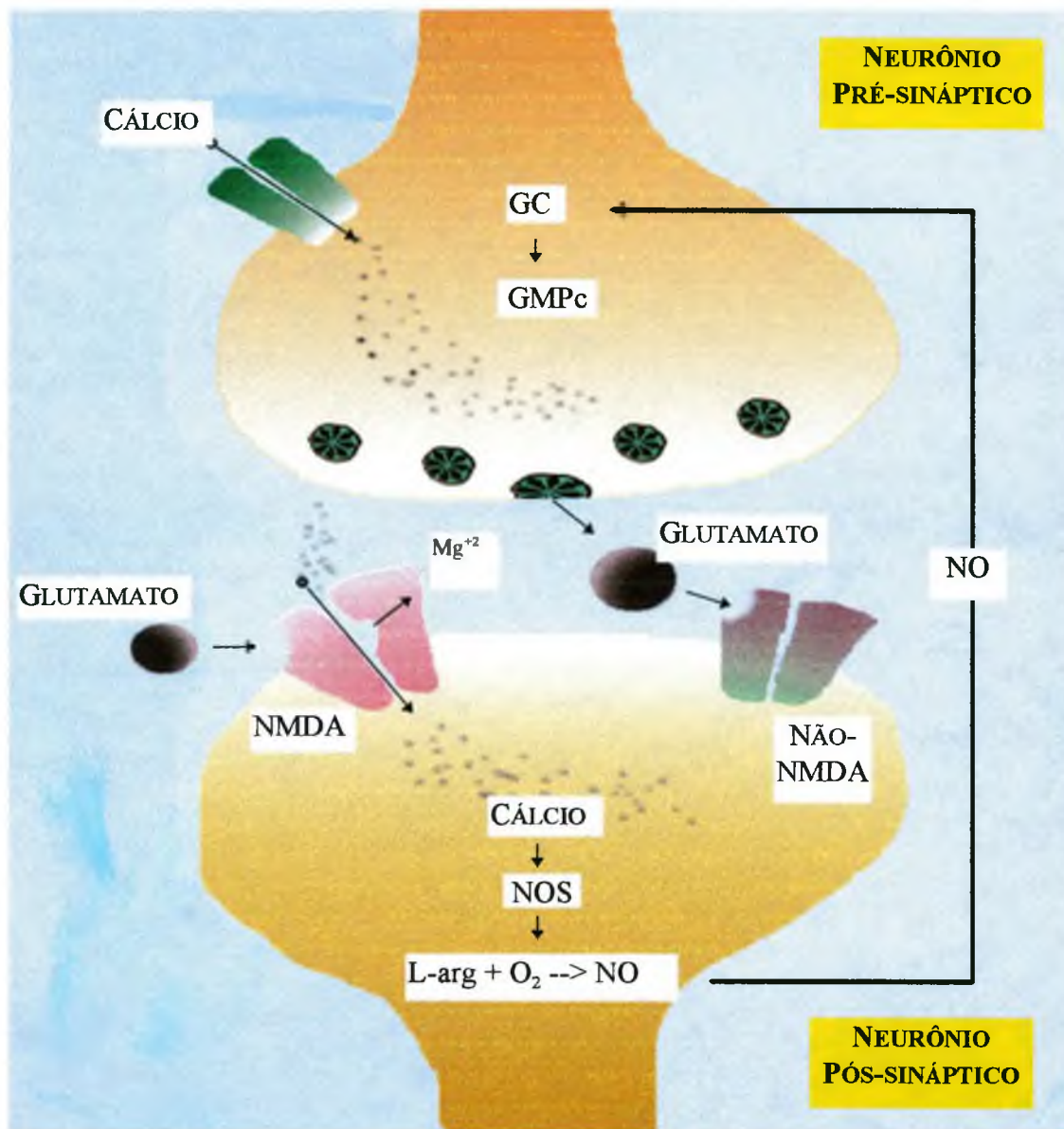


Figura 5: A potenciação de longa duração (PLD). A membrana pós-sináptica é despolarizada através da ação de receptores do tipo não-NMDA. Essa despolarização libera o bloqueio exercido pelo magnésio sobre os receptores NMDA, permitindo a entrada de cálcio para o interior da membrana pós-sináptica. O cálcio estimula as quinases cálcio-dependentes levando à indução de PLD. O neurônio pós-sináptico libera o NO, que atua como mensageiro retrógrado no neurônio pré-sináptico aumentando a liberação do neurotransmissor glutamato.

A PLD pode ser bloqueada por aplicações extracelulares de inibidores de NOS_n, utilizando-se drogas capazes de reduzir ou prevenir os efeitos biológicos do óxido nítrico, bloqueando a sua formação (Moore *et al.*, 1993). Existem diversas formas dos inibidores da sintase do óxido nítrico atuarem, entre elas, inibindo a entrada de L-arginina para o interior da célula, inibindo a biossíntese do BH₄, reduzindo a concentração de cofatores, seqüestrando o cálcio, ou ainda inibindo a atividade enzimática das NOS (Moore e Handy, 1997). Estudos, utilizando a L-nitroarginina-metil-ester (L-NAME) e L-nitro-arginina (L-N-arg), inibidores de NOS antes do treino dos animais, revelaram prejuízo na aprendizagem de ratos (Mogensen *et al.*, 1995a). O efeito da administração sistêmica de inibidores de NOS sobre a aprendizagem e memória tem sido bastante estudado em vários animais como ratos, coelhos, galinhas e gatos (Hölscher e Rose, 1993; Huang *et al.*, 1994; Mogensen *et al.*, 1995b, 1995c). Um avanço importante tem sido feito, no desenvolvimento de novos inibidores da seletivos para as isoforma neuronal, NOS_n, testando seus efeitos, e eficácia tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Moore e Handy, 1997).

MECANISMOS DE TOLERÂNCIA

Como observou-se, anteriormente, entre os vários critérios para caracterizar a dependência de uma droga, a tolerância refere-se à necessidade de crescentes quantidades da substância para atingir a intoxicação ou efeito acentuadamente diminuído com o uso continuado da

mesma quantidade da substância. A tolerância é um fenômeno complexo e pode ser influenciada por vários fatores farmacológicos, comportamentais e genéticos que modulam o seu desenvolvimento (Lê, 1990).

A tolerância pode ser definida, para um grande número de drogas como sendo a redução dos efeitos comportamentais e/ou fisiológicos, resultante da exposição repetida a uma determinada droga (Lê, 1990). O fenômeno da tolerância tem sido amplamente estudado em relação aos vários tipos, mecanismos e fatores modificadores da mesma (Lieber, 1991; Hiltunen e Järbe, 1990; Lê, 1990; Leblanc *et al.*, 1975; Tabakoff e Hoffman, 1989; Kalant *et al.*, 1971; Kalant, 1996; Khanna *et al.*, 1990; 1994a; 1995a e 1997). A tolerância ao etanol pode resultar de um aumento da taxa de eliminação metabólica e da redução da sensibilidade dos tecidos alvos, especialmente do sistema nervoso central. Por isso a tolerância é definida em duas grandes categorias: a tolerância disposicional e a tolerância funcional (Siegel e Sdao-Jarvie, 1986).

A tolerância disposicional inclui alterações na absorção, distribuição, metabolismo e excreção da droga, levando a uma menor disponibilidade, diminuindo, portanto, a intensidade e/ou a duração do contato entre a droga e seu sítio receptor e, conseqüentemente, afetando todos os efeitos por ela provocados (Kalant e Khanna, 1990). *A tolerância metabólica*, que faz parte da tolerância disposicional, é o resultado de uma rápida eliminação de etanol do corpo (Tabakoff *et al.*, 1986) e está associada a um grupo específico de

enzimas hepáticas que metabolizam o etanol, reduzindo a duração dos efeitos da embriaguez causada pelo abuso do álcool (Lieber, 1991). Já, a *tolerância funcional* ocorre quando a administração prolongada de uma droga promove mudanças, nas propriedades e funções do seu sítio de ação, tornando-o menos responsivo para a mesma quantidade de droga (Kalant e Khanna, 1990).

O desenvolvimento da tolerância funcional, em homens e animais ocorre a fim de compensar o distúrbio causado pelo etanol em relação a funções comportamentais e fisiológicas (Tabakoff *et al.*, 1986). A tolerância funcional tem sido bastante estudada por causa das suas implicações no consumo de etanol e também por ser uma forma de plasticidade neuronal. A plasticidade neuronal é uma resposta adaptativa, ou seja, são alterações estruturais e funcionais nas sinapses como resultado dos processos adaptativos do organismo. Estas modificações podem promover alterações na eficiência sináptica, aumentando ou diminuindo a transmissão de impulsos, com a conseqüente modulação do comportamento (Kalant e Khanna, 1990).

Existem diferentes tipos de tolerância bem como diversos fatores que influenciam o seu desenvolvimento. Podem ser citadas: a *tolerância aguda*, que é observada, após uma única administração do etanol, e que foi descrita primeiramente por Mellanby (1919). Para se observar esse tipo de tolerância mede-se o desempenho de roedores em relação a uma curva de

concentração de etanol no cérebro ou no sangue, no decorrer de todo o experimento. A regressão do prejuízo causado pela administração de etanol foi assim avaliado por diversos autores Hiltunen e Järbe, 1990; 1992; Holloway *et al.*, 1988; Leblanc *et al.*, 1973; Tabakoff e Hoffman, 1989; Kalant *et al.*, 1971; Melchior e Tabakoff, 1981; A *tolerância crônica*, é desenvolvida, após repetidas administrações da mesma dose de etanol, faz-se necessário o aumento da dose para se obter o mesmo grau de intoxicação (Tabakoff *et al.*, 1986). Na tolerância crônica, ambas as tolerâncias funcional e metabólica podem se desenvolver (Hamkins, 1986; Kalant e Khanna, 1990). Existem vários métodos que podem ser empregados no estudo da tolerância crônica ao etanol, como: inalação por vapor, dieta líquida ou por modelos que medem a coordenação motora e aprendizagem (Goldstein, 1971, Chen, 1968, Khanna *et al.*, 1993b; Hiltunen e Jarbe, 1992). A administração de etanol, repetidamente, resulta no desenvolvimento da tolerância crônica funcional, podendo acarretar no desenvolvimento da tolerância cruzada a outras drogas hipnótico-sedativas, como barbitúricos e benzodiazepínicos. Neumam *et al.* (1992) demonstrou que animais tolerantes ao etanol, apresentavam tolerância ao diazepam, mas não ao tiopental. Em um outro estudo, Khanna *et al.* (1992c) mostrou que ratos tratados, cronicamente, com etanol manifestavam tolerância cruzada ao pentobarbital.

Crabbe *et al.* (1979) foram os primeiros a descrever a *tolerância rápida* aos efeitos hipotérmicos do álcool em camundongos. Os animais receberam etanol em dois dias consecutivos, e a diminuição da resposta à droga no

segundo dia foi observada. A tolerância rápida é usualmente observada 8-24 horas após o efeito da primeira administração ter se dissipado. Esta forma de tolerância parece ser funcional e até certo ponto disposicional. A descoberta da tolerância rápida abre novos campos de estudo, pois foi considerada como um índice para a tolerância crônica e cruzada. Khanna *et al.* (1991a; 1992b), encontrou resultados similares entre a tolerância crônica e rápida para os efeitos hipotérmico e prejuízo motor causados pelo etanol. Esta descoberta permitiu que os modelos de estudo da tolerância não fossem tão prolongados, assim reduzindo o custo com drogas e evitando o estresse dos animais.

O desenvolvimento da tolerância ao etanol também pode ser acelerado pela prática de uma tarefa, que poderia ser chamada de *tolerância por aprendizagem*. Chen (1968) demonstrou este fato utilizando dois grupos de animais receberam etanol e foram submetidos ao teste do labirinto. Durante quatro dias, um grupo era tratado com etanol antes do teste, o outro após o teste. Após esse período ambos os grupos foram tratados com etanol, antes de efetuarem o teste do labirinto. Observou-se que, apesar dos dois grupos terem recebido etanol durante o mesmo período de tempo e estarem treinados para desempenharem o teste do labirinto, somente o grupo que recebeu etanol diariamente antes do teste, manifestou a tolerância. Parece ser necessária a execução da prática intoxicada para se observar o desenvolvimento da tolerância (Leblanc *et al.*, 1973). A tolerância pode também ser influenciada por condicionamento Pavloviano (Lê *et al.*, 1987),

onde um estímulo inicialmente incondicionado ao ser associado a um comportamento ou a um aprendizado, passa a ser um estímulo condicionado. Contudo, a tolerância adquirida por um tarefa específica ou dentro de um determinado comportamento não é prontamente transferida para novas condições (Siegel e Sdao-Jarvie, 1986).

Bitrán e Kalant (1991) demonstraram que a aprendizagem possui um importante papel dentro do desenvolvimento da tolerância rápida e aguda ao etanol. Outros estudos, tem demonstrado a influência da aprendizagem na tolerância (Khanna *et al.*, 1992a,b; 1993a,b; 1997; Vogel-Sprott, 1979; Grant *et al.*, 1990; Kalant e Khanna, 1990).

O desenvolvimento da tolerância ao etanol também pode sofrer influências de fatores ambientais. Mansfield e Cunningham (1996) demonstrou que o desenvolvimento da tolerância aos efeitos do etanol pode ser acelerado quando as repetidas administrações do etanol se derem no mesmo ambiente. Porém, quando a administração de etanol se dá em altas doses pode ocorrer tolerância funcional, sem que ocorra influência do ambiente (Melchior e Tabakoff, 1981).

Estudos em animais de laboratório têm demonstrado que o desenvolvimento da tolerância aguda ou crônica pode estar sujeito a um controle genético e pode contribuir para o aumento do consumo de etanol. A influência de fatores genéticos na tolerância pode ser analisada em raças de

animais que possuem preferência ou não por etanol (Lê e Kiiianmaa, 1988) ou, em animais que demonstram ser mais resistentes aos efeitos hipotérmicos do etanol (Tabakoff, 1995). Estudos realizados com humanos demonstram que as diferenças genéticas podem influenciar no desenvolvimento da tolerância ao etanol. Schuckit e Gold (1988) compararam filhos de famílias de pais alcoólatras com os de pais não-alcoólatras e verificaram que os filhos de pais alcoólatras são menos sensíveis aos efeitos do álcool em relação aos filhos de não-alcoólatras. Tal predisposição pode contribuir para o aumento do consumo de etanol bem como elucidar o risco maior de alcoolismo entre os filhos de pais alcoólatras (Schuckit e Gold, 1988; Newlin e Thomson, 1990).

PAPEL DO SISTEMA NMDA E DO ÓXIDO NÍTRICO NA TOLERÂNCIA RÁPIDA

O desenvolvimento da tolerância aos efeitos de uma única administração de etanol na coordenação motora, foi descrita primeiramente por Crabbe e colaboradores em 1979. Essa forma de tolerância parece ser mais funcional do que farmacocinética, uma vez que se verificou que as alterações farmacocinéticas, dos níveis de etanol e pentobarbital no sangue, não contribuíram, significativamente, no fenômeno da tolerância rápida e cruzada, sugerindo que ambas poderiam ser usadas com índice da tolerância crônica e a tolerância crônica cruzada (Khanna *et al.*, 1991a; 1992a).

O receptor NMDA possui um papel importante no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, talvez de forma similar ao que ocorre nos processos de aprendizagem e memória. Vários estudos foram feitos sugerindo que o papel do receptor NMDA na tolerância envolveria aprendizagem, pois a tolerância rápida, aos efeitos do etanol, pode ser bloqueada com a utilização de antagonistas não-competitivos do receptor NMDA, no teste do "tilt-plane" e no de hipotermia (Khanna *et al.*, 1991a; 1991b; 1992b). Por outro lado, a D-cicloserina agonista do sítio de glicina, no receptor NMDA, atuando como um modulador positivo deste receptor (Monahan *et al.*, 1989) facilitando a aprendizagem e memória (Rabe e Tabakoff, 1990) quando administrada previamente ao etanol facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida (Khanna *et al.*, 1993b; 1995a). Esse efeito foi antagonizado por MK-801 e cetamina (Khanna *et al.*, 1995a). Empregando-se um outro teste para incoordenação motora, como o teste do "moving belt", Wu *et al* (1993) demonstraram que ratos treinados desenvolveram tolerância crônica aos efeitos do etanol e que esta tolerância pode ser bloqueada por antagonistas do receptor NMDA.

Como já se descreveu, evidências têm sugerido que o NO liberado pelo neurônio pós-sináptico, deve atuar como mensageiro retrógrado no neurônio pré-sináptico, elucidando a liberação do neurotransmissor glutamato e contribuindo para a PLD. A PLD é sensível à inibição neuronal, mediada pelo GABA (Collingridge *et al*, 1990) ou por agonistas indiretos do receptor GABA_A como o diazepam ou por aplicações extracelulares de

inibidores da NOS, (Futuko e Chaudhuri, 1995) tanto *in vitro* (Garthwaite *et al.*, 1988; Southan, 1995) quanto *in vivo* (Morris, 1986).

Considerando a influência dos receptores NMDA e do óxido nítrico sobre processos de aquisição da aprendizagem e das numerosas semelhanças entre os fenômenos de aprendizagem e tolerância, Khanna *et al* (1993c) investigaram a possível interferência do óxido nítrico no desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol na coordenação motora em ratos, utilizando a L-nitroarginina um inibidor não seletivo da NOSn. Verificou que a L-nitroarginina impediu a tolerância, efeito este prevenido pela L-arginina, bem como pela administração prévia de D-cicloserina. No entanto, nesses estudos não se verificou o efeito da inibição seletiva da NOS neuronal sobre a tolerância rápida. Além disso, não foi investigado se o bloqueio da tolerância conseqüente a inibição dessa enzima seria igualmente afetado pela administração prévia de L-arginina e de D-arginina.

O presente estudo foi realizado para, primeiramente, examinar o desenvolvimento da tolerância rápida e seu bloqueio por antagonistas do receptor NMDA, em camundongos. Em segundo lugar, para investigar o efeito do bloqueio da NOS neuronal, pelo 7-nitroindazol, sobre a tolerância rápida ao etanol, em camundongos.

OBJETIVOS

Considerando as evidências da literatura sobre a tolerância aos efeitos do etanol descritos no item Introdução, o presente trabalho teve por objetivos gerais:

- I- Caracterizar o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol em camundongos no modelo do rota-rod.
- II- Verificar a interferência de antagonistas do receptor NMDA sobre a tolerância rápida em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.
- III- Investigar um possível papel da via do óxido nítrico, na aquisição da tolerância rápida ao etanol em animais testados no rota-rod.

Para atingir essas metas, no presente estudo os seguintes objetivos específicos foram enfocados:

1. Avaliar os efeitos do etanol sobre a coordenação motora de camundongos no teste de rota rod e produzir a tolerância rápida a esses efeitos.
2. Investigar o efeito do pré-tratamento com os antagonistas não-competitivos do receptor NMDA, quetamina e dizocilpina (MK-801) na tolerância rápida ao etanol. Para verificar se o efeito é esteroespecífico, comparar o efeito do (-)MK com (+)MK-801.
3. Investigar o efeito do bloqueio da óxido nítrico sintase neuronal, com 7-nitroindazol sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

-
4. Verificar se os efeitos do 7-nitroindazol sobre a tolerância rápida ao etanol são semelhantes quando a droga é administrada antes ou após o teste, e se existe a dependência de estado.

 5. Verificar o efeito da administração prévia da L-arginina e do seu isômero D-arginina sobre a interferência da 7-NI na tolerância rápida ao etanol

MATERIAIS E MÉTODOS

EQUIPAMENTOS

O rota-rod, fabricado pela Columbus Instruments International Corporation, consiste de uma caixa acrílica dividida em quatro compartimentos e possui um eixo giratório suspenso entre eles. Esse eixo pode girar com velocidade constante ou com aceleração regulável de 1 rpm/s. Abaixo do eixo, localiza-se um sistema fotoelétrico, que permite o registro da queda do animal e a aplicação de um choque de 0 a 1 mA. O equipamento está acoplado a um computador PC-XT, tornando possível a programação dos experimentos e registro dos dados (Figura 6 A e 6 B).

Para as dosagens alcoólicas foi empregado um espectrofotômetro, modelo E-2250 da marca CELM, um medidor de pH-modelo Hanna piccolo plus da marca Sigma e uma centrífuga modelo Excelsa baby 206 da marca FANEN.



A



B

Figura 6. (A, B): Aparelho de rota-rod empregado nos experimentos.

ANIMAIS

Foram utilizados camundongos suíços, fêmeas, criados no biotério setorial do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, com peso entre 24 - 30 g, mantidos em ambiente com temperatura de 23 ± 1 °C, com ciclo de luz claro/escuro de 12 h (luz ligada às 6:30 hs), tendo água e comida *ad libitum*.

DROGAS

As seguintes drogas foram utilizadas: etanol absoluto p.a. Merck (grau de pureza 99,8 %), diluído em solução fisiológica a 14% (p/v), em todos os experimentos; cetamina (Parke Davis;-EUA); (+)MK-801 e (-)MK-801 (Research Biochemicals International;-EUA), preparados nas concentrações apropriadas, em solução fisiológica; 7-nitroindazol (Research Biochemic Inc.;-

EUA), dissolvido, em concentrações apropriadas em 1% de Tween 80 e solução fisiológica; L-arginina e D-arginina (Sigma Chemical Company;-EUA), dissolvidos em solução fisiológica. A solução fisiológica (salina) foi preparada com NaCl, Merck em água destilada, na concentração de 0,9 %.

PROCEDIMENTO GERAL

TREINAMENTO DOS CAMUNDONGOS

O treinamento consistiu em dois (2) a três (3) treinos diários durante cinco dias, no aparelho de rota-rod. O equipamento permitiu o treino de quatro animais por vez, sendo o intervalo de tempo entre um treinamento e outro de, aproximadamente, dois minutos. O animal era colocado no aparelho, sob aceleração contínua (1 rpm/s), e a queda do eixo giratório era registrada. Entre o teste de um animal e outro, as grades e as barras do aparelho eram limpas com papel absorvente. Após o período dos treinos, os animais foram selecionados, de acordo com uma linha de base estável de no mínimo 20 rpms até cair, para a realização dos testes. Os animais selecionados apresentaram valores basais de 20 a 40 rpms e a porcentagem de aproveitamento dos animais foi de aproximadamente 90%.

TESTE NO APARELHO DE ROTA-ROD

Nos testes, foi feito primeiramente o registro da medida basal (tempo zero), que consistiu em avaliar em que velocidade o animal já treinado, caía

do eixo giratório. Os animais, foram administrados intraperitonealmente com salina ou etanol e colocados no rota-rod em intervalos de 5, 10 e 15 minutos, após a injeção, para observação de seu desempenho. A velocidade de queda de cada animal, obtida aos 5, 10 e 15 min, após a injeção, foi comparada com o respectivo valor basal, para a verificação da incoordenação motora. Dentre os valores obtidos, para cada animal registrou-se a pior "performance". Após 24 hs, todos os animais foram re-testados, sob efeito de etanol. O prejuízo motor máximo obtido pelos animais foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Incoordenação motora máxima} = \frac{(\text{escore da linha basal}) - (\text{escore do teste})}{\text{escore da linha basal}} \times 100$$

DOSAGEM ALCÓOLICA

A alcoolemia, foi analisada pelo método enzimático, adaptado dos estudos de Hawkins *et al.*, 1966, foram coletados 50 µl do sangue dos animais, imediatamente, após o último intervalo de tempo (15 min. após a injeção de etanol) do teste de incoordenação motora, no aparelho de rota-rod.

Preparação da amostra: O sangue, foi coletado por punção do plexo retro-orbital com auxílio de um capilar (50 µl) e em seguida colocado em tubo de ensaio, previamente preparado com 10,0 ml de sulfato de zinco (ZnSO₄) a 0,45 % e 2,0 ml de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 N. Os tubos foram vedados com parafilme, homogenizados e armazenados em geladeira, até o momento das dosagens.

Curva padrão do álcool: Foi estabelecida uma curva-padrão para dosagem de álcool utilizando-se 50 µl de soluções com diferentes concentrações 50, 100, 150 e 200 mg%, de etanol. Seguiu-se o mesmo procedimento para a preparação das amostras.

Dosagem alcóolica: As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos. Logo após, 1,0 ml do sobrenadante era retirado e vertido em um tubo de ensaio, adicionando-se em seguida, 1,15 ml de uma solução denominada "coquetel", e composta por 1,0 ml de solução tampão semicarbazida -glicina -NaCl (pH: 9.4-9.5); 0,5 mg de ADH; 0,7 mg de NAD e 0,15 ml de água destilada (H₂O_d).

Os tubos, após tampados com parafilm, foram deixados por 24 horas em temperatura ambiente. Após este período, a densidade óptica (D.O.) das amostras, foi analisada em um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm, determinando-se a concentração de álcool das amostras.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados foram empregadas os testes adequados para cada experimento realizado. No experimento 1A foi empregada ANOVA de duas-vias com repetição e para o experimento 1B, ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Para os experimentos 2, 3, 4, 5 e 6 aplicou-se o teste t- de Student. Nos experimentos 7, 8, 9 e 14 foi usada a ANOVA de duas-vias, tendo como variáveis independentes o pré-tratamento e o tratamento. Nos experimentos 10, 11 e 13 foi utilizada a ANOVA de três-vias, tendo como variáveis independentes, o primeiro pré-tratamento, o segundo

pré-tratamento e o tratamento. No experimento 12 utilizou-se a ANOVA de duas-vias, tendo como variáveis independentes o pré-tratamento e o tratamento ou tratamento e o pós-tratamento. O teste “post hoc” empregado foi o teste de Tukey. A variável dependente foi a incoordenação motora máxima. O nível de significância, em todos os experimentos, foi determinado pelo valor de $p \leq 0,05$.

EXPERIMENTOS E RESULTADOS

O protocolo experimental variou, conforme a necessidade de cada experimento, sendo descrito de forma detalhada, a seguir. Em todos os experimentos os grupos foram compostos de dez animais cada (n=10).

Experimento 1: *Efeito agudo do etanol sobre a coordenação motora de camundongos.*

Procedimentos:

Com o objetivo de determinar uma faixa de doses de etanol que produzisse prejuízo motor nos animais, com recuperação relativamente rápida, camundongos previamente treinados e selecionados foram divididos em seis (6) grupos. O primeiro grupo denominado de grupo controle recebeu salina e os demais receberam doses diferentes de etanol (1,00; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,25 g/kg), respectivamente. A fim de verificar o efeito agudo do etanol, seguiu-se o procedimento geral para os testes no aparelho de rota-rod.

Resultados:

Os efeitos agudos do etanol sobre a coordenação motora de camundongos submetidos ao rota-rod estão representados nas figuras 7 e 8. Na figura 7 estão representados as velocidades de queda (r.p.m.), obtidas pelos diferentes grupos de animais, ao longo do tempo. Os grupos que

receberam etanol manifestaram um prejuízo motor significativo, aos cinco minutos de observação, em relação ao grupo controle. A partir dos dez minutos verificou-se o início de uma recuperação da coordenação motora dos grupos 1,00; 1,25; 1,50 e 1,75 g/kg e, aos quinze minutos, evidenciou-se um aumento desta recuperação, com exceção do grupo administrado com etanol na maior dose (2,25 g/kg), que não apresentou sinais de recuperação, no período de duração do teste. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas indicou diferenças significativas para o tratamento [$F_{(5, 54)} = 100,92$; $p < .0001$], tempo [$F_{(3, 162)} = 276,64$; $p < .0001$] e para a interação tratamento x tempo [$F_{(15, 162)} = 17,55$; $p < .0001$]. Utilizando o teste *post hoc* de Tukey, verificou-se que aos 5 minutos após a administração do etanol, o prejuízo motor foi mais severo.

Na figura 8, está representada a coordenação motora aos cinco minutos após o tratamento com etanol de cada grupo. A análise de variância de uma via mostrou que os grupos administrados com etanol demonstraram um alto prejuízo na coordenação motora em relação ao grupo controle [$F_{(5, 54)} = 55,450$; $p < .0001$]. Também foi possível observar o efeito dose resposta produzido pelo etanol.

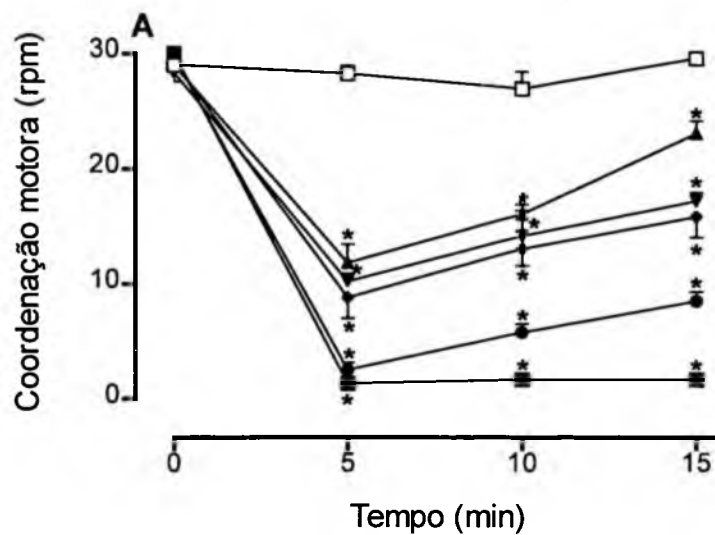


Figura 7: Efeito agudo de etanol nas doses de 1,00 (▲), 1,25 (▼), 1,50 (◆), 1,75 (●), 2,25 (■) g/kg, ou de salina (□) i.p., sobre a coordenação motora de camundongos testados no rotarod. O procedimento foi realizado com aceleração de 1 rpm/s e as avaliações foram efetuadas nos intervalos de tempo, 5, 10 e 15 min após a injeção de etanol. Os resultados expressos representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Teste de Tukey).

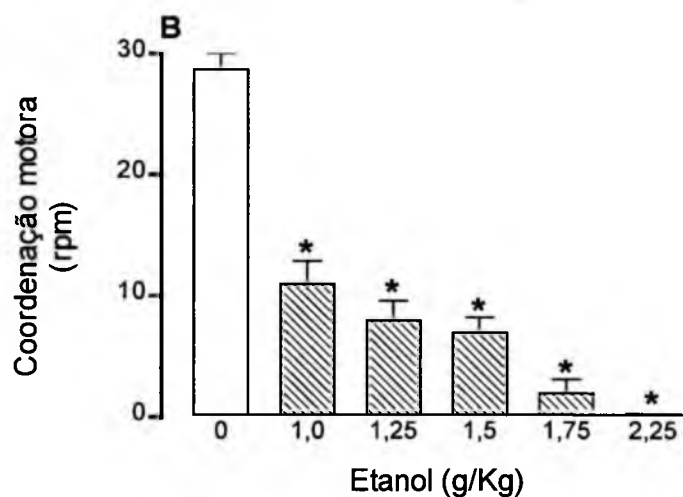


Figura 8: Efeito agudo do etanol sobre a coordenação motora aos 5' em relação ao valor basal (r.p.m.). Os resultados expressos são as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (salina) (Teste de Dunnett).

Considerando-se os resultados obtidos no experimento 1, foram escolhidas as doses de 1,50 e 1,75 g/kg para se testar o possível desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol na coordenação motora.

Experimento 2: *Tentativa de induzir a tolerância rápida em camundongos submetidos ao teste do rota-rod, após a administração de doses únicas de etanol no Dia 1.*

Procedimentos:

Animais, previamente treinados e selecionados, foram divididos em quatro grupos. Dois grupos receberam salina (controle) e os outros dois grupos receberam etanol nas doses 1,50 e 1,75 g/kg. Cinco minutos, após a injeção, foram realizados os testes no aparelho do rota-rod, como descrito no procedimento geral. Findo o teste, os animais retornavam para as gaiolas. No dia seguinte, todos os grupos foram tratados com etanol, nas mesmas doses do dia anterior, e novamente submetidos ao teste do rota-rod. A incoordenação motora máxima de cada grupo foi calculada.

Resultados:

Os resultados, deste experimento, apresentados na figura 9, indicam que camundongos tratados com etanol no Dia 1, nas doses de 1,50 e 1,75 g/kg, manifestaram um prejuízo motor significativo (80 - 90 %), em relação ao grupo controle. No Dia 2, pode-se observar que os animais controles, quando

tratados com etanol (SE), apresentaram perda da capacidade motora no teste do rota-rod, tanto com a dose de 1,50 mg/kg [$t_{(1,18)} = 11,692$; $p < 0,0001$] como com a dose de 1,75 mg/kg [$t_{(1,18)} = 25,098$; $p < 0,0001$]. Nos grupos tratados com etanol em ambos os dias (EE), não se observou desenvolvimento de tolerância rápida, para os efeitos do etanol com a dose de 1,50 mg/kg [$t_{(1,18)} = 0,8892$; $p = 0,3856$] ou com 1,75 mg/kg [$t_{(1,18)} = 1,456$; $p = 0,1625$].

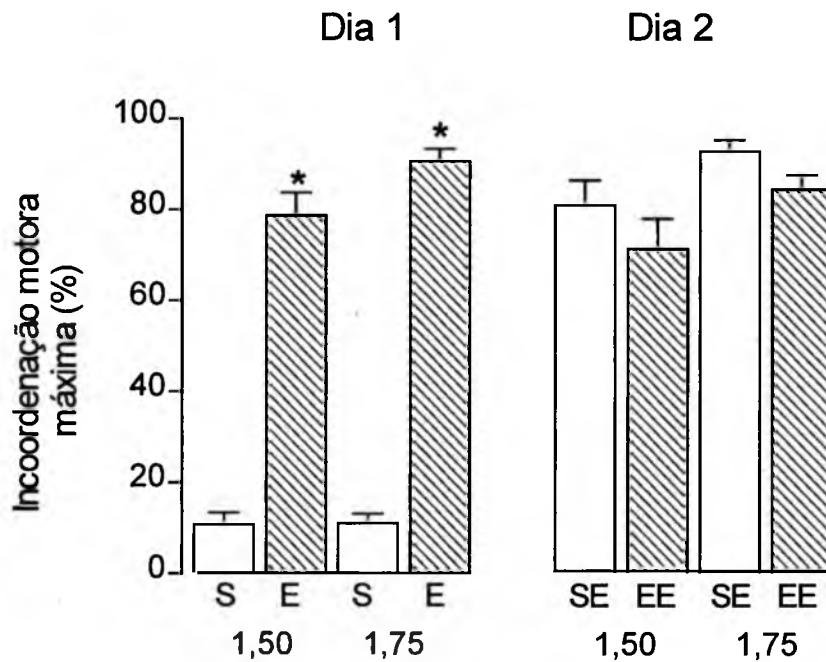


Figura 9. Tentativa de induzir a tolerância rápida ao etanol com as doses de 1,50 ou 1,75 g/kg, na incoordenação motora de camundongos, testados no rota-rod. No Dia 1, o grupo controle recebeu salina (S) e os demais grupos receberam etanol (E) (1,50 e 1,75 g/kg). Os animais foram testados 5 min após a injeção de salina ou de etanol. No segundo dia, os grupos controle e experimental foram tratados com etanol e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$, (teste "t" de Student, comparado aos respectivos controles).

Baseados nos estudos de Khanna *et al* (1991), executou-se o experimento 3, utilizando uma dose adicional de etanol para o desenvolvimento da tolerância rápida.

Experimento 3: *Indução da tolerância rápida ao etanol com o emprego de duas doses de etanol, no Dia 1, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.*

Procedimentos:

Para verificar-se com a aplicação de etanol em duas administrações no primeiro dia, a tolerância rápida a uma dose de etanol se desenvolveria, no Dia 2 os camundongos, previamente treinados e selecionados foram divididos em seis grupos. No Dia 1, três grupos receberam etanol (1,00; 1,50 e 1,75 g/kg) e três grupos receberam salina sendo testados no rota-rod de acordo com o procedimento geral. Duas horas depois do início do teste, os animais receberam uma segunda dose de etanol (2,00; 1,50 e 1,25 g/kg respectivamente) totalizando como dose final 3,0 g/kg. Os animais retornaram para suas gaiolas-moradia. No Dia 2, os respectivos grupos receberam etanol nas doses empregadas no Dia 1 (1,00; 1,50 e 1,75 g/kg), sem a dose adicional. O teste foi realizado do mesmo modo que no primeiro dia, e o prejuízo máximo de cada dose de etanol foi calculado.

Resultados:

Os resultados deste experimento estão representados na figura 10. Observou-se que no Dia 1 todos os grupos que receberam etanol manifestaram um prejuízo motor significativo em relação aos grupos tratados com salina, e que este prejuízo motor foi dependente da dose. Após 24 horas, verificou-se que o grupo tratado com etanol, na dose de 1,0 g/kg, não apresentou tolerância, enquanto que nos grupos que receberam etanol nas doses de 1,50 mg/kg [$t_{(1,18)} = 4.593$; $p < .0002$] ou 1,75 mg/kg [$t_{(1,18)} = 17.111$; $p < .0001$] pode-se observar o desenvolvimento a tolerância rápida. A dose de 1,75 g/kg de etanol produziu a tolerância mais evidente do que a dose de 1,50 g/kg e, assim, foi escolhida para a realização dos experimentos seguintes. Os resultados sugerem que uma dose adicional do etanol no Dia 1 parece ser necessária para o desenvolvimento da tolerância rápida, que se manifesta no segundo dia do teste.

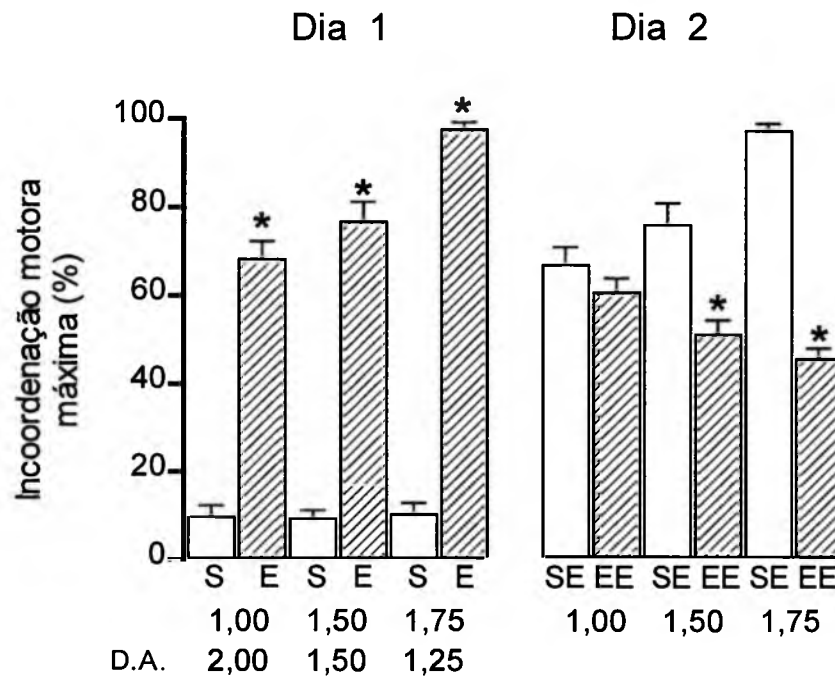


Figura 10. Desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida por diferentes doses de etanol (1,00; 1,50 ou 1,75 g/kg) em camundongos, testados no rota-rod. No Dia 1, o grupo controle recebeu salina (S) e os demais grupos receberam etanol (E) (1,00; 1,50 e 1,75 g/kg). Os animais foram testados 5 min após a injeção de salina ou etanol. Duas horas após, todos os grupos receberam uma dose adicional (D.A.) de etanol (2,00; 1,50 ou 1,25 g/kg), completando 3,0 g/kg, e o grupo controle recebeu salina. Após 24 horas (dia 2), todos os grupos controle e experimental foram tratados com etanol e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$, (teste "t" de Student, comparado ao respectivo controle).

Com o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol nesse experimento, teve-se como objetivo no experimento 4 verificar se o aumento da dose total de etanol alteraria a magnitude da tolerância rápida, utilizando-se a dose inicial de 1,75 g/kg.

Experimento 4: *Influência do aumento da dose total de etanol no desenvolvimento da tolerância rápida.*

Procedimentos:

Camundongos treinados e selecionados foram divididos em dois grupos (n=20), um grupo foi administrado salina e a outro grupo etanol na dose de 1,75 g/kg. Os animais foram submetidos ao rota-rod, para a realização dos testes, como descrito anteriormente. Duas horas após a primeira administração, o grupo tratado com etanol foi subdividido em dois subgrupos, e receberam uma segunda dose de etanol, respectivamente de 1,25 g/kg (totalizando 3,0 g/kg), ou 2,25 g/kg, (totalizando 4,0 g/kg). Os demais grupos receberam uma dose adicional de salina. No Dia 2 todos os grupos receberam etanol na dose de 1,75 g/kg e foram submetidos ao teste do rota-rod.

Resultados:

Os resultados deste experimento demonstraram que, no Dia 1, os grupos que receberam etanol apresentaram prejuízo motor significativo em relação aos respectivos grupos controle (figura 11). No Dia 2, os grupos tratados com salina no Dia 1, apresentaram incoordenação motora elevada. Na figura 11, observa-se que houve desenvolvimento de tolerância com as doses totais de 3,0 e 4,0 g/kg. A análise estatística mostrou os seguintes resultados para os grupos tratados com (SE) na dose de 3,0 g/kg [$t_{(1,18)} = 50,191$; $p < .0001$] e na dose de 4,0 g/kg [$t_{(1,18)} = 52,230$; $p < 0.0001$], e para os

grupos tratados com (EE) na dose de 3,0 g/kg de etanol [$t_{(1,18)} = 18,401$ $p < 0.0001$] ha dose de 4,0 g/kg: [$t_{(1,18)} = 19,505$ $p < 0.0001$]. A análise estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos (EE) tratados com etanol nas doses de 3,0 e 4,0 g/kg nos dois dias do teste. Os dois grupos desenvolveram tolerância rápida aos efeitos do etanol.

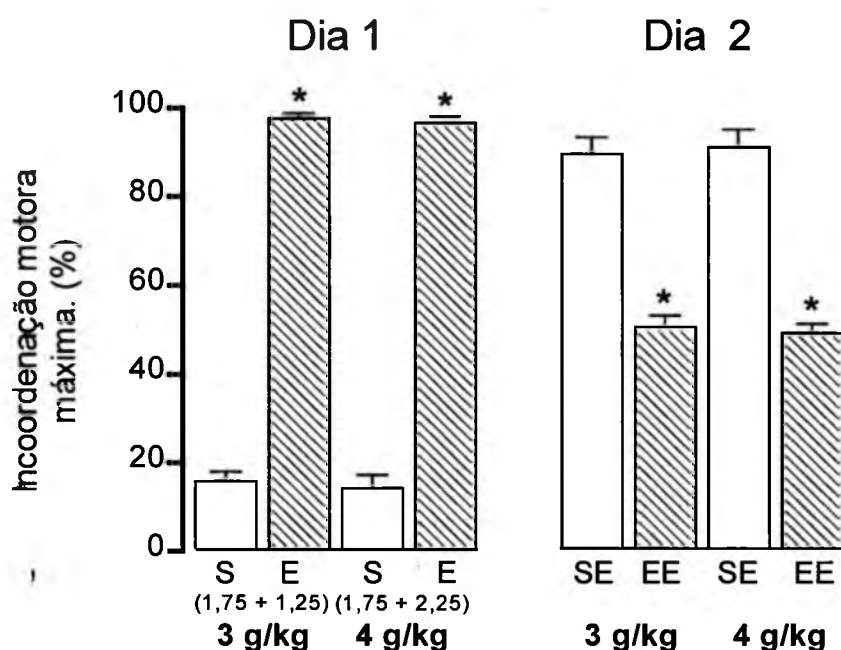


Figura 11. Comparação do desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol com a dose total de etanol de 3,0 ou de 4,0 g/kg, i.p, em camundongos testados no rota-rod. No Dia 1, dois grupos controles receberam salina e dois grupos receberam etanol na dose de 1,75 g/kg, sendo testados no rota-rod. Duas horas após, os dois grupos receberam uma dose adicional de etanol 1,25 g/kg, completando 3,0 g/kg, ou de salina. Os outros dois grupos receberam uma dose adicional de etanol 2,25 g/kg, completando 4,0 g/kg, ou salina. No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 1,75 g/kg e testados. Os resultados expressam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$. (teste "t" de Student, comparado aos respectivos controles).

Uma vez que o desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol na coordenação motora estava caracterizada, utilizando a dose de 1,75 + 1,25 g/kg, totalizando 3,0 g/kg de etanol, objetivou-se verificar, a

seguir, se uma redução na dose adicional poderia alterar a manifestação da tolerância rápida.

Experimento 5: Tolerância rápida com diferentes doses adicionais de etanol.

Procedimentos:

Para verificar o efeito da variação da dose adicional, sobre o desenvolvimento da tolerância, camundongos, treinados e selecionados como anteriormente, foram divididos em cinco grupos e a seguir testados no aparelho de rota-rod. O primeiro grupo recebeu salina (controle) e os demais etanol na dose de 1,75 g/kg. Duas horas após o teste, o grupo controle recebeu uma injeção adicional de salina e os outros grupos foram tratados com uma segunda dose de etanol de 0,50; 0,75; 1,00 ou 1,25 g/kg, totalizando 2,25; 2,50; 2,75 ou 3,00 g/kg, respectivamente. Após 24 horas, os animais foram tratados com etanol na dose de 1,75 g/kg e foram re-testados no rota-rod. Dessa forma, os animais eram testados no aparelho sob a mesma dose de etanol, em ambos os dias de experimento.

Resultados:

Os resultados deste experimento estão representados na figura 12. No Dia 1, os grupos tratados com etanol apresentaram um prejuízo motor significativo em relação ao grupo tratado com salina. No Dia 2, verificou-se que somente a administração da dose adicional de 1,25 g/kg de etanol, após o teste no Dia 1, interferiu no desenvolvimento da tolerância rápida. O grupo

tratado com a dose total de 3,0 g/kg de etanol apresentou o fenômeno de tolerância rápida [$t_{(1,18)} = 11,898$; $p < 0.0001$]. Os grupos que receberam uma dose total de etanol inferior a 3,0 g/kg não desenvolveram a tolerância rápida para os efeitos do etanol no Dia 2.

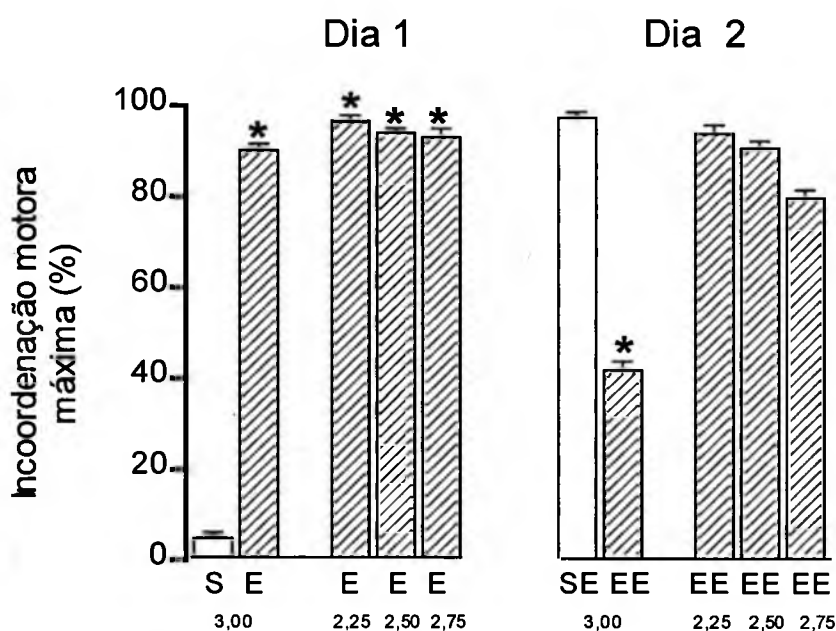


Figura 12. Efeitos de diferentes doses adicionais de etanol no desenvolvimento da tolerância rápida às ações do etanol na coordenação motora de camundongos, testados no rota-rod. No Dia 1, o grupo controle recebeu salina e quatro grupos receberam etanol na dose de 1,75 g/kg, sendo testados no rota-rod. Duas horas após, cada grupo recebeu uma dose adicional de etanol diferente (0,50; 0,75; 1,00 ou 1,25 g/kg), completando, respectivamente, a dose total de: 2,25; 2,50; 2,75 ou 3,00 g/kg. No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 1,75 g/kg e testados no rota-rod. Os resultados expressam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$ (teste "t" de Student, comparado ao respectivo controle).

Experimento 6: Tolerância rápida ao etanol em camundongos machos e fêmeas.

Procedimentos:

Com o objetivo de se avaliar uma possível interferência do sexo dos animais em relação à indução do fenômeno de tolerância rápida, foi realizado o presente experimento.

Para isto, camundongos fêmeas e machos foram treinados e selecionados. Após serem, previamente separados de acordo com o sexo, cada grupo foi dividido em dois subgrupos. O primeiro recebeu salina e o outro etanol na dose de 1,75 g/kg procedendo-se ao teste do rota-rod. Duas horas após os grupos foram tratados com a dose adicional de etanol 1,25 g/kg ou salina respectivamente. No segundo dia todos os animais receberam etanol na dose de 1,75 g/kg e foram testados conforme descrito anteriormente.

Resultados:

Os resultados desse experimento estão representados na figura 13. Observou-se que, no Dia 1, todos os grupos injetados com etanol manifestaram prejuízo motor significativo em relação aos grupos tratados com salina. Após 24 horas, os grupos tratados com etanol, em ambos os dias (EE), apresentaram o fenômeno de tolerância rápida. A análise estatística dos resultados indicaram os seguintes valores obtidos no teste “t” de Student: para machos [$t_{(1,18)} = 21,521$; $p < 0,0001$] e para fêmeas [$t_{(1,18)} = 21,324$;

$p < 0,0001$]. A administração da dose de 1,75 g/kg de etanol produziu efeito, de forma evidente, tanto em animais machos quanto em fêmeas. Entretanto não foram observadas diferenças estatísticas entre esses dois grupos [$t_{(1,18)} = 1,120$; $p = 0,2772$].

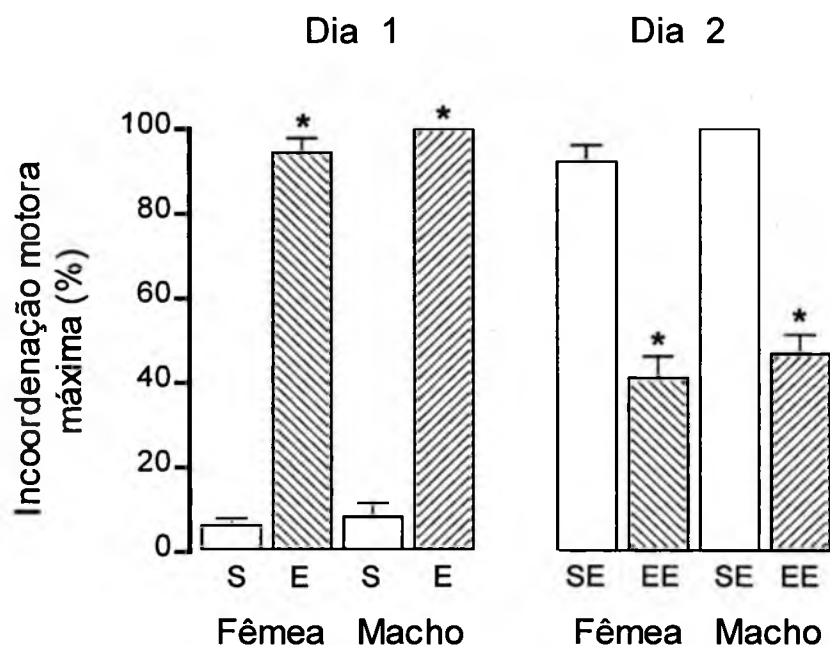


Figura 13. O efeito da variável sexo no fenômeno de desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol em camundongos, testados no rota-rod. No Dia 1, dois grupos (machos e fêmeas) receberam salina e dois outros grupos receberam etanol na dose de 1,75 g/kg, sendo testados no rota-rod. Duas horas após, dois grupos receberam uma dose adicional de salina ou etanol 1,25 g/kg, completando-se 3,0 g/kg. Após 24 horas (Dia 2), todos os grupos foram tratados com etanol 1,75 g/kg e testados novamente. Os resultados expressam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$, teste "t" de Student, comparado ao respectivo controle.

Estando caracterizado o protocolo para o estudo da tolerância rápida em camundongos pelo uso de etanol 1,75 g/kg com dose adicional de 1,25 g/kg no Dia 1, passou-se ao estudo da participação do sistema NMDA, nesse modelo.

Experimento 7: Efeito da cetamina sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod

Procedimentos:

Com objetivo de investigar se o bloqueio do receptor NMDA pela cetamina, interfere na aquisição da tolerância rápida ao etanol avaliada no modelo do rota-rod, animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em quatro grupos: A, B, C e D. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam salina ou cetamina. As doses de cetamina foram de 1,0 (A); 1,5 (B); 2,5 (C) e 5,0 (D) mg/kg, respectivamente. Após 30 minutos, cada um dos subgrupos foi re-dividido em dois, recebendo, cada um 1,75 g/kg de etanol ou salina. A seguir, foram submetidos à avaliação no rota-rod. Duas horas após o término do experimento os grupos receberam uma dose adicional de salina ou etanol (1,25g/kg), respectivamente, dependendo do seu tratamento prévio e retornaram para as gaiolas. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol (1,75 g/kg) sendo novamente testados no aparelho de rota-rod, a fim de verificar o desenvolvimento da tolerância rápida e a possível interferência da cetamina.

Resultados:

Os resultados do presente experimento estão representados nas figuras 14 e 15. A administração de cetamina bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada no teste do rota-rod, sugerindo-se uma relação dose-dependente (Figura 14). No Dia 1, a ANOVA de duas-vias

demonstrou o efeito do tratamento para os grupos A: $F_{(1,36)} = 2994,1$; $p < 0,0001$; B: $F_{(1,36)} = 1113,9$; $p < 0,0001$; C: $F_{(1,36)} = 427,27$; $p < 0,0001$; D: $F_{(1,36)} = 3361,9$; $p < 0,0001$. No Dia 2 do experimento, o prejuízo motor foi reduzido, de forma significativa, nos grupos controle administrados com etanol + etanol (EE). A ANOVA de duas-vias demonstrou o efeito do tratamento nos diferentes grupos: A: [$F_{(1,36)} = 530,27$; $p < 0,0001$]; B: [$F_{(1,36)} = 179,73$; $p < 0,0001$]; C: [$F_{(1,36)} = 38,691$; $p < 0,0001$]; D: [$F_{(1,36)} = 25,704$; $p < 0,0001$]. As análises *post hoc* indicaram que o desenvolvimento da tolerância rápida foi estatisticamente significativo (Teste de Tukey). Os grupos pré tratados com cetamina 2,5 e 5,0 mg/kg antes do etanol, no Dia 1, não apresentaram tolerância rápida, no Dia 2. A ANOVA de duas-vias revelou o efeito do pré-tratamento para os grupos: C: [$F_{(1,36)} = 37,039$; $p < 0,0001$]; D: [$F_{(1,36)} = 27,867$; $p < 0,0001$]. A interação pré-tratamento x tratamento foi significativa nos grupos: B: [$F_{(1,36)} = 31,87$; $p < 0,0001$]; C: [$F_{(1,36)} = 50,303$; $p < 0,0001$]; D: [$F_{(1,36)} = 27,647$; $p < 0,0001$]. A análise *post-hoc* indicou que a cetamina, nas doses 2,5 e 5,0 mg/kg, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida (teste de Tukey). A cetamina na dose de 1,0 mg/kg não foi capaz de bloquear a tolerância rápida, e na dose de 1,5 mg/kg o bloqueio foi parcial. Na figura 15 os resultados foram parcialmente re-apresentados para melhor visualização do bloqueio dose-dependente da cetamina sobre a tolerância rápida, no Dia 2.

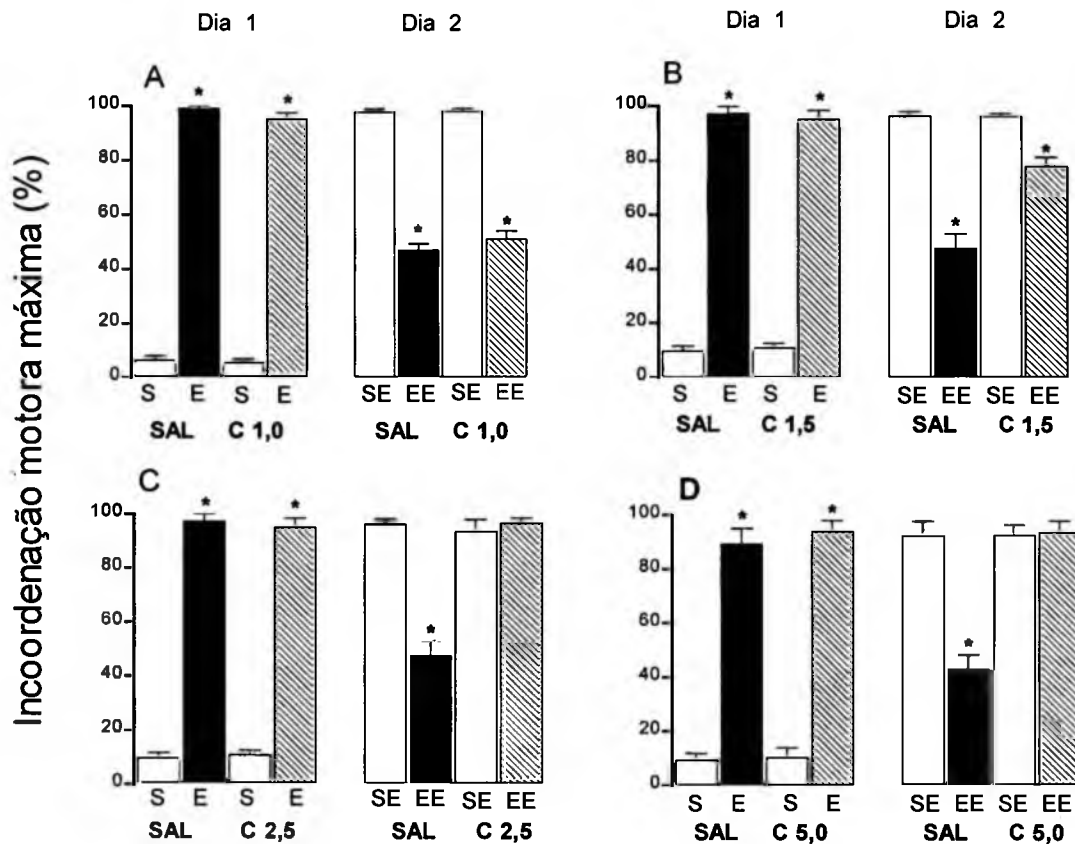


Figura 14 Efeito da cetamina no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Oito grupos receberam salina e outros oito grupos receberam cetamina nas doses de 1,0 (A), 1,5 (B), 2,5 (C) ou 5,0 (D) mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina ou etanol 1,75 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol é observada no Dia 2, onde todos os grupos foram tratados com etanol na dose (1,75 g/kg, i.p.). Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

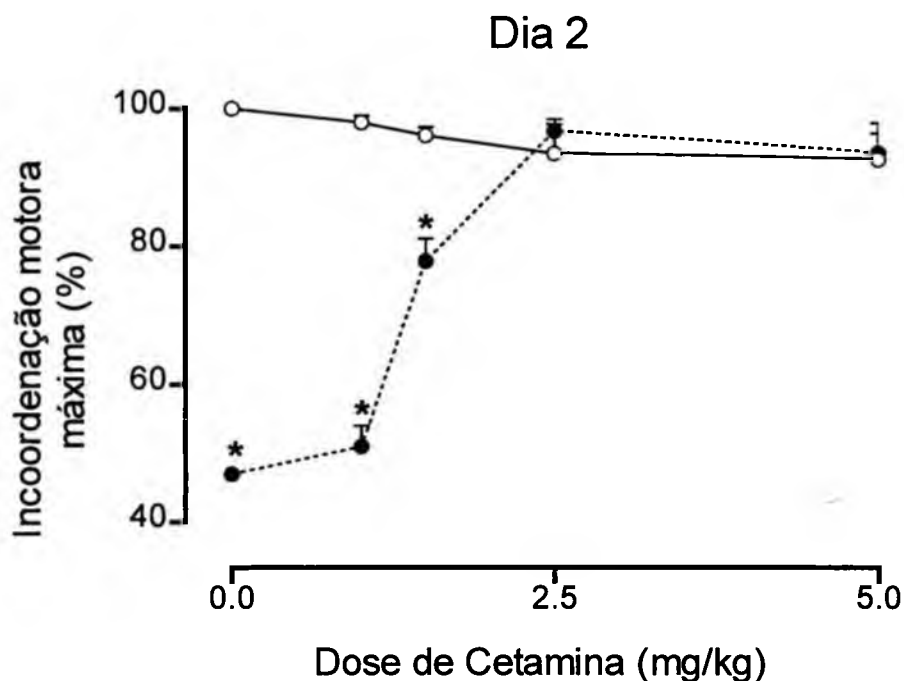


Figura 15 Curva dose-resposta do efeito das diferentes doses de cetamina sobre a incoordenação motora induzida por etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (O) representa o desempenho do grupo CSE e o símbolo (●) representa o do grupo CEE no Dia 2 do teste. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 8: Efeito do (+) MK-801 e (-) MK-801 sobre a tolerância rápida ao etanol avaliado pelo teste do rota-rod.

Procedimentos:

Para investigar se o bloqueio da tolerância rápida pelos antagonistas do receptor NMDA ocorreria de forma específica, camundongos previamente treinados e selecionados foram divididos em quatro grupos: A, B, C e D. Cada grupo recebeu como pré-tratamento; A: salina, (+) MK-801 ou (-) MK-

801 na dose de 0,015 mg/kg; B: salina, (+) MK-801 ou (-) MK-801 na dose de 0,020 mg/kg; C: salina, (+) MK-801 ou (-) MK-801 na dose de 0,030 mg/kg e D: salina, (+) MK-801 ou (-) MK-801 na dose de 0,060 mg/kg. A seguir, os grupos foram subdivididos em dois que receberam salina ou etanol (1,75 g/kg). Trinta minutos, após o primeiro tratamento, e cinco minutos após o segundo, os animais foram submetidos ao rota-rod. Duas horas após o início do experimento os grupos receberam uma dose adicional de salina ou etanol (1,25 g/kg) respectivamente, e retornaram para as gaiolas. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol (1,75 g/kg) e novamente testados no rota-rod, a fim de se verificar o desenvolvimento da tolerância rápida, e o possível bloqueio pelo antagonista do receptor NMDA.

Resultados:

Os efeitos do pré-tratamento com MK-801 sobre a tolerância estão apresentados nas figuras 16 e 17. No Dia 1, não foram observadas diferenças significativas no desempenho dos grupos A, B, C e D. Os animais pré-tratados com salina ou com várias doses dos isômeros (+) ou (-) dos MK-801 e que receberam etanol apresentaram um prejuízo na coordenação motora. A ANOVA de duas-vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol para os grupos pré-tratados com (+) MK-801: [A: $F_{(1,36)} = 2215,6$; $p < 0,0001$; B: $F_{(1,36)} = 1808,0$; $p < 0,0001$; C: $F_{(1,36)} = 1205,78$; $p < 0,0001$; D: $F_{(1,36)} = 1637,5$; $p < 0,0001$] e (-) MK-801: [A: $F_{(1,36)} = 3470,3$; $p < 0,0001$; B: $F_{(1,36)} = 1510,1$; $p < 0,0001$; C: $F_{(1,36)} = 1834,8$; $p < 0,0001$; D: $F_{(1,36)} = 2201,1$; $p < 0,0001$]. Os grupos tratados com salina, no Dia 1, apresentaram

incoordenação motora no Dia 2 após o tratamento com etanol. Os grupos pré-tratados com salina e (-)MK-801 e tratados com etanol, em ambos os dias, mostraram a tolerância rápida ao etanol no Dia 2. O prejuízo motor foi significativamente reduzido em todos os grupos etanol + etanol (EE) no segunda dia. A ANOVA mostrou o efeito do tratamento para os grupos A [$F_{(1,36)} = 591,49$; $p < 0.0001$]; B [$F_{(1,36)} = 429,18$; $p < 0.0001$]; C [$F_{(1,36)} = 101,48$; $p < 0.0001$] e D [$F_{(1,36)} = 37,961$; $p < 0.001$]. As doses de 0,030 e 0,060 mg/kg dos grupos pré-tratados (+)MK-801, tratados com etanol no Dia 1 e no Dia 2, impediram o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. A análise estatística dos resultados para a variável pré-tratamento indicou os seguintes valores: grupo C [$F_{(1,36)} = 142,58$; $p < 0,001$]; D [$F_{(1,36)} = 79,040$; $p < 0,001$]; e para a interação pré-tratamento x tratamento: grupo C [$F_{(1,36)} = 83,69$; $p < 0,001$]; D [$F_{(1,36)} = 52.966$; $p < 0,001$]. O pré-tratamento com (+)MK-801 nas doses de 0,015 e 0,020 mg/kg não impediu a aquisição da tolerância rápida ao etanol no teste do rota-rod. Os resultados desse estudo mostram que a redução da tolerância rápida à incoordenação motora produzida por etanol, observada pelo pré-tratamento com antagonista do receptor NMDA, parece ser específica, uma vez que foi obtida com o isômero (+)MK-801 nas doses de 0,030 e 0,060 mg/kg. Não foram observadas diferenças significativas com o uso do isômero (-) MK-801. Além disso, o bloqueio observado com o isômero (+) MK-801 seguiu uma relação dose-dependente, conforme mostra a figura 17.

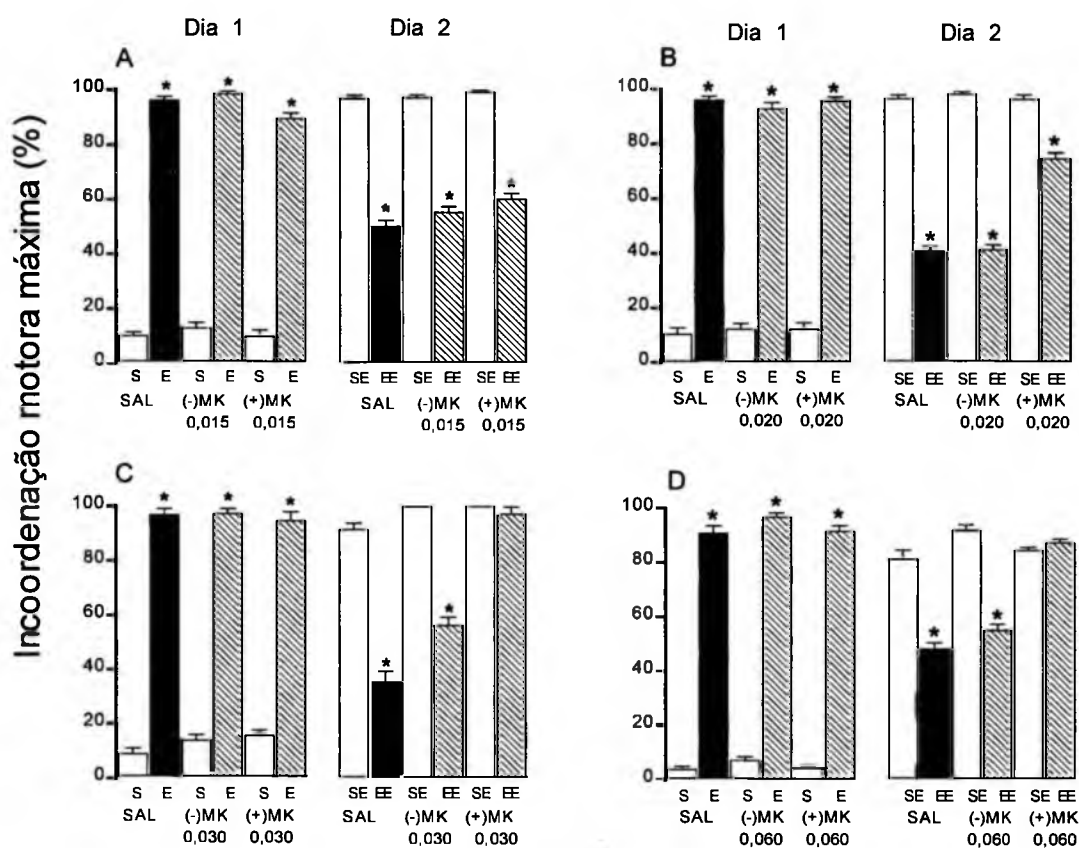


Figura 16. Efeito do tratamento com isômeros do MK-801 na tolerância rápida ao etanol avaliada no rota-rod. No Dia 1, oito grupos foram tratados com salina, oito grupos receberam (-)MK-801 e outros oito grupos receberam (+)MK-801, nas doses de (A): 0,015 (B): 0,020 (C): 0,030 ou (D): 0,060 mg/kg. Após 30 min, os grupos foram subdivididos e tratados com salina ou etanol 1,75 g/kg, i.p.. A tolerância rápida aos efeitos do etanol foi observada, no segundo dia, quando todos os grupos receberam etanol na dose de 1,75 g/kg. Os resultados expressam as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle. (Teste de Tukey)

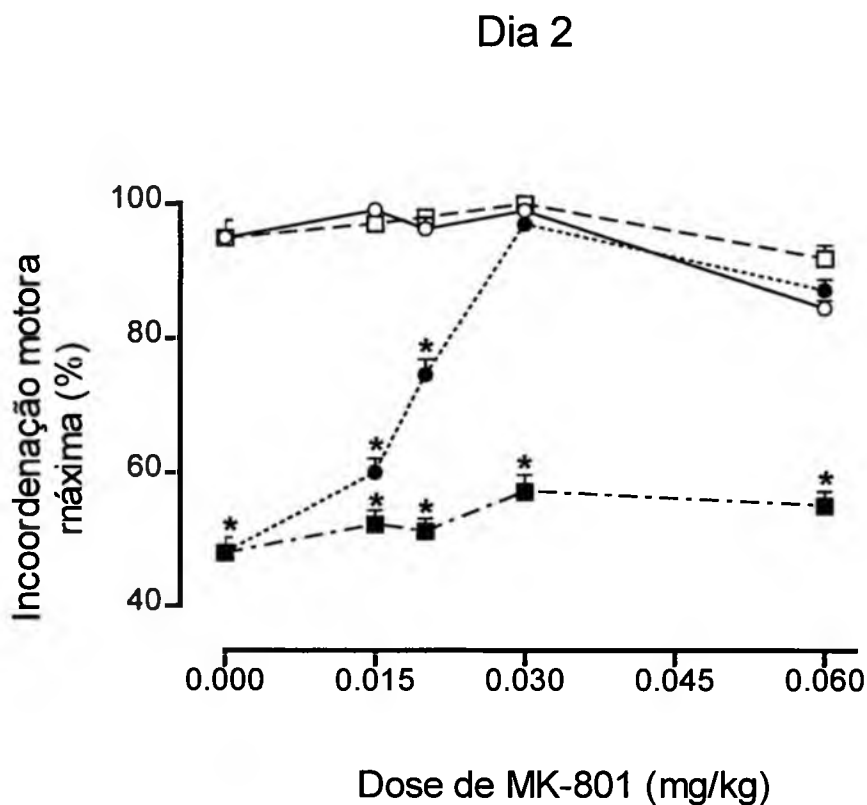


Figura 17 Curva dose-resposta do efeito das diferentes doses de MK-801 sobre a incoordenação motora induzida por etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (O) representa o desempenho do grupo (+)MKSE, o símbolo (●) representa o do grupo (+)MKEE, o símbolo (□) representa o do grupo (-)MKSE e o símbolo (■) representa o do grupo (-)MKEE no Dia 2 do teste. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 9: Efeito do 7-nitroindazol sobre a tolerância rápida ao etanol

Procedimentos:

A fim de investigar a participação da via do óxido nítrico, na tolerância ao etanol, realizou-se este experimento com intuito de verificar se a inibição da NO sintase neuronal pelo 7-nitroindazol, interfere com esse processo. Animais, previamente treinados e selecionados, foram divididos em quatro

grupos, A, B, C e D. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos, sendo o primeiro pré-tratado com salina e o outro com 7-NI, resultando em oito grupos. As doses de 7-NI, utilizadas para os diferentes grupos, foram: A: 5,0; B: 7,5; C: 10,0 e D: 25,0 mg/kg, respectivamente. Após trinta minutos, cada grupo foi subdividido em dois, sendo um tratado com salina e o outro com etanol 1,75 g/kg. Cinco minutos após, os animais foram submetidos ao rota-rod e duas horas após o início do experimento, os grupos receberam uma dose adicional de salina ou etanol (1,25g/kg), respectivamente, e retornaram para as gaiolas-moradia. Vinte quatro horas, após a primeira injeção, todos os animais foram receberam uma dose de etanol (1,75 g/kg) e novamente foram testados no rota-rod a fim de verificar o desenvolvimento da tolerância rápida e a possível interferência do 7-NI.

Resultados:

Os resultados desse experimento mostraram que a administração do inibidor da óxido nítrico sintase, interferiu no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol para o teste do rota-rod, de forma dose-dependente (figura 18). No Dia 1, os camundongos, pré-tratados com salina ou 7-NI e tratados com etanol, apresentaram perda da coordenação motora. O pré-tratamento com 7-NI não alterou a coordenação motora dos animais tratados com etanol ou com salina. No Dia 1, a ANOVA de duas-vias demonstrou o efeito apenas do tratamento para os grupos A [$F_{(1,36)} = 563,55$; $p < 0,0001$]; B [$F_{(1,36)} = 800,62$; $p < 0,0001$]; C [$F_{(1,36)} = 464,82$; $p < 0,0001$]; e D [$F_{(1,36)} = 504,28$; $p < 0,0001$]. Como previsto, no Dia 2, os animais tratados com etanol em ambos os dias (EE),

apresentaram tolerância rápida em relação aos grupos tratados com salina, 24 horas antes (SE). No Dia 2, a ANOVA de duas-vias demonstrou o efeito do tratamento para os grupos A [$F_{(1,36)} = 92,828$; $p < 0,0001$]; B [$F_{(1,36)} = 97,242$; $p < 0,0001$]; C [$F_{(1,36)} = 47,342$; $p < 0,0001$]; D [$F_{(1,36)} = 31,018$; $p < 0,0001$]. As análises, pelo teste de Tukey indicaram o desenvolvimento da TR. A análise estatística revelou, ainda no Dia 2, o efeito do pré-tratamento com 7-NI no dia anterior para os grupos C [$F_{(1,36)} = 37,755$; $p < 0,0001$]; D [$F_{(1,36)} = 19,549$; $p < 0,0001$]. A interação pré-tratamento x tratamento foi significativa para os grupos C [$F_{(1,36)} = 31,394$; $p < 0,0001$] e D [$F_{(1,36)} = 28,088$; $p < 0,0001$]; As análises *post-hoc* pelo teste de Tukey indicaram que o pré-tratamento com 7-NI nas doses de 10 e 25,0 mg/kg impediu o desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol. No entanto, as doses de 5,0 e 7,5 mg/kg foram ineficazes, embora o resultado com essa última dose mostrasse uma tendência para o bloqueio (Figura 19).

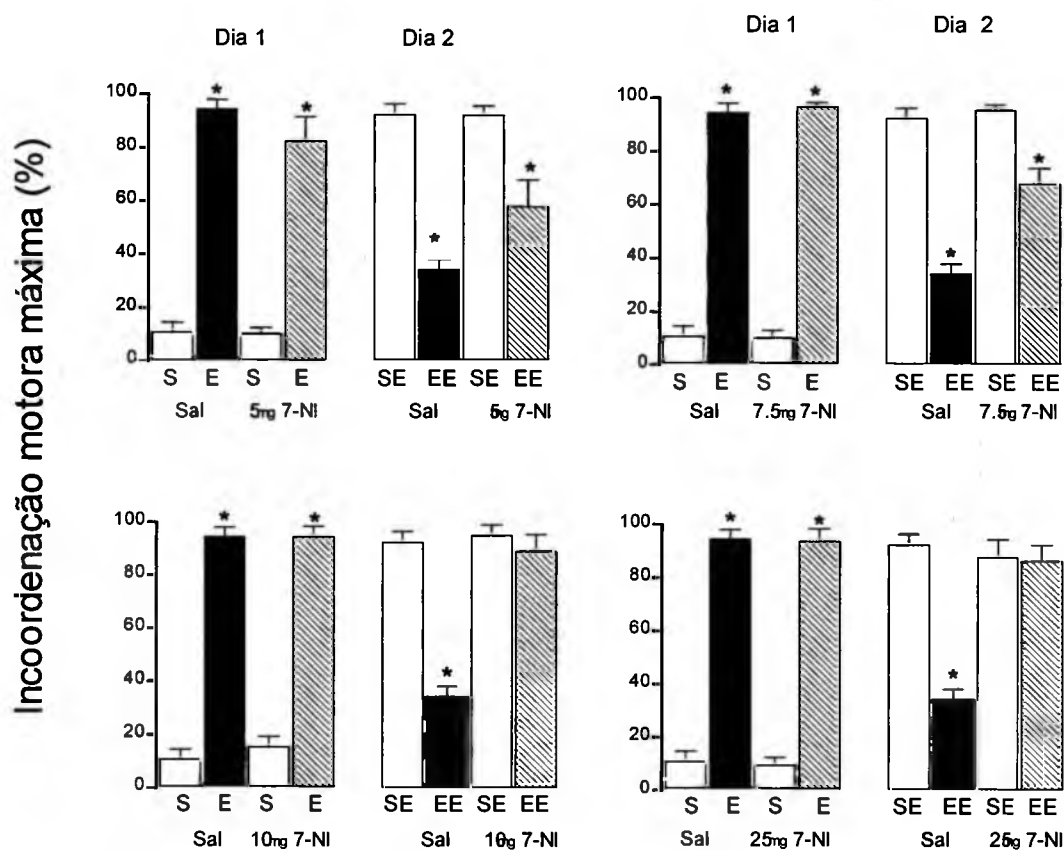


Figura 18. Efeito do 7-nitroindazol no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Oito grupos foram pré-tratados com salina e outros oito receberam 7-NI nas doses de 5,0 (A), 7,5 (B), 10,0 (C) ou 25,0 (D) mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina ou etanol 1,75 g/kg, no Dia 1. No Dia 2, todos os grupos receberam etanol na dose de 1,75 g/kg, i.p. A tolerância rápida ao etanol foi observada, no segundo dia. Resultados são expressos na forma de médias \pm E.P.M. para 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

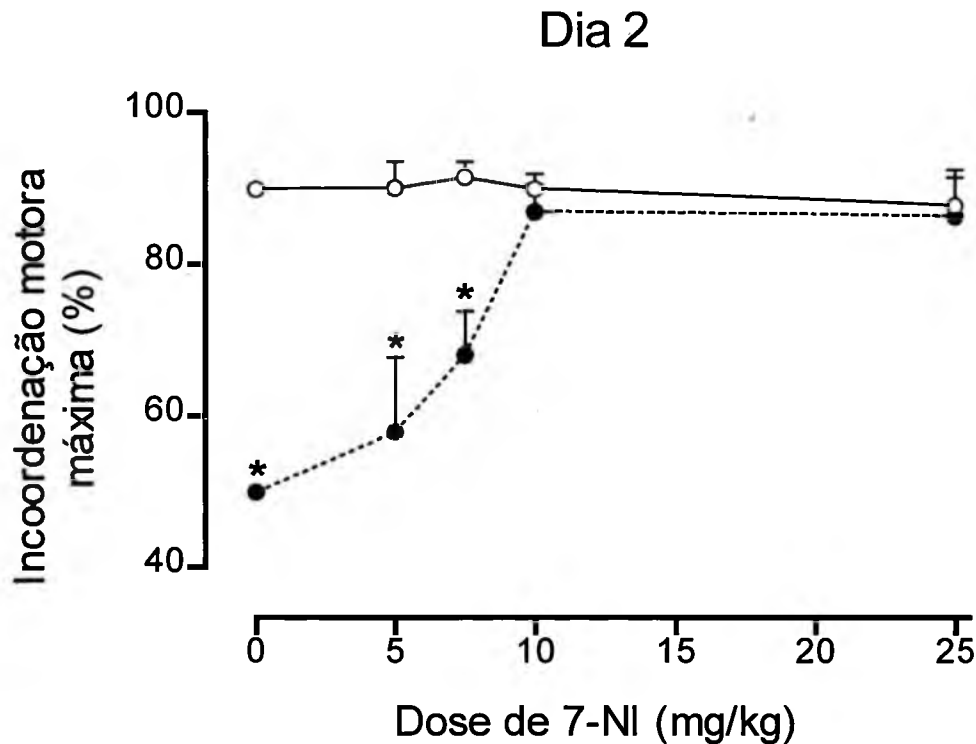


Figura 19. Curva dose-resposta do efeito para diferentes doses de 7-NI sobre a incoordenação motora induzida por etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (○) representa o desempenho do grupo 7-NISE e o símbolo (●) representa o do grupo 7-NIEE no Dia 2 do teste. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 10: Efeito da administração prévia da L-arginina sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo 7-NI.

Procedimentos:

Camundongos, previamente treinados e selecionados no aparelho de rota-rod, foram divididos em dois grupos. O primeiro recebeu como pré-tratamento 1, L-arginina (100,0 mg/kg) e o segundo com salina. Quinze minutos após a administração, metade dos animais de cada grupo recebeu o

pré-tratamento 2 com 7-NI (10,0 mg/kg), e a outra, com salina. Quarenta e cinco minutos após a administração de L-arginina, cada grupo foi dividido em dois subgrupos que receberam o tratamento com etanol (1,75 g/kg) ou salina. Os animais foram submetidos ao rota-rod, cinco minutos após a última injeção. Duas horas após o início do experimento, todos os grupos receberam uma dose adicional de salina ou etanol (1,25g/kg) de acordo com o tratamento recebido antes, e retornaram para as gaiolas. Após 24 horas, todos os animais foram tratados com etanol 1,75 g/kg, sendo novamente testados no rota-rod.

Resultados:

Os resultados desse estudo demonstraram que os animais tratados com etanol, no Dia 1, apresentaram incoordenação motora e os grupos controles pré-tratados, com L-arginina e 7-NI, não apresentaram prejuízo motor (Figura 20). A ANOVA de três vias demonstrou o efeito apenas do tratamento (salina + etanol) [$F_{(1,72)} = 2668,6$; $p < 0,0001$]. No Dia 2, verificou-se que todos os subgrupos SE apresentaram prejuízo motor e os que receberam etanol em ambos os dias (EE) desenvolveram tolerância rápida aos efeitos do etanol, com exceção dos animais tratados com 7-NI, nos quais houve bloqueio da tolerância rápida. A administração com L-arginina, impediu o bloqueio da tolerância rápida causado pelo 7-NI. A ANOVA realizada com os dados obtidos, no Dia 2, demonstrou o efeito do tratamento: [$F_{(1,72)} = 230,31$; $p < 0,0001$]; pré-tratamento 2: [$F_{(1,72)} = 54,31$; $p < 0,0001$]; e da interação pré-tratamento 1 x pré-tratamento 2 x tratamento: [$F_{(1,372)} = 37,70$;

$p < 0,0001$]. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que a injeção de 7-NI bloqueou aquisição da tolerância rápida no dia 2, e que a administração prévia de L-arginina antes do pré-tratamento com 7-NI, impediu esse bloqueio.

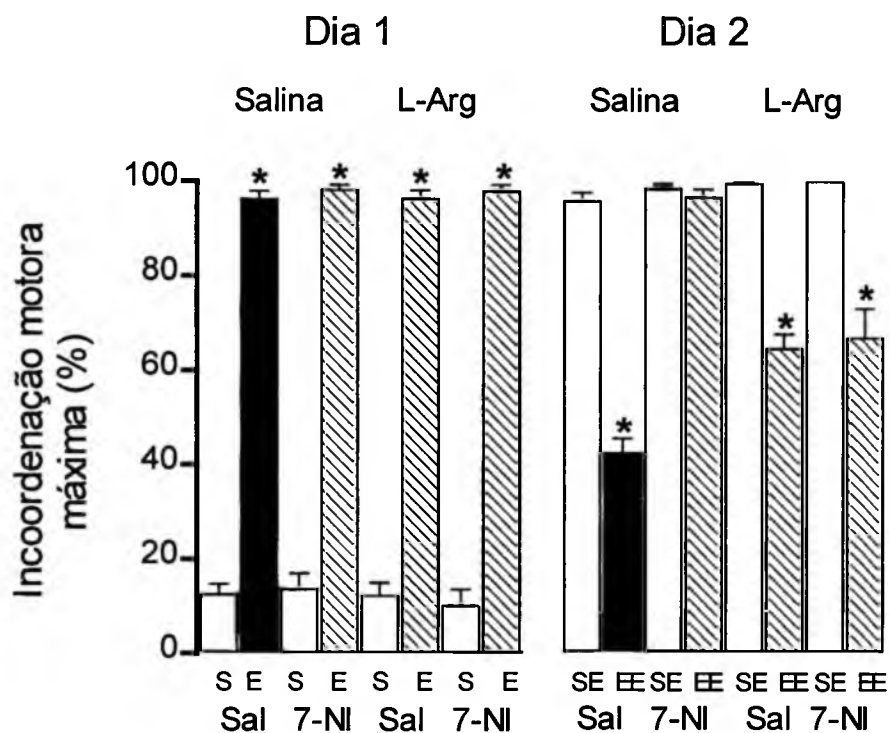


Figura 20 Efeito da administração prévia da L-arginina sobre a interferência da 7-NI na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. Um foi injetado com L-arginina (100,0 mg/kg) e o outro com salina, após a primeira administração, a metade de cada grupo foi tratada com 7-NI (10,0 mg/kg) e a outra com salina. Quarenta e cinco (45) minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol 1,75 g/kg ou salina. Duas horas após a injeção de etanol, os animais receberam a dose adicional. No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol. Resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. para 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 11: *Efeito da administração prévia da D-arginina sobre a interferência da 7-NI na tolerância rápida ao etanol.*

Procedimentos:

O protocolo experimental deste experimento foi igual ao empregado no experimento 10, com exceção da administração da D-arginina em substituição a seu isômero ativo L-arginina.

Resultados:

Os dados da figura 21 demonstram que os animais tratados no Dia 1 com etanol apresentaram incoordenação motora e os grupos controles pré-tratados com D-arginina e 7-NI não apresentaram prejuízo motor. A ANOVA de três vias demonstrou o efeito apenas do tratamento (salina + etanol) [$F_{(1,72)} = 2451,5$; $p < 0,0001$]. No Dia 2, verificou-se que todos os subgrupos salina + etanol (SE) apresentaram prejuízo motor e os grupos nos quais se administrou etanol em ambos os dias (EE), desenvolveram tolerância rápida, exceto os grupos tratados com 7-NI, que apresentaram bloqueio da aquisição da tolerância rápida. A administração de D-arginina previamente ao 7-NI, não impediu o bloqueio da tolerância rápida. A ANOVA demonstrou o efeito do tratamento [$F_{(1,72)} = 106,3823$; $p < 0,0001$], pré-tratamento 1 [$F_{(1,72)} = 12,9363$; $p < 0,0058$]; pré-tratamento 2 [$F_{(1,72)} = 92,1197$; $p < 0,0001$]; e da interação pré-tratamento 1 x pré-tratamento 2 x tratamento [$F_{(1,72)} = 6,5054$; $p < 0,0128$]. Esses resultados sugerem que a injeção de 7-NI bloqueia aquisição da tolerância rápida no Dia 2 e que a administração prévia de D-arginina antes

do pré-tratamento com 7-NI, não é capaz de impedir o bloqueio da aquisição da tolerância rápida.

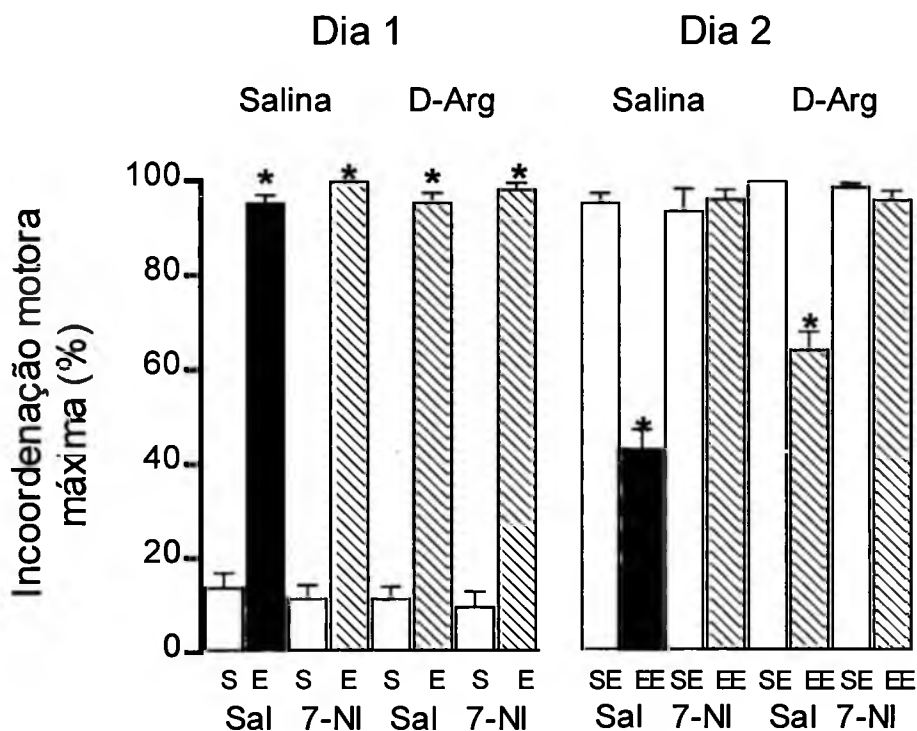


Figura 21 Efeito da administração prévia do D-arginina sobre a interferência da 7-NI na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. O primeiro foi injetado com D-arginina (100,0 mg/kg) e o outro, com salina. Após a primeira administração, a metade de cada grupo foi tratada com 7-NI (10,0 mg/kg) e a outra metade com salina. Quarenta e cinco (45) minutos, após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol 1,75 g/kg ou salina. Duas horas após a injeção de etanol, os animais receberam a dose adicional. No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol. Resultados são expressos na forma de médias \pm E.P.M. para 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 12: *Comparação dos efeitos da administração de 7-nitroindazol antes ou após o teste sobre a tolerância rápida ao etanol.*

Procedimentos:

Para verificar se o bloqueio da tolerância rápida pelo 7-nitroindazol ocorreria, da mesma forma, caso a droga fosse administrada antes ou após o teste no rota-rod, animais treinados e selecionados foram divididos em três grupos: A, B e C. No Dia 1, os grupos A e B foram pré-tratados com salina e o grupo C foi pré-tratado com 7-NI (10,0 mg/kg). Trinta minutos após a primeira administração, cada um dos grupos foi subdividido em dois subgrupos que receberam etanol 1,75 g/kg ou salina, respectivamente. Cinco minutos após a segunda injeção, foram submetidos ao teste do rota-rod, como nos experimentos anteriores. Após o teste, o grupo A e o grupo C receberam uma injeção de salina, e o grupo B recebeu 7-NI. Duas horas após o início do experimento os animais receberam uma dose adicional de salina ou etanol (1,25g/kg), e retornaram para suas gaiolas. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol (1,75 g/kg) e novamente testados no rota-rod, a fim de verificar o desenvolvimento da tolerância rápida e a possível interferência da 7-NI conforme a sua administração anterior ou posterior ao teste do rota-rod.

Resultados:

Na figura 22 estão representados os resultados desse experimento. No Dia 1, os camundongos injetados com etanol apresentaram prejuízo

motor e os administrados com salina não apresentaram alteração na coordenação motora. A administração de 7-NI não alterou a resposta motora produzida pelos grupos tratados com salina ou etanol, no Dia 1. Tanto para os animais administrados com 7-NI antes do tratamento como para aqueles administrados com 7-NI após o tratamento no Dia 1 houve efeito do tratamento [$F_{(1,36)} = 383,16$; $p < 0,0001$] e [$F_{(1,36)} = 544,49$; $p < 0,0001$], respectivamente. Os animais administrados com salina, no Dia 1, apresentaram perda da coordenação motora ao receberem etanol, no Dia 2. Os grupos injetados com etanol nos dois dias (EE), demonstraram desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, com exceção daqueles administrados com 7-NI antes do teste com etanol no Dia 1. Para esse grupo, no segundo dia, a ANOVA demonstrou o efeito do pré-tratamento [$F_{(1,36)} = 20,425$; $p < 0,0001$]; do tratamento [$F_{(1,36)} = 16,752$; $p < 0,0002$]; e da interação pré-tratamento x tratamento [$F_{(1,36)} = 31,408$; $p = 0,0001$]. No entanto, para o grupo que recebeu 7-NI, após o teste, a ANOVA demonstrou apenas o efeito do tratamento [$F_{(1,36)} = 144,41$; $p < 0,0001$]. Os resultados sugerem que o bloqueio exercido pelo 7-NI sobre a tolerância rápida, somente é observado quando essa droga é administrada antes e não após a realização do teste.

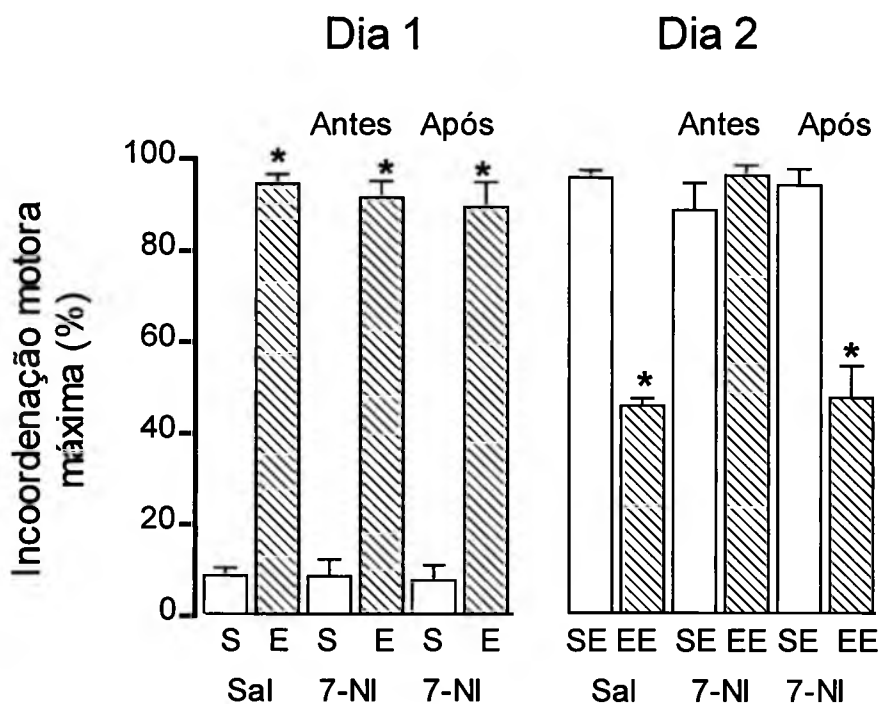


Figura 22: Comparação dos efeitos da administração de 7-NI antes ou após o teste sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em três grupos, sendo que os dois primeiros foram injetados com salina, e o terceiro foi administrado com 7-NI na dose de 10,0 mg/kg. Trinta min. (30) após, cada grupo foi dividido em dois, sendo em um administrado salina e em outro, etanol, e após submetidos ao teste. o segundo grupo foi administrado com 7-NI, (10,0 mg/kg) e os demais com salina. No Dia 2, todos os grupos receberam etanol (1,75 g/kg). Os resultados são expressos na forma de médias \pm E.P.M. para 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 13: Influência da administração de 7-NI nos dias 1 e/ou 2, sobre a tolerância rápida;

Procedimentos:

Considerando a hipótese de que a tolerância rápida tem um componente relacionado com a aprendizagem, existiria a possibilidade de que o bloqueio da tolerância pelo 7-NI pudesse envolver aprendizagem

dependente de estado. Assim, camundongos treinados foram selecionados, sendo que a metade deles recebeu salina e a outra 7-NI (10,0 mg/kg). Trinta minutos após essa administração, os animais foram divididos em dois grupos, sendo num administrado salina e no outro etanol na dose de 1,75 g/kg. Os animais foram testados no aparelho de rota-rod, como descrito anteriormente. Após a administração da dose adicional de salina ou etanol (1,25 g/kg), os animais retornaram para suas gaiolas-moradia. No segundo dia do teste, cada um dos grupos tratados com salina ou etanol no Dia 1, foi novamente dividido em dois; um deles recebeu salina e o outro, 7-NI. Após trinta minutos, todos os grupos foram tratados com 1,75 g/kg de etanol e retestados no aparelho de rota-rod. Desta forma, foram submetidos ao teste um grupo experimental pré-tratado com 7-NI apenas no Dia 1, outro grupo experimental pré-tratado com 7-NI, nos Dias 1 e 2, e outro somente, no Dia 2.

Resultados:

A figura 23, demonstra o efeito do pré-tratamento com 7-NI nos Dias 1 e Dia 2. No Dia 1, todos os grupos pré-tratados com salina não apresentaram perda da capacidade motora, enquanto os tratados com etanol apresentaram prejuízo motor significativo [$F_{(1,72)} = 1599,3$; $p < 0,0001$]. O pré-tratamento com 7-NI não alterou o efeito do etanol na coordenação motora dos animais. No Dia 2, os animais tratados com salina no Dia 1, ao receberem etanol apresentaram prejuízo motor significativo, e os tratados com etanol em ambos os dias (EE) desenvolveram a tolerância rápida, exceção feita aos

grupos tratados com 7-NI, previamente, ao etanol no Dia 1. A ANOVA de três-vias demonstrou o efeito do tratamento [$F_{(1,72)}= 44,3145$; $p<0,0001$], do pré-tratamento 1 (7-NI injetado no Dia 1) [$F_{(1,36)}= 48,9918$; $p<0,0001$] mas não do pós-tratamento (7-NI injetado no Dia 2) e do pré e pós-tratamento (7-NI injetados nos Dias 1 e 2). A ANOVA demonstrou também o efeito da interação pré-tratamento 1 x tratamento [$F_{(1,36)}=32,5695$; $p<0,0001$]. A análise *post hoc* sugere que o bloqueio exercido pelo 7-NI sobre a tolerância rápida não é dependente de estado, já que não foi alterado quando os animais receberam 7-NI em ambos os dias de experimento. Além disso, esse bloqueio somente ocorre quando o 7-NI é administrado, previamente ao teste no Dia 1 não havendo interferência na tolerância quando essa droga é injetada apenas no Dia 2.

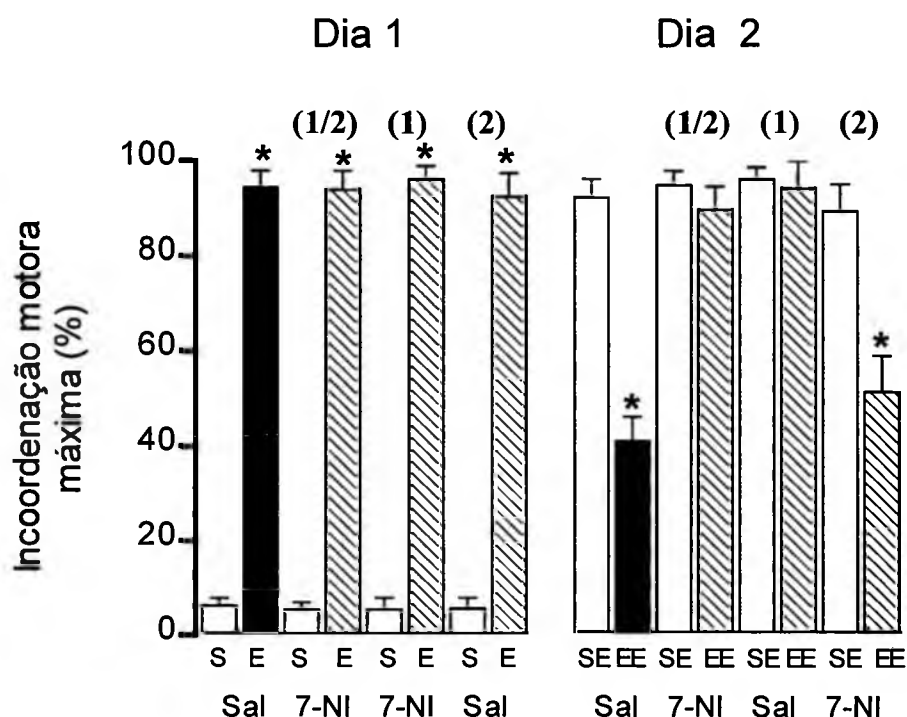


Figura 23. Influência da administração de 7-NI no Dia 1 e/ou Dia 2 sobre a incoordenação motora ao etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. Quatro grupos de animais receberam salina e outros quatro 7-NI, após trinta minutos, dois grupos administrados com salina ou 7-NI receberam etanol (1,75 g/kg) e os demais salina. No Dia 2, os grupos tratados com salina e etanol no Dia 1 receberam um pré-tratamento de salina ou 7-NI e trinta minutos após essa administração todos os animais receberam etanol e foram retestados no rota-rod. Os resultados são expressos na forma de médias \pm E.P.M. para 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 14: Dosagem de Álcool

Para verificar se o tratamento com 7-NI, L-arginina ou D-arginina, interfere nos níveis de etanol, seis grupos foram submetidos aos seguintes tratamentos: salina + salina + etanol (**SSE**); salina + 7-NI + etanol (**S7-NIE**); L-arginina + salina + etanol (**L-argSE**); L-arginina + 7-NI + etanol (**L-arg7-NIE**); D-arginina + salina + etanol (**D-argSE**); D-arginina + 7-NI + etanol

(D-arg7-NIE). Após 15 minutos o sangue foi colhido e a dosagem alcóolica realizada como descrito no procedimento geral.

Resultados:

A ANOVA de duas vias revelou que não existem diferenças significativas, entre os grupos. Esses dados sugerem que os efeitos dessas drogas na tolerância não devem interferir, na farmacocinética do etanol, pois a concentração sangüínea de etanol foi similar entre os grupos.

Tabela 1. O efeito da concentração de etanol no sangue de camundongos no teste do rota-rod. Três grupos de animais receberam salina, L-arginina e D-arginina, após 15 minutos, os grupos foram subdivididos em dois, sendo injetados com salina ou 7-NI. Após 30 minutos todos os grupos receberam etanol (1,75 g/kg). Resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 4 animais por grupo.

GRUPOS	[] de etanol (mg/%)
SSE	137,75 \pm 7,728
S7-NIE	141,75 \pm 5,391
L-argSE	142,75 \pm 4,854
L-arg7-NIE	130,25 \pm 7,962
D-argSE	129,50 \pm 6,198
D-arg7-NIE	111,00 \pm 2,483

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários modelos experimentais têm sido usados para o estudo da tolerância ao etanol (Morato e Khanna, 1996). A tolerância à incoordenação motora produzida pelo etanol pode ser facilitada em animais que têm a oportunidade de praticar uma tarefa enquanto intoxicado (Chen, 1968; LeBlanc *et al.*, 1973; Bitrán e Kalant, 1991). Grupos de ratos tratados com etanol, diariamente, antes de um teste, conseguem desenvolver tolerância a esta tarefa, mais rapidamente, que os grupos tratados com várias injeções diárias de etanol, após o teste. Portanto, a prática da tarefa sob a influência de etanol é um fator importante dentro do desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol. Khanna *et al.*, 1991a, mostraram que os estudos de tolerância rápida servem como um índice para tolerância crônica e para tolerância cruzada (Khanna 1992a; 1994a). O fenômeno designado de tolerância rápida, foi observado também em relação à hipotermia causada pelo etanol em camundongos (Crabbe *et al.*, 1979) e em ratos (Lê e Kiianmaa, 1988). Bitrán e Kalant (1991) demonstraram que a aprendizagem também possui um papel importante no desenvolvimento da tolerância aguda e da tolerância rápida ao etanol.

A arginina vasopressina, uma droga capaz de facilitar a aprendizagem comportamental (De Wied e Bohus, 1979), facilitando também a manutenção da tolerância ao etanol (Hoffman *et al.*, 1978; Lê *et al.*, 1982; Wu *et al.*, 1994). Ratos tratados com arginina-vasopressina e etanol, desenvolveram

tolerância à incoordenação motora induzida pelo etanol, durante quatro semanas. Essa facilitação da tolerância foi impedida por um antagonista do receptor V1 da vasopressina, injetado previamente à arginina-vasopressina e etanol (Wu *et al.*, 1996).

Baseando-se nesses dados, a influência da aprendizagem na tolerância ao etanol tem sido sugerida e amplamente investigada, utilizando-se diferentes modelos experimentais em ratos. Uma das formas de investigação desta possibilidade é uso o de drogas que prejudicam a aprendizagem e memória, como os antagonistas do receptor NMDA (Uchihashi *et al.*, 1994; Verma e Morghaddam, 1996), e a sua influência na aquisição da tolerância aos efeitos do etanol (Khanna *et al.*, 1991b; 1992b). Khanna *et al.*, (1993a) demonstraram o envolvimento dos receptores NMDA, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, em animais pré-tratados com antagonistas do receptor NMDA, sendo que a utilização de agonistas deste receptor diminuem a sensibilidade causada pela administração aguda de etanol (Daniell, 1991).

Neste estudo, foram realizados vários experimentos, com o intuito de caracterizar o desenvolvimento da tolerância rápida em camundongos, quando avaliados no rota-rod. Segundo Bogo, *et al.* (1981) a utilização do aparelho de rota-rod, com aceleração, é um indicador seguro para demonstrar a neurotoxicidade central/periférica em animais de laboratório. Inicialmente, averiguou-se o efeito agudo de diferentes doses de etanol, ao longo de

intervalos de tempo de observação. Verificou-se que o prejuízo motor causado nos animais pelo etanol foi dependente da dose, e que todos os grupos apresentaram sua maior perda de capacidade motora cinco minutos após a administração do etanol. Com exceção dos animais tratados com etanol, na maior dose (2,25 g/kg), os demais apresentaram sinais de recuperação ao longo dos intervalos do teste.

Em relação ao estudo das doses mais adequadas para obtenção da tolerância rápida, no protocolo proposto, verificou-se que as doses de 3,0 ou 4,0 g/kg de etanol administradas no Dia 1 produzem tolerância no Dia 2. No entanto, foi necessário subdividir as doses, administrando-as uma antes do teste e outra após o teste, adicional. Assim, empregou-se 1,50 e 1,75 g/kg, antes do teste e uma dose adicional de 1,50 e 1,25 g/kg totalizando 3,0 g/kg de etanol. Esse protocolo experimental com doses subdivididas, também, foi adotado por Khanna *et al.*, 1991a. A dose de 1,75 + 1,25 g/kg de etanol foi escolhida como a dose padrão, para ser usada no estudo da possível interferência de outras drogas sobre a tolerância rápida ao etanol, por demonstrar de forma mais evidente a manifestação do fenômeno da tolerância. Khanna *et al.*, (1991a) consideram que a administração de doses superiores a 2,0 g/kg, em ratos, nem sempre atinge a parte linear da curva dose resposta ao etanol, demonstrando que a utilização de uma dose total de 4,0 g/kg de etanol (2,3 + 1,7) se faz necessária para o desenvolvimento da tolerância nessa espécie. No presente estudo, verificou-se através de um experimento complementar que não existiram diferenças estatisticamente significativas

entre os grupos tratados com 1,75 g/kg e que receberam doses adicionais de 1,25 ou de 2,25 g/kg, completando doses totais de 3,0 ou 4,0 g/kg de etanol, respectivamente. Entretanto, um outro estudo, utilizando várias doses adicionais de etanol, inferiores a 1,25 g/kg, sugere que a dose de 3,0 g/kg se faz necessária para o desenvolvimento da tolerância rápida com o nosso protocolo.

É interessante observar que a administração de dose única de 3,0 g/kg de etanol antes do teste do Dia 1, não produziu tolerância significativa no segundo dia do teste (dados não apresentados). Considerando-se a hipótese de que o desenvolvimento da tolerância ao etanol está em parte associado à aprendizagem, a prática de uma tarefa, enquanto intoxicado, é fundamental para o desenvolvimento da tolerância (Lê *et al.*, 1987, Khanna *et al.*, 1994a). No entanto, a administração de doses elevadas de etanol parece impossibilitar o desenvolvimento da tolerância. O estudo comparativo entre camundongos machos e fêmeas produziu resultados muito semelhantes, sugerindo que o fator sexo parece não influenciar a aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora, causada pelo etanol.

Uma vez caracterizada a tolerância rápida em camundongos deu-se prosseguimento ao estudo sobre o papel do sistema receptor NMDA nesse modelo. Há evidências de que o sistema receptor NMDA está envolvido com processos de aprendizagem e memória através da expressão e da manutenção de uma das formas de PLD (Morris *et al.*, 1986). Além disso, os

diferentes tipos de tolerância rápida, aguda e crônica sofrem influência da aprendizagem (Bitrán e Kalant, 1991; Lê *et al.*, 1987; 1989; Crabbe *et al.*, 1979).

A hipótese de que antagonistas não competitivos do receptor NMDA podem interferir na aquisição da tolerância ao etanol, em diferentes testes de coordenação motora, tem sido amplamente discutida (Morato e Khanna, 1996). O receptor para glutamato tipo NMDA possui um papel muito importante dentro dos processos neuroadaptativos, associado com o desenvolvimento da tolerância ao etanol (Karcz-Kubicha e Liljequist, 1995). A cetamina é um análogo da fenciclidina (De Sarro e De Sarro 1993) capaz de bloquear o receptor NMDA (Collingridge e Singer, 1990; Venable e Kelly, 1990). Uma vez que a cetamina prejudica a aprendizagem (Lees, 1995), investigações feitas em ratos mostraram o bloqueio do desenvolvimento da tolerância rápida e crônica ao etanol pela cetamina (Khanna *et al.*, 1991b; 1992b) mas não da tolerância aguda ao etanol (Khanna *et al.*, 1992d).

Vários estudos têm demonstrado que a administração de antagonistas seletivos do receptor NMDA como (+)MK-801, previamente ao teste no Dia 1, bloqueiam o desenvolvimento da tolerância no teste do "tilt plane", e que a sua administração, após o teste no dia 1, não afeta o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (Khanna *et al.*, 1992b; 1992d). Rafi-Tari *et al.*, (1996) também mostraram que o pré-tratamento com dizolcilpina previne o desenvolvimento da tolerância ao etanol, avaliada no teste do labirinto

circular. O bloqueio da tolerância rápida ao etanol, pela cetamina e (+)MK-801, parece ser farmacodinâmico ao invés de farmacocinético, já que estas drogas não interferem com o metabolismo do etanol (Khanna *et al.*, 1993a). Por outro lado, como o (-) MK-801 não bloqueia tolerância rápida, estes dados sugerem que o bloqueio sobre o sistema receptor NMDA é específico.

Trujillo e Akil (1991; 1995) e Szabó *et al.*, (1994) relataram que antagonistas do receptor NMDA previnem o desenvolvimento da tolerância aos vários efeitos do etanol e opiáceos, em camundongos, sugerindo a importância do sistema para diferentes drogas, e que a dose usada para bloquear a tolerância rápida em um estudo, é semelhante àquela usada para prejudicar a aprendizagem (Uchihashi *et al.*, 1994; Kant *et al.*, 1991). Propuseram, também, que a aprendizagem pode estar envolvida na tolerância rápida ao etanol. Karcz-Kubicha e Liljequist (1995) argumentaram que o bloqueio, exibido por antagonistas do receptor NMDA, sobre a tolerância ao etanol pode, não ter necessariamente, um relação direta com a interferência com a aprendizagem.

No presente estudo, utilizando dois antagonistas não-competitivos do receptor NMDA, a cetamina e o MK-801, verificou-se que a administração destes bloqueadores, previamente à administração de etanol, impede a aquisição da tolerância rápida a incoordenação motora causada pelo etanol em camundongos submetidos ao aparelho de rota-rod. O bloqueio por antagonistas do receptor NMDA sobre a tolerância rápida ao etanol foi obtido

com doses que não interferiram com a coordenação motora dos grupos controle no primeiro dia do teste, em todo o período de observação. Também não se observou nenhum efeito residual sobre a coordenação motora dos animais, no Dia 2.

A cetamina e o (+)MK-801 foram capazes de prevenir o desenvolvimento da tolerância rápida, de forma dependente da dose, ou seja, a dose de 1,0 mg/kg de cetamina se mostrou ineficaz no bloqueio da tolerância rápida ao etanol, a dose de 1,5 mg/kg demonstrou uma tendência em inibir a tolerância, enquanto que doses de 2,5 e 5,0 mg/kg bloquearam totalmente o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, sem apresentar diferenças estatísticas entre elas. Resultados semelhantes aos obtidos com a cetamina foram encontrados com os grupos pré-tratados com (+)MK-801. A inibição da tolerância rápida aos efeitos do etanol, deu-se com doses de 0,030 e 0,060 mg/kg de (+)MK-801. A dose de 0,020 induziu um bloqueio parcial e a dose 0,015 não impediu o desenvolvimento de tolerância. No entanto, o mesmo efeito não foi obtido com o seu isômero menos ativo (-)MK-801. As doses de (+)MK-801 e (-)MK-801 usadas não alteraram a performance dos animais, os quais apresentaram resultados similares aos grupos controle (SS), indicando que as alterações de performance observadas em ambos os dias do teste, devem ser atribuídas a administração de etanol.

Entretanto, em um outro experimento, a associação desta droga com etanol produziu vários efeitos que não foram observados nos grupos tratados

com salina + etanol. A dose de 0,125 mg/kg de (+)MK-801 causou uma fase inicial de excitação, seguida de uma elevada depressão motora, que impediu a manipulação dos animais para o teste. Existem dados, na literatura, mostrando que ratos submetidos ao teste do "tilt plane", não apresentaram tolerância rápida ao serem tratados com doses superiores a 0,125 mg/kg de (+)MK-801 (Khanna *et al.*, 1993a). Muito embora a cetamina e o MK-801, sejam antagonistas não competitivos no mesmo sítio receptor NMDA (Meldrum, 1991), essas drogas apresentam diferenças em relação a suas meia-vidas, potências e ações. No presente estudo usou-se um protocolo diverso daquele utilizado nos estudos de coordenação motora com ratos. O MK-801 apresenta um período de ação (Schwartz e Wasterlain, 1991; Hucker *et al.*, 1983) menor do que o da cetamina (Malinovsky *et al.*, 1996; Pedraz *et al.*, 1991; White *et al.*, 1975) sendo que estes efeitos são melhor evidenciados quando se diminuí os intervalos de tempo das avaliações, como no presente estudo. Isto sugere uma influência da espécie animal, do modelo experimental e/ou do protocolo nas medidas da tolerância rápida. Este estudo não oferece uma conclusão definitiva com relação a esta questão, mas fornece suporte para a hipótese de que o sistema receptor NMDA está envolvido ao desenvolvimento da tolerância ao etanol.

Uma vez que o receptor NMDA e o NO estão envolvidos nos processos de aprendizagem e memória, como a manutenção da PLD (e.g. Collingridge *et al.*, 1992) e que a tolerância pode sofrer influências do aprendizado (Bitrán e Kalant, 1991), a inibição da tolerância rápida por

antagonistas NMDA pode levar à hipótese de que o NO também possa participar da aquisição da tolerância.

A descoberta do óxido nítrico, como mensageiro intracelular, estimulou novos conceitos sobre a plasticidade sináptica, do SNC (Kuriyama e Ohkuma, 1995; Hölscher, 1997a; 1997b). Considerando a influência da via do óxido nítrico sobre a aprendizagem e memória (Morato e Khanna, 1996) e que a utilização de bloqueadores da sintase do óxido nítrico pode afetar o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol em ratos. Entretanto, esses bloqueadores não são seletivos para NOS_n, atuando sobre outras regiões, como é o caso da L-nitroarginina e da L-NAME, que também inibem a NOS_e, proporcionando uma vasoconstrição. (Khanna *et al.*, 1993c; 1995b), este estudo se propôs a demonstrar a possível interferência da administração de um inibidor seletivo da sintase do óxido nítrico neuronal, o 7-nitroindazol, sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.

O 7-nitroindazol é uma droga que não afeta a pressão sangüínea em concentrações moderadas (Babbedge *et al.*, 1993) e inibe, preferencialmente, a sintase neuronal do óxido nítrico *in vivo* (Moore *et al.*, 1993) e a sintase neuronal e endotelial do óxido nítrico *in vitro*, é capaz ainda de inibir convulsões causadas pela administração de cocaína e NMDA em camundongos (Moore e Bland-Ward, 1996). Foi possível observar que a administração prévia de várias doses de 7-NI não interfere na coordenação

motora dos grupos controle e nem são capazes de potencializar o prejuízo motor causado pelo etanol.

Os resultados indicam que o pré-tratamento com 7-NI, no Dia 1, não acarreta nenhum efeito residual sobre a incoordenação motora dos animais, no Dia 2, pois não existem diferenças nos valores basais dos animais. Além disso, o 7-NI não interferiu com a incoordenação motora causada pelo etanol, no Dia 2, nos animais controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Khanna e colaboradores, (1993c, 1995b), usando outros bloqueadores da sintase do óxido nítrico, como a L-NAME e a L-nitroarginina, sobre a tolerância rápida aos efeitos do etanol em ratos, utilizando o teste do "Tilt plane", (outro modelo aplicado para medir a coordenação motora dos animais). Um outro estudo feito por Hölscher *et al.*, (1997a), utilizando ratos tratados com 7-NI, mostrou um prejuízo na aprendizagem, avaliada, no "water maze" e no labirinto circular. Esses dados reforçam a relação entre a aprendizagem e tolerância.

O bloqueio exercido pelo 7-NI no desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol, foi dependente da dose. As doses de 5,0 e 7,5 mg/kg de 7-NI mostraram-se ineficazes no bloqueio da tolerância rápida ao etanol. Entretanto, parece que a dose de 7,5 mg/kg causou um bloqueio parcial da tolerância, uma vez que os valores de incoordenação motora apresentados foram intermediários entre os valores dos grupos controle e dos grupos tratados com doses maiores de 7-nitroindazol. Não houve diferenças

estatísticas entre os efeitos produzidos pelas doses de 10 e 25 mg/kg de 7-NI. Ambas bloquearam totalmente o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, sugerindo que a administração de 7-NI interfere nos processos relacionados com a aquisição da tolerância ao etanol.

A partir desses resultados, prosseguiu-se o estudo sobre o papel do sistema do óxido nítrico no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, utilizando-se somente a dose de 10 mg/kg de 7-nitroindazol. A L-arginina é o substrato para a formação de óxido nítrico através da atuação da enzima NOS (Lancaster, 1992). O efeito da administração de L-arginina, previamente à administração do inibidor da enzima NOS, foi investigada com o intuito de impedir o bloqueio da aquisição da tolerância rápida pelo 7-NI. Os resultados mostraram que o tratamento prévio com 100 mg/kg de L-arginina foi capaz de evitar o bloqueio da tolerância causado pela administração de 10 mg/kg de 7-nitroindazol, no segundo dia, em camundongos tratados com etanol. A dose de L-arginina, utilizada para impedir o bloqueio da sintase do óxido nítrico neuronal não alterou significativamente a coordenação motora do grupo controle (L-arg/S/E), no Dia 1. Outra observação importante, no primeiro dia do teste, foi de que não existir diferença significativa entre os grupos controle e experimentais, indicando que qualquer alteração observada entre os grupos estaria sendo causada pela administração de etanol.

No Dia 2, observou-se que a dose de 100,0 mg/kg de L-arginina bloqueou significativamente, a ação da 7-NI, permitindo o desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol. O fato da administração prévia da L-arginina impedir o efeito inibitório do 7-NI sobre a tolerância, sem afetar, o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, fortalece as hipóteses de que o óxido nítrico esteja envolvido com os processos adaptativos do desenvolvimento da tolerância. Observou-se ainda que, ao comparar o bloqueio da tolerância rápida obtida pelo grupo controle (L-arg -EE) com o grupo pré-tratado com L-arginina + 7-NI (L-arg-7-NIE), existe uma diferença significativa entre eles. Algumas hipóteses podem ser formuladas a esse respeito: por exemplo, a dose de 100,0 mg/kg de L-arginina, utilizada para impedir o bloqueio do 7-NI, pode ser uma dose baixa, já que outros estudos da literatura mostram que a utilização prévia de uma dose excessiva de L-arginina (750,0 mg/kg) impede completamente o efeito inibitório da L-nitroarginina, (um bloqueador da NOS) (Khanna *et al.*, 1993c); a outra possibilidade, seria que este “bloqueio parcial”, causado pela administração de L-arginina, não esteja relacionado somente com a via do óxido nítrico. No entanto, a conversão da L-arginina em óxido nítrico é específica e o seu análogo, a D-arginina, não serve como substrato para formação de óxido nítrico (Moncada *et al.*, 1991). O experimento posterior demonstrou que a utilização do isômero inativo da D-arginina, nas mesmas doses, não foi capaz de impedir o bloqueio da tolerância rápida, sugerindo que o efeito da L-arginina sobre a tolerância é resultado da inibição da sintase do óxido nítrico, e que esse bloqueio é estereoseletivo.

Comparando os grupos controle L-arginina e D-arginina, no Dia 2, observou-se que os dados obtidos entre esses grupos se assemelham. A arginina possui várias propriedades bioquímicas e farmacológicas, e está presente em vários processos, tanto fisiológicos quanto patológicos (Moncada *et al.*, 1991), e esta interferência no bloqueio da tolerância pode ter sido causada em parte, por outras ações da arginina, independentes do seu papel na via do óxido nítrico. A dosagem alcóolica revelou que a administração de 7-NI, L-arginina e D-arginina não alterou, significativamente, os níveis de etanol no sangue, em comparação ao grupo controle com etanol.

Como já mencionado, estudos prévios demonstraram que a aprendizagem é um fator importante para o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (Bitran e Kalant, 1991) e que a utilização de inibidores da NOS podem inibir a PLP (Haley, 1992; Izquierdo, 1994), causando prejuízo da aprendizagem e memória (Chapman *et al.*, 1992). Ratos tratados, cronicamente, durante cinco dias com um inibidor da NOS mostraram alteração da capacidade de aprendizagem e retenção da memória espacial no teste da plataforma visível (Estall *et al.*, 1993).

Yamada e colaboradores (1995) investigaram os efeitos da administração da L-NAME e D-NAME sobre a aprendizagem e memória, verificando a performance de ratos sobre o labirinto radial. Os resultados revelaram que os animais tratados, diariamente, com L-NAME tiveram

prejuízo motor dose-dependente e aumento no número de erros, enquanto os animais tratados com D-NAME não apresentaram alteração da sua performance. Além disso, administrando outro inibidor da NOS, a L-Mearg, i.c.v. (inibidor da NOS), Huang e Lee (1994) demonstrou o papel do NO hipocampal na retenção da memória, em ratos submetidos ao teste da esQUIVA passiva.

Se a tolerância rápida dependesse de algum processo que ocorresse, durante o teste no primeiro dia, a administração de 7-NI, após o teste, não afetaria a tolerância rápida. Assim, verificou-se o efeito do 7-NI na tolerância rápida, em duas situações: injetando 7-NI, num grupo de animais antes do teste e no outro após o teste, no Dia 1. No segundo dia do teste (Dia 2), observou-se o bloqueio da tolerância rápida no grupo administrado com 7-NI, previamente ao etanol, antes de ser submetido ao rota-rod, confirmando os experimentos anteriores. No entanto, o grupo que recebeu 7-NI, após o teste do rota-rod, desenvolveu tolerância rápida. Assim, o 7-nitroindazol só é capaz de prevenir a tolerância rápida se for injetado no animal antes da prática enquanto intoxicado, no Dia 1. Esses resultados vão ao encontro dos resultados de Khanna *et al.*, (1995b), que utilizou a administração de L-nitroarginina, previamente, e posteriormente, ao teste do "tilt plane", em ratos.

Um estudo complementar a este resultado foi realizado com o intuito de verificar se a interferência causada pelo 7-NI sobre a tolerância rápida,

estaria relacionada com o aprendizado dependente de estado. Os resultados demonstraram que os camundongos pré-tratados com 7-NI, no Dia 1, não apresentaram tolerância. Já os camundongos que receberam a droga, somente no Dia 2, desenvolveram a tolerância à incoordenação motora causada pelo etanol, comprovando resultados anteriores, com relação à necessidade do tratamento ser realizado, antes da prática intoxicada. Os animais pré-tratados com 7-NI, em ambos os dias (Dia 1 e Dia 2), não apresentaram tolerância rápida, e os resultados foram similares ao do grupo administrado com 7-NI, somente no Dia 1.

Esses resultados sugerem que o bloqueio da tolerância rápida ao etanol não deve estar relacionado com um aprendizado, dependente de estado, pois a administração de 7-NI, no segundo dia do teste, não foi capaz de influenciar na tolerância rápida. Desta forma, este experimento confirmou a participação da NOS neuronal no desenvolvimento da tolerância rápida, e ainda mostrou que o bloqueio da tolerância rápida está relacionado com algum processo que ocorre durante o teste, sob efeito do álcool, no dia 1. Esses resultados sugerem que o óxido nítrico e o receptor NMDA possuem um papel importante dentro da plasticidade sináptica, e ainda reforçam a hipótese de que o aprendizado possa estar envolvido na tolerância.

CONCLUSÕES

Em nosso estudo foram realizados vários experimentos com intuito de caracterizar o desenvolvimento da tolerância rápida em camundongos. Houve desenvolvimento de tolerância rápida para a incoordenação motora induzida por etanol na dose de 1,75 +1,25 g/kg (3,0 g/kg). Não foram observados diferenças estatísticas no desenvolvimento da tolerância rápida induzida pelas doses totais de 3,0 g/kg e 4,0 g/kg de etanol, nem entre camundongos machos e fêmeas testados com 1,75 g/kg;

A tolerância rápida para os efeitos do etanol foi bloqueada pelos antagonistas do receptor NMDA, cetamina (2,5 e 5,0 mg/kg) e (+) MK-801 (0,030 e 0,060 mg/Kg), de modo dependente da dose, mas não pelo isômero menos ativo (-)MK-801. sugerindo que o bloqueio é estereoespecífico;

A administração do 7-nitroindazol (10,0 e 25,0 mg/kg), bloqueador da NOS neuronal, interferiu com o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, de forma dependente da dose. O tratamento com L-arginina, previamente ao 7-nitroindazol, foi capaz de impedir o bloqueio do desenvolvimento da tolerância rápida, este efeito não foi observado com seu isômero D-arginina, sugerindo que o efeito do 7-nitroindazol sobre a tolerância é resultado da inibição da óxido nítrico sintase.

O 7-nitroindazol bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida quando administrado, antes do teste, no Dia 1, mas não quando administrado após o teste, sugerindo que essa droga interfere com processos que ocorrem durante o teste, sob efeito do etanol no primeiro dia.

O bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo 7-nitroindazol, provavelmente, não se relaciona com um aprendizado dependente de estado, pois a tolerância foi bloqueada com a administração de 7-nitroindazol antes do etanol no primeiro dia do teste ou em ambos os dias. Além disso, a administração de 7-nitroindazol apenas no segundo dia, não foi capaz de impedir o desenvolvimento da tolerância ao etanol.

Os resultados do presente estudo sugerem que o sistema receptor NMDA e o óxido nítrico participam do desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

ABSTRACT

Several studies have emphasized the role of learning in the development of rapid and chronic tolerances. Recently, it was shown that NMDA antagonists block the development of tolerance to ethanol in rats submitted to the tilt-plane apparatus. The present study examines the generality of this inhibition by using mice submitted to the rota-rod test. Mice were tested in the rota-rod apparatus at 5, 10 and 15 min. after intraperitoneal ethanol injections. Maximum motor impairment was obtained 5 min. after ethanol injections. Initially, we evaluated the time course of acute effects of different doses of ethanol (1.0 - 2.25 g/kg) in the rota-rod test and the most effective dose of ethanol to produce RT was chosen. Mice were injected on Day 1 with ethanol (1.0 - 1.75 g/kg) or saline and tested on the rota-rod. After 24 h, all groups were injected with the same doses of ethanol and tested as in the previous day. In a second step, we investigated whether ketamine (1.0 - 5.0 mg/kg) injected before ethanol on Day 1 influenced the development of RT to ethanol and compared the influence of the (+) and (-)MK-801 isomers (0.015 - 0.060 mg/kg) on RT to ethanol. Pretreatment of animals with ketamine or with (+)MK-801 significantly blocked the development of RT. The (-)MK-801 isomer did not affect RT, suggesting that the blockade by MK-801 is stereospecific. Considering the influence of the NMDA receptors and of NO on the acquisition of learning and the numerous resemblances between learning and tolerance, we investigated whether the blockade of NO synthase could affect the development of RT to ethanol in the same model. It was observed that RT to the motor incoordinating effect of ethanol in mice was blocked by pretreatment with 7-nitroindazole (7-NI), a neuronal nitric oxide synthase inhibitor. Furthermore, administration of NO substrate L-arginine reversed the inhibitory action of 7-NI on tolerance development. This effect seems to be specific, because pretreatment with D-arginine did not antagonize the development of RT. Moreover, the blockade of rapid tolerance by 7-NI seems to be unrelated to state dependent learning, since the administration of before ethanol on both Days 1 and 2 produced similar results as produced by administration of 7-NI before ethanol only on Day 1. The injection of 7-NI before ethanol only on Day 2 did not affect rapid tolerance. Our results confirm and extend previous studies showing that NMDA receptor antagonists block RT to the motor impairment produced by ethanol in other animals tested in different models. Taken together these results strength the hypothesis that learning could be involved in the development of rapid tolerance to ethanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, P.H. e PETERS, J.A. Receptor and ion channel nomenclature, *Supt Trends Pharmacol Sci*, 1997.
- ALLAN, A.M.; MAYES, C.G. e DRASKI, L.J. Gamma-aminobutyric acid-activated chloride channels in rats selectively bred for differential acute sensitivity to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 15 (2): 212-218, 1991.
- ALLAN, A.M. e HARRIS, R.A. Acute and chronic ethanol treatments alter GABA receptor-operated chloride channels. *Pharmacol Biochem Behav*, 27: 665-670, 1987.
- ASCHER, P. e NOWAK, L. Electrophysiological studies of NMDA receptors. *Trends Neurosci*, 10: 284-288, 1987.
- BABBEDGE, R.C.; BLAND-WARD, P.A.; HART, S.L. e MOORE, P.K. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitroindazole and related substituted indazoles. *Br J Pharmacol*, 110: 225-226, 1993.
- BARNARD, E.A. Ionotropic glutamate receptors: new types and new concepts. *Trends Neurosci*, 18: 141-147, 1997.
- BERTOLETE, J.M. Alcoolismo: doença ,vício ou.....? Contribuição ao estudo do quadro clínico do alcoolismo o registro triaxial dos problemas físicos, psicológicos e sociais de saúde do alcoolista. (Tese de doutoramento) Porto Alegre: UFRG, 1992.
- BITRÁN, M. e KALANT, H. Learning factor in rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment. *Pharmacol Biochem Behav*, 39: 917-922, 1991.
- BOGO, V.; HILL T. A. e YONG, R.W. Comparison of the accelorod and rotarod sensitivity in detecting ethanol and acrylamide-induced performance decrement in rats: Review of experimental considerations of rotating rod systems. *Neurotoxicol*, 2: 765-787, 1981.
- BROWN, Z.W. e AMIT, Z. The effects of selective catecholamines depletions by 6-hydroxydopamine on ethanol consumption in rats. *Neurosci Lett*, 5: 333-336, 1977
- CALAPAI, G.; MAZZAGLIA, G.; SAUTEBIN, L.; CONSTANTINO, G.; MARCIANO, M.; CUZZOCREA, S.; ROSA, M. e CAPUTI, P. Inhibition of nitric oxide formation reduces voluntary ethanol consumption in the rat. *Psychopharmacology*, 125: 198-491, 1996.
- CHAMBERS, G.K. The genetics of human alcohol metabolism. *Gen Pharmac*, 21: 267-272, 1990.

- CHAPMAM, P.F.; ATKINS, C.M.; ALLEN, M.T.; HALLEY, J.E. e STENMTZ, J.E. Inhibition of oxide nitric syntesis impairs two different forms of learning. *Neuro Report*, 3: 567-570, 1992.
- CHEN, C.S. A study of the alcohol-tolerance effect and an introduction of a new behavioral technique. *Psychopharmacologia(Berl.)*, 12: 433-440, 1968.
- CLUGNET, C. e LeDOUX, J.E. Long term potentiation in the lateral amygdala in response to stimulation of the lateral geniculate body. *Soc Neuro Abs*, 15: 354, 1979.
- COLLINGRIDGE, G.L. e SINGER, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci*, 11: 290-296, 1990.
- COLLINGRIDGE, G.L.; HARVEY, J.; FRENGUELLI, B.G.; BORTOLOTTTO, Z.A.; BASHIR, Z.I. e DAVIES, C.H. Amino acid receptors and long-term potentiation: targets for the development of cognitive enhancers. *Pharmacol Clin Eval*, 2: 41-49, 1992.
- CRABBE, J.C.; RIGTER, H.; UIJLEN, J. e STRIJBOS, C. Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of EtOH in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 208: 128-133, 1979.
- CURTIS, D.R.; PHILLIS, J.W. e WATKINS, J.C. Chemical excitation of spinal neurones. *Nature*, 183: 611-612, 1959.
- DANIELL, L.C. N-methyl-D-aspartate increases cytoplasmic free calcium in mouse hippocampus. *Neuropharmacology*, 30(6): 539-545, 1991.
- DE SARRO, G.B. e 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(1): 51-58, 1993.
- DE WIED, D. e BOHUS, B. Modulation of memory process by neuropeptide of hypothalamic-neurohypophyseal origin. In: MAB (edt) Brain mechanisms in memory and learning: from single neuron to man. *New York, Raven Press pp*, 139 - 149, 1979.
- DEUTSCH, S.I.; KAUSHIK, M.; HUNTZINGER, J.A.; NOVITZKI, M.R. e MASTROPAOLO, J. Potentiation of ethanol via interference with calcium channels. *Pharmacol Biochem Behav*, 38: 665-668, 1991.
- DILDY-MAYFIELD, J.E. e LESLIE, S.W. Mechanism of inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated increases in free intracellular Ca⁺⁺ concentration ethanol. *J Neurochem*, 56: 1536-1543, 1991.

- DINGLEDINE e McBAIN, J. Excitatory amino acid transmitters. In: *Basic Neurochemistry*, Raven Press. 5º ed. New York, 1993
- DRACHMAM, D.A. Cognitive function in man. Does the colinergic system have a special role? *Neurogly*, 27: 738-790, 1977.
- DSM-IV: Manual e Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (quarta versão). *Artes Médicas*. Porto Alegre, 1995.
- ERICKSON, C.K. e GRAHAM, D.T. Alterations in cortical and reticular acetylcholine release by ethanol *in vivo*. *J. Pharmacol Exp Ther*, 185: 583-593, 1973.
- ESTALL, B.L.; GRANT, S.J. e CICALA, G. A. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 46: 959-962, 1993.
- FAROOQUI, A.A. e HORROCKS, L.A. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res Rev*, 16: 171-191, 1991.
- FERRIERA. L. e SOARES da SILVA, P. 5-Hidroxy-tryptamine and alcoholism. *Human Psychopharmacol*, 6: S21-24, 1991
- FRANKEL, D. KHANNA, J.M.; LeBLANC, A.E. e KALANT, H. Effect of p-clorophenylalanine on the acquisition of tolerance to ethanol and pentobarbital. *Psychopharmacology*, 44: 246-252, 1975
- FUTUKO, J.M. e CHAUDHUR, I. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: Potential Selective Inhibition. *A Rev Pharmacol Toxicol*, 35: 165-194, 1995.
- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L. e CHESS-WILLINAS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggest as roles intracellular messenger in the brain. *Nature*, 366: 385-388, 1988.
- GOLDSTEIN, D.B. Physical dependence on ethanol: Its relation to tolerance. *Drug Alcohol Dep*, 4: 33-42, 1979.
- GRANT, K.A.; HOFFMAN, P.L.; e TABAKOFF, B. Neurobiological and behavioral approaches to tolerance and dependence. In: Edwards, G.; Lader, M. eds. The nature of dependence. Oxford: *Oxford University Press*; 135-169, 1990.
- GRANY, K.A.; VALVERIUS, P. HUDSPIT, M. e TABAKOFF, B. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur J Pharmacol*, 176: 289-296, 1990.
- HALEY, J.E. WILCOX, G.L. e CHAPMAN, P.F. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 8: 211-216, 1992.
- HAMKINS, R.D.; KALANT, H. e KHANNA, J.M. Effects of chronic intake of ethanol on rate of ethanol metabolism. *Can J Physiol Pharmacol*, 44: 241-257, 1966.

- HARRIS, R.A. e HOOD, W.F. Inhibition of synaptosomal calcium uptake by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther*, 213: 562-568, 1980.
- HILTUNEN, A.J. e JÄRBE, T.U.C. Acute tolerance to ethanol using drug discrimination and open-field procedures in rats. *Psychopharmacology*, 102: 207-212, 1990.
- HILTUNEN, A.J. e JÄRBE, T.U.C. Acute and chronic ethanol tolerance: operant behavior in naive and ethanol tolerant rats. *Psychopharmacology*, 107: 511-516, 1992.
- HÖKFELT, T.; CECCATELL, S.; GUSTAFSSON, L.; HULTING, A.-L.; VERGE, V.; VILLAR, M.; XIAO-JUN, X.; ZHI-QING, X.; WIESENFELD, Z. e ZHANG, X. Plasticity of NO synthase expression in the nervous and endocrine systems. *Neuropharmacology*, 33 (11): 1221-1227, 1994.
- HÖLSCHER, C. Long- term potentiation: a good model for learning and memory. *Prog. Neuro-Psychopharmacol*, 1: 47-68, 1997b.
- HÖLSCHER, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 20: 298-303, 1997a.
- HÖLSCHER, C. e ROSE, S.P.R. Inhibition synthesis of the putative retrograde messenger nitric oxide results in amnesia in a passive avoidance task in the chick. *Brain Res*, 619: 189-194, 1993.
- HODGES, H.; ALLEN, Y. SINDEM, J. MITCHELL, S.N.; ARENDT, T.; LANTOS, P. e GRAY, J.A. The effects of cholinergic drugs and cholinergic-rich foetal neural transplants on alcohol-induced deficits in radial maze performance in rats. *Behav Brain Res*, 43: 7-28, 1991.
- HOFFMAN, P.L.; MOSES, F; LUTHIN, G. e TABAKOFF, B. Acute and chronic effects of ethanol on receptor-mediated phosphatidylinositol 4,5,-bisphosphate breakdown in mouse brain. *Mol Pharmacol*, 30: 13-18, 1986.
- HOFFMAN, P.L.; RITZMANN, R.F.; WALTER, R. e TABAKOFF, B. Arginine vasopressin maintains ethanol tolerance. *Nature*, 276: 614-616, 1978.
- HOFFMAN, P.L. e TABAKOFF, B. Ethanol's action on brain biochemistry. In: Tarter RE, van Thiel DH (eds) Alcohol and the brain: chronic effects. *Plenum Press, New York*. 19-68, 1985.
- HOLLOWAY, F.A.; BIRD, D.C.; HOLLOWAY, J.A. e MICHAELIS, R.C. Behavioral factors in the development of tolerance to ethanol's effects. *Pharmacol Biochem Behav*, 29: 105-113, 1988.
- HUANG, A-M e LEE, E.H.Y. Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats *Pharmacol Biochem Behav*, 50 (3): 327-332, 1995.

- HUCKER, H.B.; HUTT, J.E.; WHITE, S.D.; ARISON, B.H. e ZACCHEI, A.G. Disposition and metabolism of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine in rats, dogs, and monkeys. *Drug Metab Dispos* 11(1): 54-58, 1983.
- HUNT, W.A. e MAJCHROWICZ, E. Alterations in high-affinity choline uptake in brain after chronic ethanol treatment. *J Pharmacol Exp Ther*, 210: 259-263, 1985.
- HUTTUNEN, P. e KORTELAINEN, M.-L. Chronic alcohol intake induces the oxidate capacity of brown adipose tissue in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 29: 53-57, 1988.
- HUTTUNEN, P. e KORTELAINEN, M.-L. Long-term alcohol consumption and brown adipose tissue in man. *Eur J Appl Physiol*, 60: 418-424, 1990.
- IMPERATO, A. e DI CHIARA, G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 239: 219-228, 1986.
- IZQUIERDO, I. Long-term potentiation and the mechanisms of memory. *Drug Develop Res*, 30: 1-17, 1993.
- IZQUIERDO, I. Role of NMDA receptors in memory. *Trends Pharmacol Sci.* 21, 1991.
- KALANT, H. Current state of knowledge about the mechanisms of alcohol tolerance. *Addict Biol*, 1: 133-141. 1996.
- KALANT, H. e KHANNA, J.M. Methods for the study of tolerance. *Mod Meth Pharmacol*, 6:43-66, 1990.
- KALANT, H.; LEBLANC, A.E. e GIBBINS, R.J. Tolerance to, and dependence on, some non-opiate psychotropic drugs. *Pharmacol Rev*, 23: 135-191, 1971.
- KANT, G.J.; WRIGHT, W.L.; ROBISON, T.N. e D'ANGELO, P. Effects of MK-801 on learning and memory as assessed using a novel water maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 39: 479-485, 1991.
- KARCZ-KUBICHA, M. e LILJEQUIST, S. Effects of post-ethanol administration of NMDA and non-NMDA receptor antagonists on the development of ethanol tolerance in C57BI mice. *Psychopharmacology*, 120: 49-56. 1995.
- KHANNA, J.M.; CAMPANELLI, C.; LE, A.D. e KALANT, H. Effect of raphe lesions on the development of chronic tolerance to pentobarbital and cross tolerance to ethanol. *Psychopharmacology*, 91(4): 473-478, 1987.

- KHANNA, J.M.; CHAU, A. e SHAH, G. Characterization of the phenomenon of rapid tolerance to ethanol. *Alcohol*, 13 (6): 621-628, 1997.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; CHAU, A.; SHAH, G. e MORATO, G.S. Interaction between N-methyl-D-aspartate (NMDA) and serotonin (5-HT) on ethanol tolerance. *Brain Res Bull*, 35: 31-35, 1994b.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; SHAH, G. e CHAU, A. Effect of (+)MK-801 and ketamine on rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 28: 311-314, 1992b.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; SHAH, G. e CHAU, A. Effect of D-cycloserine on rapid tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem and Behav*, 45: 983-986, 1993b.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; SHAH, G. e WEINER, J. Rapid tolerance as an index of chronic tolerance. *Pharmacol Biochem Behav*, 38: 427-432, 1991a.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; WEINER, J. e SHAH, G. Rapid tolerance and cross-tolerance as predictors of chronic tolerance and cross-tolerance. *Pharmacol Biochem Behav*, 41: 355-360, 1992a.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; WEINER, J.; CHAU, A. e SHAH, G. Ketamine retards chronic but not acute tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 42: 347-350, 1992d.
- KHANNA, J.M.; MIHIC, S.J.; WEINER, J.; SHAH, G.; WU, P.H. e KALANT, H. Differential inhibition by NMDA antagonists of rapid tolerance to, and cross-tolerance between, ethanol and chlordiazepoxide. *Brain Res Bull*, 574: 251-256, 1992c.
- KHANNA, J.M.; MORATO, G.S.; CHAU, A. e SHAH, G. D-cycloserine enhances rapid tolerance to ethanol motor incoordination. *Pharmacol Biochem Behav*, 52: 609-714, 1995a.
- KHANNA, J.M.; MORATO, G.S.; CHAU, A. e SHAH, G. Influence of nitric oxide synthetase inhibition on the development of rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 37: 599-604, 1995b.
- KHANNA, J.M.; MORATO, G.S.; CHAU, A.; SHAH, G. e KALANT, H. Effect of NMDA antagonists on rapid and chronic tolerance to ethanol: importance of intoxicated practice. *Pharmacol Biochem Behav*, 48: 755-763, 1994a.
- KHANNA, J.M.; MORATO, G.S.; SHAH, G.; CHAU, A. e KALANT, H. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 32: 43-47, 1993c.
- KHANNA, J.M.; SHAH, G.; WEINER, J.; WU, P.H. e KALANT, H. Effect of NMDA antagonists on rapid tolerance to ethanol. *Eur J Pharmacol*, 230: 23-31, 1993a.

- KHANNA, J.M.; WU, P.H.; WEINER, J. e KALANT, H. NMDA antagonist inhibits rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 26: 643-645, 1991b.
- KIIANMAA, K. e TABAKOFF, B.; Neurochemical correlates of tolerance and strain differences in the neurochemical effects of ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 18: 383-388. 1993.
- KLECNER, N.W. e DIGLEDINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Science*, 241: 835-837, 1988.
- KNOW, N.S.; NATHAN, C.F. GILKER, C. GRIFFITH, O.W. MATTHEUS, D.E. e STUEHR, D.J.. L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase: the ureic oxygen derives from dioxygen. *J Biol Chem*, 264: 20496-20501, 1990.
- JKNOWLES, G.R. e MONCADA, S., Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 299: 249-258, 1994.
- LANCASTER, F.E. Alcohol, nitric oxide and neurotoxicity: is there a connection? - a review. *Alcohol Clin Exp Res*, 16: 539-541, 1992.
- LÊ, A.D. e KIIANMAA, K. Characteristics of ethanol tolerance in alcohol drinking (AA) and alcohol avoiding (ANA) rats. *Psychopharmacology*, 94: 479-483, 1988.
- LÊ, A.D. Factors regulating ethanol tolerance. *Ann Med*, 22: 265-268, 1990.
- LÊ, A.D.; KALANT, H. e KHANNA, J.M. Interaction between des-glycinamide⁹-[Arg⁸] vasopressine serotonin on ethanol tolerance. *Eur J Pharmacol*, 80: 337-345, 1982.
- LÊ, A.D.; KALANT, H. e KHANNA, J.M. Roles of intoxicated practice in the development of ethanol tolerance. *Psychopharmacology*, 99: 366-370, 1989.
- LÊ, A.D.; KHANNA, J.M e KALANT, H. Role of Pavlovian conditioning in the development of tolerance and cross-tolerance to the hypothermic effect of ethanol and hydralazine. *Psychopharmacologia* 92: 210-214, 1987.
- LEBLANC, A.E; GIBBINS, R.J. e KALANT, H. Behavioral augmentation of tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacologia*, 30: 117-122, 1973.
- LEBLANC, A.E.; KALANT, H. e GIBBINS, R.J. Acute tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacologia(Berl)*, 41: 43-49, 1975.
- LEES, G.J. Influence of ketamine on the neuronal death caused by NMDA in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 34: 411-417, 1995.

- LESLIE, I. MK-801 (dizocilpine maleate) - NMDA receptor antagonist. *Res Biochem Inter*, 1: 1-4, 1994.
- LESLIE, S.W.; BARR, E.; CHANDLER, J. e FARRA, R.P. Inhibition of fast-and slow-phase depolarization dependent calcium uptake by ethanol. *J. Pharmacol Exp Ther*, 225: 571-575, 1983.
- LESLIE, S.W.; BROWN, L.M.; DILDY, J.E. e SIMS, J.S. Ethanol and neuronal calcium channels. *Alcohol*, 7: 233-236, 1990.
- LIEBER, C.S. Metabolism of ethanol and associated hepatotoxicity. *Drug and Alcohol Rev*, 10: 175-202, 1991.
- LISHMAM, W.A. Alcohol and the brain. *Br J Psychiat*, 156: 635-644, 1990.
- LOVINGER, D.M.; WHITE, G. e WEIGHT, F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science (Wash DC)*, 243: 1721-1724, 1989.
- MALINOVSKY, J.-M.; SERVIN, F.; COZIAN, A.; LEPAGE, J.-Y. e PINAUD, M. Ketamine and norketamine plasma concentrations after i.v., nasal and rectal administration in children. *Br J Anaesth*, 77: 203-207, 1996.
- MANSFIELD, J.G. e CUNNINGHAM, C.L. Conditioning and extinction of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in rats. *J Comp Physiol*. 94: 962-969, 1980.
- MAYER, M.L. e WESTBROOK, G.L. Permeation and block of N-methyl-D aspartic acid receptors channels by divalent cations in mouse cultured central neurones *J Physiol. (London)*, 394: 501, 1987.
- MELCHIOR, C.L. e TABAKOFF, B. Modification of environmentally cued tolerance to ethanol in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 219: 175-180, 1981.
- MELDRUM, B.S., ed. Excitatory amino acid antagonists. *Frontiers in Pharmacology and Therapeutics: Blackwell, Oxford*, pp 1- 350, 1991.
- MELLANBY, E. Alcohol: its absorption into and disappearance from the blood under different conditions. *MRC Special Report Series No. 31*. HMSO, London, 1919.
- MOGENSEN, J.; HASMAN, A. e WÖRTWEIN, G. Place learning during inhibition nitric oxide synthase in the rat. *Homeostasis*, 36: 12-18, 1995c.
- MOGENSEN, J.; WÖRTWEIN, G.; GUSTAFSON, B. e ERMENS, P. L-Nitroarginine reduces hippocampal mediation of place learning in the rat. *Neurobiol Learn Memory*, 64: 17-24, 1995a.
- MOGENSEN, J.; WÖRTWEIN, G.; HASMAN, A.; NIELSEN, P. e WANG, Q. Functional and neurochemical profile of place learning after L-nitro-arginine in the rat. *Neurobiol Learn Memory*, 63: 54-65, 1995b.
- MONAGHAN, D.T.; BRIGDES, R.J. e 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 e CORDI, A.A. D-cycloserine, a positive modulator of the N-methyl-D-aspartate receptor, enhances performance of learning tasks in rats. *Pharmacol Biochem Beh*, 34: 649-653, 1989.
- MONCADA, S. Nitric oxide. *J Hypertension*. 12 (10): S35-S39, 1994.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J. e HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109-141, 1991.
- MOORE, P.K. e HANDY, R.L.C. Selective inhibitions of neuronal nitric oxide synthase - is no NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol Sci*, 18, 1997.
- MOORE, P.K. e BLAND-WARD, P.A. 7-nitroindazole: an inhibitor of nitric oxide synthase. *Methods Enzimol*, 268: 393-398, 1996.
- MOORE, P.K.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z; e HART, S.L. 7- nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol*, 108: 219-224, 1993.
- MORATO, G.S. e KHANNA, J.M. N-methyl-D-aspartate receptors, nitric oxide, and ethanol tolerance. *Braz J Med Biol Res*. 29: 1415-1426, 1996.
- MORLEY, J.E. e FLOOD, J.F. Nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Science*, 49: 707-711, 1991
- MORRIS, R.G.M.; ANDERSON, E.; LYNCH, G.S. e BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long term potentiation by an N-methyl-D-aspartate antagonist, AP5. *Nature*, 319: 774-776, 1986.
- NEVO, I. e HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem Int*, 26: 305-336, 1995.
- NEWLIN, D.B. e THOMSON, J.B. Alcohol challenge with sons alcoholics critical review and analysis. *Psycho Bull* 108: 383:402, 1990
- PAKKARI, I. e LINDSBERG, P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med*, 27: 369-377, 1995.
- PEDRAZ, J.L.; CALVO, M.B.; GASCON, A.R., HERNANDEZ, R., MURIEL, C., TORRES, L.M. e DOMINGUES-GIL, A. Pharmacokinetics and distribution of ketamine after extradural administration to dogs. *Br J Anaesth*, 67: 310-316, 1991.
- PEÑA-ALFARO, A.A. Alcoolismo: Os seguidores de Baco.ed. *Mercuryo*, São Paulo, 1993

- RABE, C.S. e TABAKOFF, B. Glycine site-directed agonists reverse the actions of ethanol at the N-Methyl-D-aspartate receptor. *Molecular Pharmacol*, 38: 753-757, 1990.
- RAFI-TARI, S.; KALANT, H.; LIU, J-F.; SILVER, I. e WU, P.H. Dizocilpine prevents the development of tolerance to ethanol-induced error on a circular maze test. *Psychopharmacology*, 125: 23-32, 1996.
- RAMOS, S. e BERTOLOTE, J. M. Alcoolismo Hoje. *Artes Médicas*, Porto Alegre, 1, 17-31, 1997
- RANDOLL, L.A.; WILSON, W.R.; WEAVER, M.S.; SPUHLER-PHILIPS, K. e LESLIE, S.W. N-methyl-D-aspartate stimulated increases in intracellular calcium exhibit brain regional differences in sensitivity to inhibition by ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 20: 197-200, 1996.
- RECASENS, M. Putative molecular mechanisms underlying long term potentiation (LTP): the key role of excitatory amino acid receptors. *Thérapie*, 50: 19-34, 1995.
- SCHUCKIT, M.A. e GOLD, E.O. A simultaneous evaluation of multiple markers of ethanol/placebo challenges in sons of alcoholics and controls *Arc Gen Psychiatry*. 45: 211-216, 1988.
- SCHUCKIT, M.A. Ethanol induced changes in body sway in men at high alcoholism risk. *Arch Gen Psychiatry* 42: 375-379, 1985.
- SCHWARTZ, P.H. e WASTERLAIN, C.G. Cardiac arrest and resuscitation alters the pharmacokinetics of MK-801 in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 73 (2): 181-195, 1991.
- SEEMAM, P. e LEE, T. The dopamine-releasing actions of neuroleptics and ethanol. *J Pharmacol Exp Ther*, 190: 131-135, 1974.
- SEEMAM, P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers *Pharmac. Rev.* 24: 583-655, 1972.
- SHEFENER, S.A. e TABAKOFF, B. Basal firing rate of rat locus coeruleus neurons affects sensitivity to ethanol. *Alcohol*; 2: 239-243, 1985
- SIEGEL, S. e SDAO-JARVIE. Attenuation of ethanol tolerance by a novel stimulus. *Psychopharmacology*, 88: 258-261, 1986.
- SOUTHAN, G.J.; SZABÓ, C. e THIEMERMANN, C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. *Br J Pharmacol*, 114: 510-516, 1995.

SQUADRITO, F. CALAPAI, G.; CUCINOTTA, D. ALTAVILLA D. ZINGARELLI B, IOCOLANO, M. URNA, G. SARDELLA, A. CAMPO, G.M. e CAPUTI, A.P. Anorectic activity of N^G-nitro-L-arginine, an inhibitor of brain nitric oxide synthase, in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol*, 230: 125-128, 1993.

SUCHER, N.J.; AWOBULUYI, M.; CHOI, Y.B. e LIPTON, S.A. NMDA receptors: from genes to channels. *Trends Pharmacol Sci*, 17: 348-355, 1996.

SZABÓ, G.; TABAKOFF, B. e HOFFMAN, P.L. The NMDA receptor antagonist dizocilpine differentially affects environment-dependent and environment-independent ethanol tolerance. *Psychopharmacology*, 113: 511-517, 1994.

TABAKOFF, B. Alcohol and Tolerance: in *Alcohol Alert, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 28: 1-4, 1995.

TABAKOFF, B. CORNELL, N. e HOFFMAN, P.L. Alcohol Tolerance: *Ann Emerg Med*, 15: 1005-1012, 1986.

TABAKOFF, B. e HOFFMAN, P.L. Alcohol Addiction: An enigma among us neuron, 16: 909-912, 1996.

TABAKOFF, B. e HOFFMAN, P.L. Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci*, 32, 197-204, 1983.

TABAKOFF, B. e HOFFMAN, P.L. Mechanisms of alcohol tolerance. *Alcohol Alc* 24: 251-252, 1989.

TABAKOFF, B., HELLENO, K. e HOFFMAN, P.L. Alcohol in: Handbook of experimental pharmacology. *Pharmacological Aspects of Drug Dependence*, Berlin, Germany, 373-458, 1996.

TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. e MOSES, F. Neurochemical correlates of ethanol withdrawal: alterations in serotonergic function. *J. Pharm Pharmacol*. 29: 471-476, 1977.

TRUJILLO, K.A. e AKIL, H. Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. *Drug Alcohol Dep*, 38: 139-154, 1995.

TRUJILLO, K.A. e AKIL, H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by NMDA receptor antagonist MK-801. *Science*, 251, 85-87, 1991.

TSAI, G.; GASTFRIEND, D.R. e COYLE, J.T. The glutamatergic basis of human alcoholism. *Am J Psychiatr*, 152: 332-340, 1995.

- UCHIHASHI, Y.; KURIBARA, H.; ISA, Y.; MORITA, T. e SATO, T. The disruptive effects of ketamine on passive avoidance learning in mice: involvement of dopaminergic mechanism. *Psychopharmacology*, 116: 40-44, 1994.
- VENABLE, N. e KELLY, P.H. Effects of NMDA receptor antagonists on passive avoidance learning and retrieval in rats and mice. *Psychopharmacologia (Berl.)*, 100: 215-221, 1990.
- VERMA, A. e MOGHADDAM, B. NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *Neurosci*, 16:(1) 373-379, 1996.
- VOGEL-SPROTT, M.D. Acute recovery and tolerance to low doses of alcohol: Differences in cognitive and motor skill performance. *Psychopharmacology*, 61: 287-291, 1979.
- WHITE, P.F.; JOHNSTON, R.R. e PUDWILL, C.R. Interaction of ketamine and halothane in rats. *Anesthesiology*, 42(2): 179-186, 1975.
- WILIAMS, K.; DICHTER, M.A. e MOLINOFF, P.B. Up-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors on cultured cortical neurons after exposure to antagonists. *Mol. Pharmacol.* 42: 147-151, 1992.
- WOODWARD, J.J. e GONSALES, 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.
- WU, P.H.; LIU, J.F.; LANÇA, A.J. e KALANT, H. Development of alcohol tolerance in the rat after a single exposure to combined treatment with arginine⁸-vasopressin and ethanol. *J Pharmacol Exp Ther*, 276: 1283-1291, 1996.
- WU, P.H.; LIU, J.F.; LANÇA, A.J. e KALANT, H. Selective involvement of central 5-HT₂ receptors in the maintenance of tolerance to ethanol by arginine⁸-vasopressin, *J Pharmacol Exp Ther*, 270: 802-808, 1994.
- WU, P.H.; MIHIC, S.J.; LIU, J.F.; LÊ, A.D. e KALANT, H. Blockade of chronic tolerance to ethanol by the NMDA antagonist, (+)-MK-801. *Eur J Pharmacol*, 231: 157-164, 1993.
- YAMADA, K.; NODA, Y.; NAKAYAMA, S.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; HASEGAWA, T. e NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol*, 115: 852-858, 1995.

YANG, X.; CRISWELL, E. SIMSON, P. MOY, S e BREESE, G. Evidence for a selective effect of ethanol on N-metil-D-aspartate responses: ethanol affects a subtype of the ifenprodil-sensitive N-metil-D-aspartate receptors *J Pharmacol Exp Ther*, 278: 114-124, 1996.

ZALUYSKY, R.A. e NICOLL, R.A. Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science*, 248: 1619-1624, 1990.