

MARCOS JOSÉ BARRETO ZALESKI

**ESTUDO DO PAPEL DO RECEPTOR GABA_B NA AQUISIÇÃO DA TOLERÂNCIA
RÁPIDA AO ETANOL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO
TESTE DO ROTA-ROD**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.**

Florianópolis – SC

1998

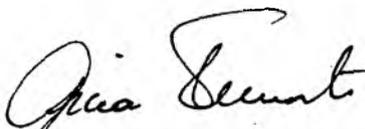
“ESTUDO DO PAPEL DO RECEPTOR GABA_B NA TOLERÂNCIA RÁPIDA AO ETANOL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TESTE DO ROTA-ROD”

POR

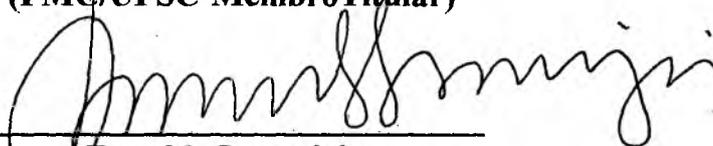
MARCOS JOSÉ BARRETO ZALESKI

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pela Banca Examinadora em sessão de defesa pública em 09 de Dezembro de 1998.

Banca Examinadora:



**Gina Struffaldi Morato
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



**Ronaldo Laranjeira
(BNIFESP/SP -Membro Titular)**



**Reinaldo Naoto Takahashi
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



**Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, 09 de Dezembro de 1998.

ZALESKI, Marcos José Barreto. ***Estudo do papel do receptor GABA_B na aquisição da tolerância rápida ao etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.*** Florianópolis, 1998. 99p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Gina Struffaldi Morato

Defesa: 09.12.98

Análise da influência do [receptor] [GABA_B] no desenvolvimento da [tolerância] rápida ao [etanol] em camundongos, no teste do rota-rod. Os animais foram treinados diariamente, durante cinco dias, no aparelho do rota-rod, até que atingissem linha de base mínima para serem selecionados para os testes. No dia dos testes, a velocidade de queda (rpm/min) do animal, do eixo giratório do aparelho, foi registrada antes da administração de drogas, e comparada àquela registrada durante os experimentos. Foram estudados os efeitos do tratamento prévio com três drogas: o [(-)baclofeno], agonista GABA_B; o [CGP36742] e o [CGP56433], antagonistas GABA_B. O (-)baclofeno impediu o desenvolvimento da tolerância rápida de forma dependente da dose, mas os resultados com doses mais elevadas foram prejudicados pelos efeitos miorrelexantes da droga. Tanto o CGP36742 quanto o CGP56433 facilitaram o desenvolvimento da tolerância rápida de forma dose-dependente. No entanto, a administração posterior de (-) baclofeno impediu total ou parcialmente essa facilitação pelo CGP36742, e não impediu os efeitos do CGP56433 na maioria das doses testadas. Finalmente, uma possível interação farmacocinética, entre as drogas utilizadas no estudo e o etanol foi excluída através da dosagem da alcoolemia, que não revelou diferenças estatisticamente significantes entre as amostras encaminhadas para análise. Em conclusão, os resultados desse estudo sugerem o envolvimento do receptor GABA_B no desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol. Sugere-se que este desenvolvimento tenha ocorrido, possivelmente, através da menor ou maior modulação do complexo [NMDA], levando à inibição ou à facilitação de mecanismos ligados aos processos de [aprendizagem] e [memória].

[receptor] [GABA_B] [tolerância] [etanol] [(-)baclofeno] [CGP36742] [CGP56433] [NMDA] [aprendizagem] [memória]

A João Zaleski Jr., amigo e pai, com saudade.
À Tânia, Fernanda e Felipe, com amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dr^a. Gina Struffaldi Morato, pelo exemplo de idealismo e competência, pela paciência na orientação, e, sobretudo, pelo respeito e incentivo. É um privilégio te-la como orientadora.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Tadeu Lemos, pelo estímulo, amizade e auxílio em todas as horas.

A todos os colegas da pós-graduação, pelo companheirismo e união: Joséia, Néia, Rose, Rubens, Gilboé, Marta, Sandro e Tânia.

Ao coordenador do curso de pós-graduação em Farmacologia, Prof. Dr. Giles Alexander Rae, pela simplicidade e conhecimento.

Aos demais docentes do Departamento de Farmacologia, em especial ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez, pela dedicação e contribuição nesta formação profissional.

Aos colegas psiquiatras Dr. Pedro Largura, Dr. Ari Sell e Dr. João Ernani Leal, por acreditarem na realização desta etapa.

À colega Rose Vianna e ao acadêmico de Medicina João Nunes, pelo apoio na realização dos experimentos.

A todos os colegas do laboratório, pela troca de idéias e companheirismo.

Ao Marco e ao Zoili Koerich, do Laboratório Ciência, pela gentileza e pelo ensino da técnica da dosagem alcoólica.

A todos os funcionários do Departamento, pela convivência harmoniosa.

À minha mãe, Míriam, ao meu irmão, João, e à minha cunhada, Márcia, pelo carinho e compreensão.

SUMÁRIO

RESUMO _____	viii
ABSTRACT _____	ix
LISTA DE FIGURAS _____	xi
LISTA DE TABELAS _____	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS _____	xv

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos clínicos do alcoolismo _____	01
1.2 Efeitos do etanol no SNC _____	06
1.3 Sistema GABA _____	10
1.4 Tolerância ao etanol e processos de aprendizagem e memória _____	16

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral _____	22
2.2 Objetivos específicos _____	22

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais _____	24
3.2 Drogas e soluções administradas _____	24
3.3 Equipamento _____	24
3.4 Procedimento geral _____	25
3.5 Dosagem alcoólica _____	26
3.6 Análise estatística _____	27

4 PROCEDIMENTOS E RESULTADOS

4.1 Experimento 1 - Avaliação do desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, com duas doses no primeiro dia _____	28
4.2 Experimento 2 - Estudo do desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, com doses adicionais inferiores a 1,25 g/kg _____	31
4.3 Experimento 3 - Influência da D-cicloserina sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod _____	33
4.4 Experimento 4 - Influência do (-)baclofeno sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod _____	36
4.5 Experimento 5 - Influência do CGP36742 sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod _____	40
4.6 Experimento 6 - Influência do CGP36742, seguido de (-)baclofeno, sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod _____	44
4.7 Experimento 7 - Influência do CGP56433 sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod _____	49
4.8 Experimento 8 - Influência do CGP56433, seguido de (-)baclofeno, sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod _____	52
4.9 Experimento 9 – Dosagem alcoólica _____	57
5 DISCUSSÃO _____	60
6 CONCLUSÃO _____	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	80

RESUMO

O conceito de tolerância vem evoluindo desde a última década. Antes considerado apenas como uma resposta celular homeostática, é atualmente bem estabelecido que essa resposta pode ser influenciada pela experiência e aprendizagem. Diversos estudos, em modelos animais, têm demonstrado que a prática de uma tarefa sob a influência do etanol é um fator importante no desenvolvimento da tolerância. Uma das formas de tolerância muito estudada é a da tolerância rápida, que aparece em resposta a uma segunda dose de etanol administrada cerca de 8 a 24 horas após a primeira ter sido metabolizada.

Recentes trabalhos revelam que o aumento da eficácia da sinapse, uma forma de potenciação de longa duração mais conhecida como LTP (*“long term potentiation”*), está ligada diretamente ao receptor glutamatérgico NMDA. Antagonistas deste receptor inibem a LTP, inibem o aprendizado e a memória e ainda o desenvolvimento da tolerância ao etanol. Outros estudos relataram que o receptor GABA_B também exerce um papel modulatório sobre a LTP, e que o bloqueio do receptor GABA_B facilita a capacidade do aprendizado. Assim, existem indícios de uma estreita relação entre a tolerância ao etanol e os mecanismos de aprendizagem e memória

Este trabalho analisou a influência do receptor GABA_B sobre o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, em camundongos Suíços machos. Os animais foram treinados

diariamente, durante cinco dias, no aparelho rota-rod, até que atingissem linha de base mínima para serem selecionados para os testes. No dia dos testes, a velocidade de queda (rpm/min) do animal, do eixo giratório do aparelho, foi registrada antes da administração de drogas, e comparada àquela registrada durante os experimentos.

Inicialmente, baseado em estudos prévios, verificou-se o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol com uma dose total de 3,0 g/kg, dividida em uma dose inicial de 1,5 ou 1,75 g/kg, e dose adicional de 1,5 ou 1,25 g/kg, respectivamente. Em seguida, foi observado que a D-cicloserina (10 mg/kg), um agonista do sítio da glicina do receptor NMDA, foi capaz de facilitar a aquisição da tolerância rápida, com uma dose de etanol insuficiente para induzir tolerância rápida *per se*, a exemplo do que já havia sido demonstrado em outros modelos animais. Esse experimento revelou ser o rota-rod um modelo confiável na observação de drogas que facilitam a aquisição da tolerância rápida.

Passou-se, então, a verificar a influência do receptor GABA_B no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Foram estudados os efeitos do tratamento prévio com três drogas: o (-)baclofeno, agonista GABA_B; o CGP36742 e o CGP56433, dois antagonistas GABA_B. O (-)baclofeno impediu o desenvolvimento da tolerância rápida de forma dependente da dose, mas os resultados com doses mais elevadas foram prejudicados pelos efeitos miorrelaxantes da droga. Tanto o CGP36742 quanto o CGP56433 facilitaram o desenvolvimento da tolerância rápida de forma dose-dependente. No entanto, a

administração posterior de (-)baclofeno impediu total ou parcialmente essa facilitação pelo CGP36742, e não impediu os efeitos do CGP56433 na maioria das doses testadas. Finalmente, uma possível interação farmacocinética, entre as drogas utilizadas no estudo e o etanol foi excluída através da dosagem da alcoolemia, que não revelou diferenças estatisticamente significantes entre as amostras encaminhadas para análise.

Os resultados deste estudo sugerem o envolvimento do receptor $GABA_B$ no desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol. Sugere-se que este desenvolvimento tenha ocorrido, possivelmente, através da menor ou maior modulação do complexo NMDA , levando à inibição ou à facilitação de mecanismos ligados aos processos de aprendizagem e memória.

ABSTRACT

Previous research has shown that rapid tolerance to ethanol induced-motor impairment occurs in rats and mice, within 8-24 hours after the first exposure. There is evidence that learning both species, rats and mice, can influence rapid tolerance. Recently, GABA_B receptors have been involved in learning and memory processes. The goal of this study is to evaluate the influence of the GABA_B agonist (-)baclofen and two GABA_B antagonists, CGP36742 and CGP56433, in the acquisition of rapid tolerance in male Swiss mice, in the rota-rod apparatus. Groups of 10 animals (20-30 g) were trained in the continuously accelerating rota-rod (1 rpm/s) in 1 min sessions. If the animal dropped off the rotating bar, it received a foot shock (0.3 mA). Only mice displaying stable baselines were used. Mice were then tested 5, 10 and 15 min after intraperitoneal injections of ethanol, and maximum motor impairment was obtained. In the first and second experiments, different amounts of ethanol were administered, divided in two doses, one before the test (1.0 – 2.0 g/kg) and the other, an additional dose (0.75 – 1.25 g/kg), given two hours after the experiment (Day 1). In the following day (Day 2), animals received only the same initial dose as in the previous day, and were tested in the rota-rod. The most effective dose to produce rapid tolerance to ethanol in Day 2 was chosen (1.75+ 1.25 g/kg, totalling 3.0 g/kg). In the third experiment, we evaluated if the rota-rod test could measure the facilitation of rapid tolerance in a dose insufficient to produce rapid tolerance *per se*. D-cycloserine (10 mg/kg), that facilitated the development of rapid tolerance to ethanol in other animal models, also facilitated the acquisition of rapid tolerance to ethanol (2.75 g/kg) in this study. Then the influence of GABA_B in the development of rapid tolerance to ethanol induced motor impairment was examined. The results showed that (-)baclofen (5 and 7 mg/kg) antagonized rapid tolerance, but the miorelaxant effects observed in the higher doses (7 - 10mg/kg) might bias this observation. However, both CGP36742 (3 - 10 mg/kg) and CGP56433 (0.3 - 3.0 mg/kg) facilitated the development of rapid tolerance to ethanol (2.75 g/kg). In order to investigate if (-)baclofen could affect this influence of both GABA_B antagonists, animals were pretreated with CGP36742 or CGP56433, receiving (-)baclofen (5 mg/kg), 30 min later. After 20 min. they were injected with ethanol (2.75 g/kg) and tested in the rota-rod apparatus. (-)Baclofen blocked totally the influence of CGP36742 (3 mg/kg) on the development of rapid tolerance to ethanol, or partially with the higher dose, but was able to interfere in the effects of CGP56433 only with the lower dose (0.3 mg/kg). These last results suggest that these drugs are acting at the GABA_B receptor level, in a dose dependent, competitive way. Finally, blood samples of animals treated with the different drugs used throughout this study were taken and the blood ethanol concentrations were determined. The results showed no significant differences among those levels (mg/dl) and control treated with saline, demonstrating that there is no apparent pharmacokinetic interactions among the drugs used and ethanol which might interfere in our results. These data suggest that GABA_B receptor can be involved in the development of rapid tolerance to ethanol, possibly influencing the glutamatergic NMDA receptor, thus affecting learning and memory processes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, na dose de 3 mg/kg em camundongos, no teste do rota-rod _____ 30
- Figura 2:** Efeitos de diferentes doses de etanol sobre a incoordenação motora e desenvolvimento da tolerância rápida no Dia 2, em camundongos, no teste do rota-rod _____ 31
- Figura 3:** Desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida por diferentes doses de etanol, em camundongos, no teste do rota-rod _____ 33
- Figura 4:** Influência da D-cicloserina sobre o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, em camundongos, no teste do rota-rod _____ 35
- Figura 5:** Efeitos da D-cicloserina sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no Dia 2, em camundongos, no teste do rota-rod _____ 36
- Figura 6:** Influência do (-)baclofeno no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação induzida pelo etanol, em camundongos, no teste do rota-rod ___ 39
- Figura 7:** Efeitos do (-)baclofeno sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no Dia 2, em camundongos, no teste do rota-rod _____ 40
- Figura 8:** Influência do CGP36742 no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, em camundongos, no teste do rota-rod _____ 43
- Figura 9:** Efeitos do CGP36742 sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no Dia 2, em camundongos, no teste do rota-rod _____ 44
- Figura 10:** Influência do CGP36742, seguido de (-)baclofeno, no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, em camundongos, no teste do rota-rod _____ 48
- Figura 11:** Influência do CGP56433 no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol em camundongos, , no teste do rota-rod _____ 51

Figura 12: Efeitos do CGP56433 sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, em camundongos, no teste do rota-rod, no Dia 2 _____ 52

Figura 13: Influência do CGP56433, seguido de (-)baclofeno, no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol em camundongos, no teste do rota-rod _____ 56

Figura 14: Interação entre o sistema GABAérgico e o sistema glutamatérgico _____ 75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Critérios diagnósticos do DSM-IV, da Associação Americana de Psiquiatria (APA), para dependência de substâncias _____ 3

TABELA 2: Alcoolemia de animais tratados com diferentes drogas 30 min antes da administração de etanol, comparados ao grupo controle _____ 58

TABELA 3: Alcoolemia de animais tratados com CGP 36742 ou CGP56433, seguidos de (-)baclofeno e etanol, comparados aos respectivos controles ____ 59

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Alcoólicos Anônimos
ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosina-mono-fosfato
ANOVA	Análise da Variância
APA	American Psychiatry Association
Ca⁺²	Cálcio
CEBRID	Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas
CID	Classificação Internacional de Doenças
Cl⁻	Cloreto
CGP	Ciba Geigy Probe
DSM-IV	Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais
E.P.M	Erro padrão da média
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
GABA-T	GABA α oxoglutarato transaminase
GAD	Ácido glutâmico descarboxilase
GMPc	Guanidina tri-fosfato
5-HT	5-hidroxitriptamina
i.p	Intraperitoneal
L-NAME	Nitro-L-arginina metil éster
LTP	“Long term potentiation”
Mg⁺	Magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde

P_G	Proteína G
PTX	Toxina pertússis
r.p.m	Rotação por minuto
SFA	Síndrome Fetal Alcoólica
SNC	Sistema Nervoso Central
T.R	Tolerância rápida
VVAA	Vários autores

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS CLÍNICOS DO ALCOOLISMO

O etanol é a substância psicotrópica presente, em concentrações variáveis, nos incontáveis tipos de bebidas alcoólicas preparados em todo o mundo. Por ser uma molécula pequena, hidro e lipossolúvel, ultrapassa a barreira capilar hematoencefálica e produz efeitos centrais bifásicos característicos, com desinibição inicial, seguida de depressão do Sistema Nervoso Central (SNC). O uso repetido e prolongado acaba por provocar um grave transtorno mental e de comportamento, o alcoolismo.

Apesar de registros milenares do consumo de bebidas alcoólicas, os estudos científicos sobre a etiologia e o tratamento do alcoolismo somente avançaram nas últimas quatro décadas. Esse fato deve-se, em parte, à crença de que a perda do controle na ingestão de substâncias etílicas estava relacionada à fraqueza de caráter ou a questões de cunho moral. Tal crença foi responsável pela fundação da Irmandade de Alcoólicos Anônimos (AA), em 1935, na cidade de Akron, Ohio, Estados Unidos da América. Iniciada com apenas duas pessoas, esta Irmandade conta hoje com milhões de adeptos em todo o mundo. A ideologia espiritual na qual está ancorado o seu programa de recuperação, mais conhecido como “programa de doze passos” (VVAA, 1994) revela a dificuldade, ainda em nosso século, da aceitação do alcoolismo como uma doença de substrato orgânico e com repercussões psicossociais.

A psiquiatria, especialidade médica mais indicada para o tratamento dessa patologia, conta, em nosso país, com relativamente poucos serviços e profissionais especializados na área, reflexo, talvez, do ainda recente entendimento do alcoolismo como doença. O próprio conceito diagnóstico foi inicialmente realizado não por um médico, mas por um assistente social da Universidade de Yale, cujo trabalho “O Conceito de Alcoolismo como Doença” é considerado um marco na abordagem desse distúrbio (Jellinek, 1960). Mais tarde, o psiquiatra inglês Griffith Edwards descreveu a Síndrome de Dependência do Alcool (Edwards, 1976). Muitas de suas observações serviram como base para o diagnóstico de alcoolismo feito pela Classificação Internacional de Doenças (CID) da Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente em sua décima versão (CID-10, 1993). Também o Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV, 1995), da Associação Americana de Psiquiatria, é amplamente utilizado para esse diagnóstico. Apesar de o sistema empregado pelo DSM-IV elucidar a natureza e a severidade dos sintomas clínicos, ele pouco contribui para esclarecer problemas ao nível de etiologia ou prognóstico (Tabela1).

Tabela 1. Critérios diagnósticos do DSM-IV, da Associação Americana de Psiquiatria (APA), para dependência de substância. Estes critérios são utilizados para diagnóstico de dependência a diversas substâncias psicoativas, incluindo álcool.

Um padrão mal-adaptativo de uso de substância, levando a prejuízo ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por três (ou mais) dos seguintes critérios, ocorrendo a qualquer momento no mesmo período de 12 meses:

- 1. Tolerância, definida por qualquer um dos seguintes aspectos:**
 - (a) **uma necessidade de quantidades progressivamente maiores de substância para adquirir a intoxicação ou o efeito desejado.**
 - (b) **Acentuada redução do efeito com o uso continuado da mesma quantidade de substância.**

- 2. Abstinência, manifestada por qualquer dos seguintes aspectos:**
 - (a) **síndrome de abstinência característica para a substância (consultar os critérios A e B dos conjuntos de critérios para Abstinência das substâncias específicas.**
 - (b) **a mesma substância (ou uma substância estreitamente relacionada) é consumida para aliviar ou evitar sintomas de abstinência.**

- 3. A substância é freqüentemente consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o período pretendido.**

- 4. Existe um desejo persistente ou esforços mal-sucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso da substância.**

- 5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção da substância (por ex., consultas a múltiplos médicos ou fazer longas viagens de automóvel), na utilização da substância (por ex., fumar em grupo) ou na recuperação de seus efeitos.**

- 6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas são abandonadas ou reduzidas em virtude do uso da substância.**

- 7. O uso da substância continua, apesar da consciência de ter problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pela substância (por ex., uso atual da cocaína, embora o indivíduo reconheça que sua depressão é induzida por ela, ou consumo continuado de bebidas alcoólicas, embora o indivíduo reconheça que uma úlcera piorou pelo consumo de álcool.**

Com o objetivo de estabelecer um uso mais preciso do termo “alcooolismo”, o Conselho Nacional de Alcoolismo e Dependência a Drogas Norte Americano criou um comitê para estabelecer a definição e os critérios para o diagnóstico desse transtorno mental. O resultado do estudo levou à seguinte definição: “O alcoolismo é uma doença primária, crônica, com fatores genéticos, psicossociais e ambientais influenciando seu desenvolvimento e manifestações. A doença é freqüentemente progressiva e fatal. É caracterizada pela perda do controle sobre as doses ingeridas, preocupação com a droga ‘álcool’, uso do álcool apesar de conseqüências adversas e distorções do pensamento, especialmente a negação da doença. Cada um desses sintomas pode ser contínuo ou periódico. (Morse e Flavin, 1992).

Estima-se que 10-12% da população mundial seja dependente do álcool. No Brasil, ele é responsável por cerca de 60% dos acidentes de trânsito e aparece em 70% dos laudos cadavéricos das mortes violentas. De acordo com a última pesquisa realizada pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), entre estudantes do 1º e 2º grau de dez capitais brasileiras, as bebidas alcoólicas são utilizadas por mais de 65% dos entrevistados, estando bem à frente do tabaco como a droga mais consumida. Desses estudantes, 50% iniciaram o uso entre os 10 e os 12 anos de idade (Galduróz Noto e Carlini, 1997).

São inúmeras as manifestações fisiológicas e comportamentais provocadas pelo álcool. A ingestão moderada pode produzir apagamentos e incoordenação motora (Tabakoff e Rothstein, 1983), déficits psicológicos e

intelectivos associados à Síndrome Fetal Alcólica – SFA (Gardner, 1997), assim como a neuroadaptação associada com a ingestão de etanol, ou seja, o fenômeno conhecido como tolerância (Kaiant, 1990; Trujillo e Akil; 1995).

O elevado índice de recaídas vem suscitando a busca de maior eficácia dos programas de tratamento para a dependência química. As abordagens clínicas podem englobar, além da desintoxicação, técnicas psicoterápicas motivacionais, cognitivo-comportamentais, e o envolvimento de familiares e amigos mais próximos no entendimento do processo de tratamento. No entanto, os resultados no acompanhamento de pacientes submetidos a variadas abordagens têm sido criticados, devido à pouca uniformidade nas diferentes metodologias empregadas nesses estudos (Breslin et al., 1997).

Dentre as medidas adotadas para um aumento da qualidade e eficácia do tratamento está a da associação do acompanhamento terapêutico com drogas potencialmente benéficas, especialmente para a etapa de manutenção do tratamento, que visa a aumentar a qualidade de vida e também a evitar/minimizar os prejuízos de uma recaída. Diferentes drogas têm sido testadas (ver revisão de Zernig et al., 1997), mas as expectativas de sucesso têm sido concentradas no uso do acamprosato (Wilde e Wagstaff, 1997; Madamba et al., 1996; Berton et al., 1998), e do antagonista opióide naltrexona (Volpiccelli et al., 1992; O'Malley et al., 1992; O'Malley et al., 1996; Ciraullo et al., 1997).

O aumento da eficácia de novas drogas e, conseqüentemente, da resposta terapêutica ao tratamento do alcoolismo, está diretamente relacionado a uma

maior compreensão dos mecanismos de ação do etanol e de seus efeitos em diferentes sistemas de neurotransmissão central.

1.2 EFEITOS DO ETANOL NO SNC

Ao contrário de outras drogas psicotrópicas, o etanol não produz seus efeitos centrais ligando-se a receptores específicos para iniciar suas ações (Tabakoff et al., 1995). É ainda aceita a idéia de que o etanol penetra na membrana devido a uma alteração no arranjo primário de sua estrutura lipídica, tornando-a mais fluida (Chin & Goldstein, 1977, Litierton, 1980; Franks e Lieb, 1984). Também tem sido bastante estudada a participação de diversos sistemas de neurotransmissão nas ações fisiológicas e farmacológicas do etanol.

Tem sido demonstrado que o etanol influencia a liberação das principais monoaminas presentes no SNC: dopamina (Kiianmaa e Tabakoff, 1983), serotonina (5-HT) (Tabakoff et al., 1977), noradrenalina (Hoffman e Tabakoff, 1983) e acetilcolina (Erickson e Graham, 1973). O etanol ativa o disparo neuronal dopaminérgico na área tegmental ventral do mesencéfalo e também a liberação dopaminérgica no núcleo accumbens, estruturas que fazem parte da via mesolímbica. A ativação dessa via é essencial para os efeitos de recompensa do etanol (Diana et al., 1992), podendo esse efeito ser demonstrado, em animais, através da associação entre a auto-administração crônica de etanol e o aumento na liberação de dopamina no núcleo accumbens (Weiss et al., 1993).

As ações do etanol sobre o sistema dopaminérgico parecem ativar indiretamente vias serotoninérgicas, uma vez que podem ser atenuadas por antagonistas do receptor 5-HT₃ (Carboni et al., 1989). A relação entre etanol e receptores 5-HT₃ também tem sido demonstrada em trabalhos centrados na teoria de que baixos níveis de 5-HT no cérebro podem ser um fator de risco para o alcoolismo (Lovinger, 1991).

Estudos que avaliam funções cognitivas associam a ingestão crônica de etanol com a redução na concentração cerebral de acetilcolina, tanto em humanos quanto em ratos, causada por degeneração do tecido cerebral (Sasaki et al., 1995). A noradrenalina também está envolvida nos fenômenos ligados à abstinência alcoólica. Alguns trabalhos demonstram que a hiperestimulação adrenérgica, que pode ser intensa nesse período, deve-se a uma redução da atividade de adrenoceptores inibitórios pré-sinápticos do subtipo α_2 (Nutt et al., 1988).

Recentemente, vários autores vêm se dedicando ao estudo do envolvimento das ações do etanol em sistemas de aminoácidos neurotransmissores. Nesses trabalhos, destaca-se o papel do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) (Hoffman et al., 1989), e dos receptores GABA_A e GABA_B, (Mizutani et al., 1993; Korpi, 1994).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos. Os receptores glutamatérgicos estão divididos em duas grandes famílias: receptores metabotrópicos e ionotrópicos. Os primeiros, relativamente

pouco conhecidos, são acoplados a efetores intracelulares via proteína G. Os ionotrópicos estão acoplados a canais iônicos, possuindo capacidades variadas de condutância. Nesses receptores, o sítio de ligação do agonista e o canal iônico integram o mesmo complexo molecular (Coilingridge e Lester, 1989). São conhecidos três subtipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos: o NMDA, o AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico) e o cainato, sendo o NMDA o mais estudado.

O complexo receptor NMDA é controlado por vários sítios regulatórios (Tsai et al., 1995; Morato e Khanna, 1996). Para a abertura do canal iônico do receptor NMDA, é necessária a presença da glicina, um aminoácido que possui sítio próprio, atuando como co-agonista (Kleckner e Digledine, 1988). Tem sido demonstrado que o etanol pode atuar no sítio de ligação da glicina, inibindo a função do receptor NMDA (Woodward, 1994). E se procura estabelecer que esse receptor está envolvido em processos de aprendizagem e memória (Coilingridge e Lester, 1989) e na tolerância ao etanol (Khanna, 1990). Tal envolvimento, assim como o do etanol com o neurotransmissor inibitório GABA será discutido de forma mais detalhada posteriormente.

O etanol está ainda envolvido em uma série de outros mecanismos de ação no SNC: peptídeos e opióides endógenos também parecem influenciar as ações do etanol. Antagonistas de colecistocinina reduzem os efeitos convulsivantes da abstinência alcoólica em camundongos (Sing e Woodruff, 1992) e o antagonista opióide naltrexona, como já referido, tem ampla utilização clínica

no tratamento do alcoolismo, especialmente nos Estados Unidos (Volpiccelli et al., 1992; O'Malley et al., 1992; O'Malley et al., 1996; Ciraullo et al., 1997).

O etanol também influencia o fluxo de cálcio (Ca^{++}), através da membrana celular, reduzindo-o no período de intoxicação, por uma ação nos canais de cálcio do tipo-L. No período de abstinência alcoólica, há um aumento do influxo de Ca^{++} através desses canais, o que contribui para os sintomas da abstinência. Este efeito compensatório pode ser reduzido, em animais de laboratório, pela administração de antagonistas de canal de Ca^{++} como a nifedipina (Little, 1991).

Sistemas de segundo mensageiros e adenosina também parecem estar envolvidos nos efeitos de incoordenação motora induzidos pelo etanol no SNC (Saeed, 1993). A exposição aguda ao etanol altera a regulação da atividade da adenilato ciclase pela ação da proteína G inibitória (Gi). A exposição crônica pode resultar em uma modificação na estrutura da proteína G estimulatória (Gs) ou alterar as interações entre as subunidades da proteína G. Essas alterações interferem na estimulação da adenilato ciclase e na produção de AMPc, e parecem estar relacionadas com o desenvolvimento da tolerância ao etanol (Tabakoff et al., 1996). No entanto, outros estudos sugerem que não apenas um, mas múltiplos processos, podem estar envolvidos na regulação da atividade de segundos mensageiros pelo etanol (Gordon e Diamond, 1993).

1.3 SISTEMA GABAÉRGICO

O sistema GABAérgico, cujo neurotransmissor é o ácido γ -aminobutírico (GABA), é o principal sistema inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, estando presente também ao nível periférico. Esse sistema está espalhado por todo o SNC, sendo composto, em sua maioria, por interneurônios inibitórios. O GABA, descoberto por Roberts e Awapara em 1950, tem como precursor principal a glicose. A primeira etapa na sua formação ocorre pela ação da GABA α -oxoglutarato transaminase (GABA-T), sobre o α -cetoglutarato proveniente do metabolismo da glicose no ciclo de Krebs, transformando-o em ácido glutâmico. A enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) cataliza a descarboxilação do ácido glutâmico para formar o GABA. Esta enzima parece estar presente apenas em células que usam GABA como neurotransmissor, sendo um marcador bastante útil para o estudo das fibras GABAérgicas (para revisão ver Delorey e Olsen, 1994).

O GABA, após armazenado em vesículas nos terminais nervosos, é liberado na fenda sináptica por um processo de exocitose dependente de Ca^{++} . Após agir na fenda sináptica, é recaptado pelos terminais pré-sinápticos e células gliais próximas, por diferentes subtipos de sistemas de transportadores de membrana (Guastella et al., 1990). O GABA recaptado para dentro dos terminais nervosos é convertido em glutamina, pela ação da glutaminase, que por sua vez é transformada em glutamato, permitindo sua reentrada no circuito, para nova síntese de GABA. Já o GABA recaptado para a glia é metabolizado pela ação da

GABA-T em semialdeído succínico, e não pode ser reutilizado, tendo em vista que as células gliais não possuem GAD (McGeer e McGeer, 1989).

O GABA pode interagir com três subtipos de receptores, que são classificados, de acordo com suas características eletrofisiológicas e farmacológicas, em GABA_A, GABA_B, e GABA_C.

Receptores GABA_A e GABA_C

O receptor GABA_A é parte de um complexo macromolecular GABA/benzodiazepínico, que consiste em quatro sub-unidades: α , β , γ e δ . Acredita-se que esses receptores sejam heteroméricos e compostos de arranjos $\alpha\beta\gamma$ e $\alpha\beta\delta$ em uma mesma subunidade (DeLorey e Olsen, 1994). Clonado há cerca de 12 anos por Schofield et al. (1987), o receptor GABA_A está ligado a canais de Cl⁻ que são inibidos pelo alcalóide bicuculina, que reduz a corrente iônica pela redução da frequência e do tempo médio de abertura do canal de Cl⁻ (Macdonald et al., 1991), reduzindo, assim, a corrente iônica.

O receptor GABA_A tem sítios de ligação para GABA, benzodiazepínicos, barbitúricos, esteróides e picrotoxina (localizados próximos ou dentro dos canais de Cl⁻), os quais modulam a resposta do receptor à estimulação GABAérgica (DeLorey e Olsen, 1995). Há estudos demonstrando que outras drogas, incluindo o etanol, também interagem com o complexo receptor GABA_A (Allan e Harris, 1987; Liljequist e Engel, 1982; Shefner, 1990).

A respeito ao receptor GABA_C, apesar deste ser um receptor ionotrópico e de estar ligado a canais de cloreto, ele tem propriedades farmacológicas distintas do receptor GABA_A. Esses receptores são encontrados em várias regiões do SNC e também na retina, onde podem desempenhar um papel importante no processamento da informação visual (Lukasiewicz, 1996). Pouco se sabe sobre o papel funcional desse receptor.

Receptor GABA_B

Os receptores GABA_B pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G, tendo sido clonado recentemente por Kaupmann et al. (1997). Insensível à bicuculina, um antagonista clássico dos receptores GABA_A, tem o R-(-)-baclofeno (4-amino-3-(4-chlorophenyl)-GABA) como um agonista específico e o 2-hidroxi-saclofeno como antagonista específico (Bowery e Hudson, 1979; Bowery et al., 1981; Hil e Bowery, 1981).

Diversos estudos imunohistoquímicos e auto-radiográficos têm sido feitos, demonstrando que o receptor GABA_B está presente, nos mamíferos, em terminais axônicos e corpos celulares ganglionares espalhados pelo SNC. Entretanto, apresenta uma distribuição regional heterogênea, com densidades variáveis de acordo com a região: é abundante no córtex cerebral e em alguns núcleos talâmicos e está presente em densidades moderadas na região hipocampal (Chu et al., 1990; Waldvogel et al., 1990; Bowery et al., 1987).

Os receptores GABA_B são classificados como auto-receptor pré-sináptico, hetero-receptor pré-sináptico e receptor pós-sináptico, de acordo com sua localização na membrana neuronal e função fisiológica (Bowery, 1993).

Pesquisadores vem tentando esclarecer como a ativação de receptores pré-sinápticos ligados a proteína G conduzem a uma redução no influxo de Ca⁺⁺ (Mintz e Bean, 1993; Wheeler et al., 1994; Kerr e Ong, 1994), fenômeno inicialmente demonstrado por Duniap e Fishbach (1978), em experimento utilizando cultura de células ganglionares de embrião. Como existe uma vasta literatura a respeito, com diferentes mecanismos sendo sugeridos (para revisão ver Bowery, 1993), é possível que mais de um mecanismo e/ou que mais de um tipo de canal de Ca⁺⁺ estejam envolvidos nessa ação inibitória insensível à bicuculina (Rhim et al., 1996; Kerr e Ong, 1994). Na maior parte dos casos, essas ações de redução de influxo através de canais de Ca⁺⁺ são mediadas pela subunidade α_o da proteína G_o ativada (Campbell et al., 1993), embora também haja o envolvimento da proteína G, ambas sensíveis à toxina pertussis (PTX) (Katada e Ui, 1982).

Os auto-receptores pré-sinápticos modulam a liberação do neurotransmissor, sendo acionados pelo próprio neurotransmissor liberado na fenda sináptica. Os auto-receptores GABA_B foram demonstrados através da redução da liberação do neurotransmissor GABA sensível aos antagonistas GABA_B faclofeno e CGP 35348 (Bonanno et al., 1988; Waldmeier e Baumann, 1990). Outros estudos têm sugerido possíveis subtipos desses auto-receptores GABA_B. Bonanno e Raiteri (1989) demonstraram diferentes reduções na liberação

de GABA consistente com a ativação do auto-receptor GABA_B, em preparações corticais e da medula espinhal.

Tem sido demonstrado que a ativação de receptores GABA_B pós-sinápticos em diversas áreas do SNC de mamíferos conduz a um aumento na condutância de canais de K⁺, produzindo hiperpolarização da membrana (Li e Guyenet, 1996; Ogata et al., 1987; Stevens et al., 1985). Essa hiperpolarização reflete o potencial pós-sináptico inibitório lento, distinto do potencial pós-sináptico inibitório rápido gerado pela ativação dos receptores GABA_A (Bowery, 1993). Estudos recentes em fatias de hipocampo de rato têm sugerido mecanismos múltiplos de ação dos receptores GABA_B pós-sinápticos, envolvendo mecanismos sensíveis e insensíveis à condutância dos canais de K⁺ (Pham e Lacaille, 1996).

Após o histórico experimento conduzido por Bowery (1979), em que a bicuculina não antagonizou os efeitos da estimulação GABAérgica em terminais nervosos periféricos de rato, caracterizando a descoberta do receptor denominado GABA_B, inúmeros estudos vêm sendo feitos na busca de novos agonistas e antagonistas desse receptor. Os primeiros antagonistas GABA_B sintetizados foram o faclofeno (Kerr et al., 1986) e o 2-hidroxi-saclofeno (Ong et al., 1990a).

Embora esses antagonistas tenham sido utilizados em vários estudos de receptores GABA_B, em várias estruturas cerebrais e tecidos periféricos, a baixa potência deles levou à procura de novas substâncias. Algumas dessas drogas foram obtidas através da modificação do 2-hidroxi-saclofeno, o CGP 35348 (

Bittiger et al., 1993; Olpe et al., 1990), que penetra no sistema nervoso central, o que não ocorre com o saclofeno. Essa característica permite não apenas estudos *in vitro*, mas também estudos *in vivo*. Mudanças na estrutura básica de um análogo fraco de GABA, o ácido 3-aminopropil-fosfônico, ou 3-APPA, levaram à síntese do 3-APPiA (CGP 27492) (Dingwall et al., 1987).

Variações sistemáticas do CGP 27942 e do CGP 35348 deram origem a uma otimização da atividade ou da potência dessa série de ácidos propilfosfonados (Frömestl et al., 1992; Bittiger et al., 1993). Através destas modificações, surgiram o agonista CGP 35024, os antagonistas CGP 36742 (o primeiro antagonista GABA_B ativo por via oral), CGP 35348; CGP 5178; CGP 52432; CGP 54626; CGP 55845 e 3-APHPA, entre outros (Kerr e Ong, 1995), além de alguns sintetizados recentemente, como o CGP56433, utilizado neste estudo. A busca de novos agonistas/antagonistas que atuam no receptor GABA_B justifica-se não só para a aplicação no entendimento do mecanismo de ação desse receptor, mas também pelo potencial terapêutico dessas drogas, especialmente dos antagonistas GABA_B.

Alguns estudos com o agonista GABA_B (-)baclofeno em animais demonstram que esta droga reduz a contratilidade intestinal (Ong et al., 1983) e tem efeito antinociceptivo (Buritova et al., 1996). Contudo, seu uso clínico pode ser limitado devido aos efeitos colaterais, que incluem tonturas, náuseas e/ou vômitos. Na prática clínica, foi proposta uma alternativa para diminuir os efeitos colaterais, através do uso intratecal, como antiespástico, em casos de lesão medular, associado a analgésicos (Albright et al., 1993).

Com relação aos antagonistas GABA_B, modelos animais têm demonstrado que estes podem ser potencialmente úteis como uma nova classe de drogas antiepilépticas para o tratamento da epilepsia de ausência (Lemos, 1996; Bittiger et al., 1992). A administração crônica do CGP36742, em estudos de ligantes radioativos, levou a uma redução (*down-regulation*) de β -adrenoceptores no córtex frontal de rato, de forma similar à obtida pelo antidepressivo desipramina (Bowery, 1993). Estudos *in vitro* demonstraram que os antagonistas GABA_B podem facilitar a *long term potentiation* (LTP), considerada como a base neuronal da memória, em fatias de hipocampo de rato (Olpe e Karisson, 1990; Coilingridge et al., 1992).

Recentemente, além do desenvolvimento da tolerância estar relacionado à aprendizagem (Bitrán e Kaiant, 1991), também tem crescido o interesse pelo estudo do envolvimento dos antagonistas GABA_B nos processos de aprendizado e memória (Mondadori et al., 1993, 1996; Getova et al., 1997; Getova e Bowery, 1998).

1.4 TOLERÂNCIA AO ETANOL E PROCESSOS DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

O fenômeno da tolerância a drogas, incluindo o álcool, é considerado como um dos sintomas-chave da dependência e, por isso, tem sido bastante estudado. A tolerância pode ser classificada quanto à sua disponibilidade no organismo, ou

quanto à adaptação do organismo aos seus efeitos: a alteração da disponibilidade de drogas após a administração crônica pode contribuir para a redução de seus efeitos (Kaiant e Khanna, 1990). Estando menor a biodisponibilidade da droga, a tolerância é definida como disposicional ou farmacocinética.

A adaptação também pode ocorrer em nível do Sistema Nervoso Central. Logo, as células nervosas adaptam-se à droga tanto aumentando como diminuindo sua atividade normal. Em termos de função receptora, um aumento ou uma redução na densidade do receptor, ou em sua afinidade pela droga, pode ser observada (Samson e Harris, 1992). Esse tipo é chamado de tolerância farmacodinâmica ou funcional. Tolerância funcional é considerada como um processo adaptativo do organismo, não em relação à presença da droga, mas em relação ao efeito produzido pela droga (Kaiant, 1985; Kaiant e Khanna, 1990).

A tolerância pode desenvolver-se e ser estudada em uma abordagem temporal, que permite classificá-la em tolerância aguda, rápida e crônica, de acordo com a velocidade e o aparecimento do fenômeno. A tolerância aguda é vista no curso de uma única exposição à droga. Esse tipo de tolerância foi primeiramente descrito para o etanol por Mellanby (1919). Outros experimentos demonstraram que a tolerância aguda era observada, mesmo estando as concentrações plasmáticas e cerebrais do etanol aumentadas ou inalteradas (LeBlanc et al., 1975).

A tolerância rápida, que é predominantemente funcional, aparece em resposta a uma segunda dose de etanol, administrada cerca de 8 a 24 horas após

a primeira dose ter sido metabolizada (Crabble et al. 1979). Nesse modelo, animais recebiam uma droga em dois dias consecutivos, e a tolerância era deduzida pela redução da resposta à droga no segundo dia. Essa forma de tolerância parece ser mais funcional do que disposicional, uma vez que as concentrações plasmáticas de etanol tanto no grupo experimental como no de controle, no segundo dia do experimento, são similares. A tolerância rápida ao etanol e outras drogas tem sido considerada como um parâmetro de tolerância crônica, já que resultados similares foram obtidos através de paradigmas crônicos e rápidos envolvendo tolerância ao etanol e tolerância cruzada a outras drogas (Khanna et al., 1991).

A tolerância crônica, que é a forma mais estudada de tolerância, desenvolve-se gradualmente ao longo de exposições repetidas ao etanol, e tanto os componentes funcionais como os disposicionais podem contribuir para a tolerância crônica, ou para a tolerância crônica cruzada entre o etanol e outras drogas (Kalant et al, 1971). Além do mais, a tolerância rápida cruzada entre o etanol, barbitúricos e benzodiazepínicos tem sido demonstrada sob determinadas circunstâncias (Chen et al., 1985; Khanna et al, 1991; 1992a).

O estudo da tolerância é importante (i) para que possa ser detectada prontamente, permitindo, assim, ajustes de dosagens e facilitando a interpretação forense de controle dos níveis plasmáticos de etanol; (ii) para um melhor conhecimento e estudo do processo de dependência física; e (iii) porque os mecanismos de tolerância podem ser ilustrativos de processos fundamentais de

resposta biológica ao etanol. Nesse último caso, a tolerância é vista simplesmente como um exemplo de capacidade adaptativa biológica, da qual fazem parte a adaptação fisiológica e a aprendizagem, entre outros (Kalant e Khanna, 1990).

O aumento da eficácia das sinapses, a já citada LTP, uma forma de potenciação de longa duração, tem sido sugerido como a base neuronal da memória (Collingridge e Singer, 1990; Zalustsky e Nicoll, 1990). Tem sido sugerido, ainda, que a LTP está ligada diretamente ao sistema glutamatérgico (Bliss e Collingridge, 1993) e que, sofre influência do óxido nítrico na sua formação (Zalustsky e Nicoll, 1990).

Estudos têm demonstrado que antagonistas do receptor glutamatérgico NMDA bloqueiam a LTP e inibem o aprendizado (Collingridge et al., 1992) e o desenvolvimento de tolerância ao etanol (Szabó et al., 1994; Trujillo e Akil, 1995; Barreto et al., 1998). Recentemente, o óxido nítrico (NO), um composto sintetizado de resíduos L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase, foi descrito como um mensageiro neuronal. Recentes trabalhos sugerem que o NO sintetizado no neurônio pós-sináptico tem efeito na expressão de LTP induzida pela ativação receptores NMDA pós-sinápticos (Recasens, 1995). O NO foi relacionado a um importante papel no desenvolvimento do aprendizado, uma vez que ratos tratados com o inibidor da NO sintase, nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) mostraram prejuízo na aprendizagem espacial, um efeito bloqueado por altas concentrações de L-arginina (Chapman et al., 1992). O tratamento prévio com L-NAME também resultou em prejuízo, dependente da dose, na performance na fase de desenvolvimento em uma tarefa no labirinto (Yamada et al., 1995).

Embora os estudos sobre a participação do sistema GABAérgico no desenvolvimento da tolerância aos efeitos do etanol tenham se intensificado nos últimos anos (Hoffman et al.,1990, Karcz-Kubicha et al., 1995), especialmente no que diz respeito ao envolvimento do receptor GABA_A (Liljequist e Engel,1982; Allan e Harris, 1987; Shefner, 1990; Tabakoff et al., 1995), pouco se sabe sobre as interações do etanol com o sistema GABA_B.

Sabe-se, sim, que os antagonistas do receptor GABA_B, como o faclofeno, revertem o efeito convulsivante do etanol (Mehta e Ticku, 1990) e aumentam a hiperexcitabilidade motora observada na abstinência ao etanol (Mead e Little, 1995). Também já foi demonstrado que o etanol facilita a ligação específica do neurotransmissor GABA aos receptores GABA_B cerebrais (Mizutani et al.,1993).

Davies et al. (1991) relataram que receptores GABA_B também exercem um papel modulatório sobre a LTP. Em 1993, Mondadori et al., estudando o desempenho cognitivo de camundongos, ratos e macacos, demonstraram que o bloqueio de receptores GABA_B facilita o aprendizado desses animais em testes de esquiva passiva, aprendizado social e teste de condicionamento cor-espaço.

A associação dessas informações, aliada à importância do aprendizado na tolerância, permite pressupor a participação dos receptores GABA_B no processo adaptativo frente à presença de etanol no organismo (Mondadori et.al.1993). Assim, no presente estudo, procurou-se verificar a participação do sistema GABA_B no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Cabe ressaltar que,

sobre essa forma de interação, nenhum trabalho se encontra disponível na literatura, até o presente momento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência do receptor GABA_B na aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol no modelo do rota-rod.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Confirmar resultados obtidos anteriormente, em que uma dose mínima adicional de etanol, no primeiro dia, foi necessária para o desenvolvimento da tolerância rápida.

2.2.2. Verificar a confiabilidade de modelo do rota-rod na observação da influência de drogas sobre a facilitação do desenvolvimento da tolerância rápida, em camundongos.

2.2.3. Estudar a influência do (-)baclofeno, agonista GABA_B, sobre o desenvolvimento da tolerância rápida.

2.2.4. Analisar a influência do CGP36742 e do CGP56433, ambos antagonistas GABA_B, na aquisição da tolerância rápida, comparando esses efeitos.

2.2.5. Investigar a interferência de uma possível interação farmacocinética, entre as diversas drogas utilizadas e o etanol, através da coleta de amostras de sangue para análise da alcoolemia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos suíços machos, criados no biotério setorial do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, com 2 a 3 meses de idade e peso entre 20 – 30 g. Os animais foram alocados em gaiolas plásticas, sendo mantidos em ambiente com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, com 12 h de ciclo claro-escuro (7:00 às 19:00 h) e livre acesso a água e comida.

3.2 DROGAS E SOLUÇÕES ADMINISTRADAS

Os experimentos foram realizados com o uso das seguintes drogas e soluções: etanol absoluto p.a. Merck (grau de pureza 99,8%), diluído em solução fisiológica a 14% (p/v); D-cicloserina (Research Biochemical International - EUA); (-)baclofeno (Ciba Geigy); CGP36742 (Ciba Geigy) e CGP56433 (Ciba Geigy), preparadas nas concentrações apropriadas, em solução fisiológica. A solução fisiológica (salina) foi preparada com NaCl Merck em água destilada, na concentração de 0,9%.

3.3 EQUIPAMENTO

Todos os experimentos foram realizados no aparelho do rota-rod, fabricado pela Columbus Instruments International Corporation. O rota-rod consiste em 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 r.p.m./s. Abaixo do eixo, localiza-se um sistema

fotoelétrico, que permite o registro de 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 o registro dos dados.

3.4 PROCEDIMENTO GERAL

a) Treinamento dos animais

Os camundongos foram submetidos a 3 sessões de treino diárias no aparelho do rota-rod, sob aceleração contínua (1rpm/s) durante 5 dias, visando a seleção para os experimentos. Ao cair, receberam um choque de 0,5 mA. Após o período de testes, foram selecionados aqueles que se mantinham em uma linha de base estável mínima de 20 rpm. Aproximadamente 80% dos animais foram aproveitados, com valores basais entre 20 e 40 rpm. O equipamento, com quatro compartimentos, permitiu o treinamento de quatro animais de cada vez, com intervalo de tempo, entre um treino e outro, de cerca de dois minutos.

b) Teste dos animais

No início de cada experimento no teste do rota-rod, foi registrado o tempo de queda do animal selecionado, antes da administração de qualquer solução. Essa medida basal serviu como parâmetro para o cálculo percentual da queda após a administração de drogas por via i.p. Em seguida, o desempenho do animal foi medido em testes com intervalos de 5, 10 e 15 min após o tratamento. 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. Foi registrado, para cada animal, o pior desempenho, calculando-se, então, incoordenação motora máxima, de acordo com a seguinte fórmula:

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

3.5 DOSAGEM ALCOÓLICA

A dosagem alcoólica foi determinada por método enzimático, baseado na conversão do acetaldeído pela ação da desidrogenase. As amostras de sangue, de animais não selecionados nos testes, foram colhidas por punção intra-cardíaca (0,7-1 ml), com a utilização de uma agulha intradérmica, em seringa de 2 ml. O sangue foi então transferido para um tubo de ensaio contendo o anticoagulante EDTA, e armazenado em refrigerador. No momento das dosagens, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm, durante 10 minutos. Em seguida, foi retirado cerca de 0,3-0,5 ml do sobrenadante, adicionando-se uma solução composta de NAD, ADH, tampão de citrato de sódio, além do corante monotetrazolium. Após um período de repouso de 24 horas, a densidade ótica das amostras foi medida através de um espectrofotômetro, calculando-se, então, a concentração das amostras (mg/dl).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste t- de Student não pareado foi aplicado para análise dos experimentos iniciais na verificação do desenvolvimento da tolerância rápida com diferentes doses de etanol. A Análise da Variância de 2 Vias, seguida pelo teste de Tukey, foi utilizada para comparar os efeitos entre os grupos que receberam tratamento prévio com diferentes drogas, de acordo com os experimentos realizados no teste do rota-rod. Os grupos que receberam 2 tratamentos prévios foram submetidos à Análise da Variância de 3 Vias. Para as dosagens alcoólicas, foi realizada a Análise da Variância de 1 Via, no experimento que recebeu apenas o tratamento, e de 2 Vias, no experimento que recebeu tratamento prévio. O nível de significância mínimo considerado foi $p < 0,05$.

4. PROCEDIMENTOS E RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Avaliação do desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, com duas doses no primeiro dia.

Objetivo do experimento: Confirmar resultados obtidos em trabalhos anteriores, em que uma dose adicional de etanol no primeiro dia do experimento é necessária para o desenvolvimento da tolerância rápida.

Procedimento

Animais treinados e selecionados conforme protocolo descrito anteriormente, foram divididos em oito grupos (n= 10/grupo). No Dia 1, quatro grupos foram tratados com salina (controle) e os grupos experimentais receberam etanol (1,00; 1,50; 1,75 ou 2,00 g/kg). Todos os animais foram testados no rotarod de acordo com o procedimento geral. Duas horas depois do início do teste, os grupos experimentais receberam dose adicional de etanol (2,00; 1,50; 1,25 ou 1,0 g/kg, respectivamente), totalizando a dose de 3,0 g/kg, sendo que os animais dos grupos controle receberam salina. No Dia 2, todos os animais (experimentais e controle), receberam etanol nas doses empregadas no Dia 1 (1,00; 1,50; 1,75 ou 2,00 g/Kg), sem a dose adicional. O teste foi realizado do mesmo modo que no primeiro dia e a incoordenação motora máxima para cada grupo de animais foi calculada.

Resultado:

As figuras 1 e 2 ilustram o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol. Os resultados obtidos demonstraram que, no Dia 1, todos os grupos que receberam etanol apresentaram incoordenação motora significativa em relação aos grupos tratados com salina. No Dia 2, foi observado que o grupo tratado com etanol, na dose de 1,0 g/kg, seguida por dose adicional de 2,0 g/kg, no dia anterior, não apresentou tolerância rápida. A análise realizada através do teste t- de Student demonstrou os valores: $t_{(1,18)} = 1,664$; $p = 0,3727$, não havendo redução significativa da incoordenação motora induzida pelo etanol. O grupo tratado com etanol, na dose de 2,0 g/kg, também não apresentou redução significativa da incoordenação motora, com o teste t- de Student apresentando os seguintes valores, considerados não significantes: $t_{(1,18)} = 1,103$; $p = 0,3634$. Já os grupos tratados no Dia 1 com as doses de 1,5 ou 1,75 g/kg, e dose adicional de 1,5 ou 1,25 g/kg, respectivamente, apresentaram redução significativa da incoordenação motora aos efeitos do etanol, no Dia 2. O teste t- de Student demonstrou os valores para a dose de 1,5 g/kg: $t_{(1,18)} = 3,292$; $p = 0,0041$. Para a dose de 1,75g/kg, o teste t- de Student demonstrou os valores: $t_{(1,18)} = 8,576$; $p < 0,0001$. Os resultados demonstraram que os grupos que receberam doses de 1,50+1,50 ou 1,75+1,25 g/kg de etanol, no Dia 1, desenvolveram tolerância rápida no Dia 2. Esse desenvolvimento foi mais evidente na dose de 1,75+1,25 g/kg.

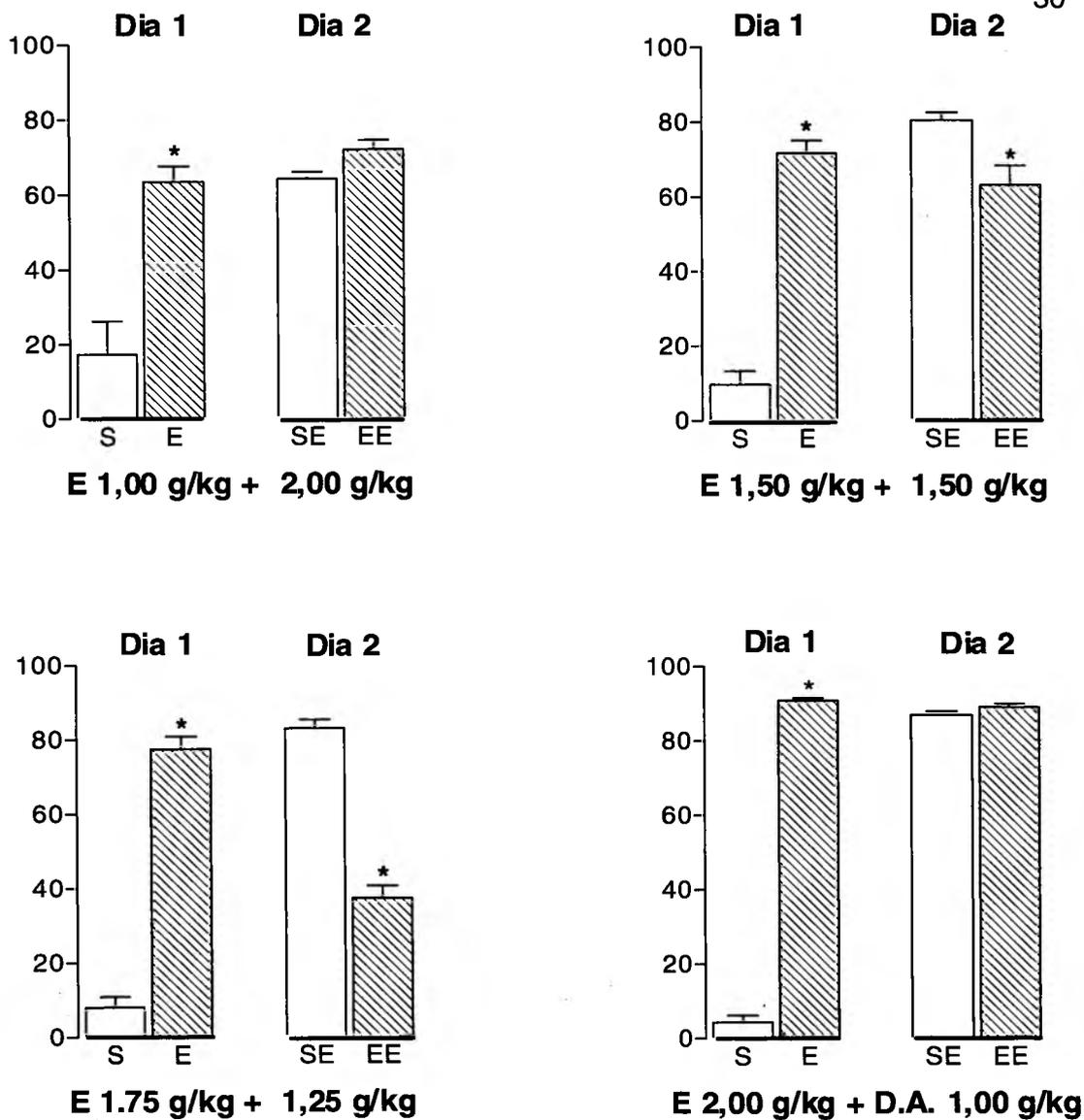


Figura 1 . Desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, na dose de 3 g/kg em camundongos, testados no rota-rod. No Dia 1, o grupo controle recebeu salina (S), i.p., e os demais grupos receberam etanol (E), i.p., nas doses de 1,00; 1,50; 1,75 ou 2,00 g/kg . Os animais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

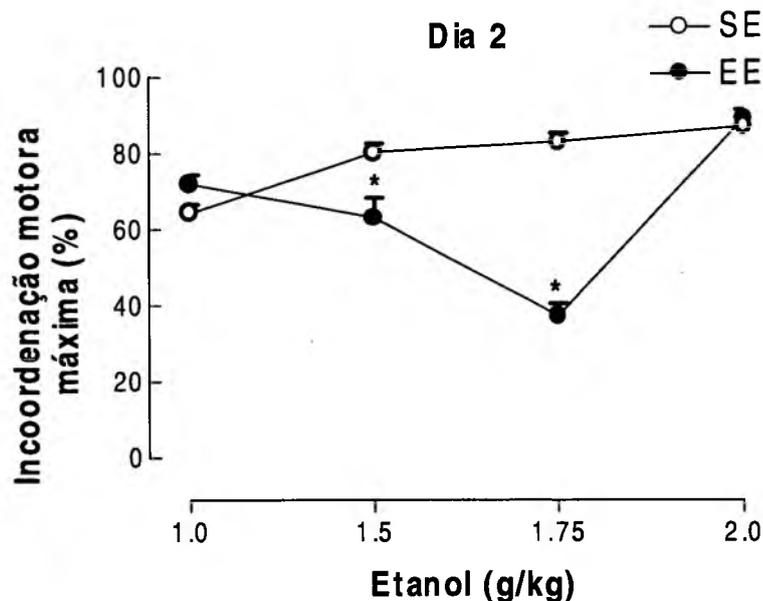


Figura 2. Efeitos de diferentes doses de etanol sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 2, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (o) representa os grupos controle, que receberam apenas salina no Dia 1. O símbolo (•) representa os animais que receberam etanol nos dois dias. Os resultados representam a média \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$, comparado ao respectivo grupo controle (teste "t" de Student).

4.2 Experimento 2: Estudo do desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, com doses adicionais inferiores a 1,25 g/kg.

Objetivo do experimento: Analisar se a redução da dose adicional de etanol, no Dia 1, influencia o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, no Dia 2.

Procedimento

Animais treinados e selecionados conforme protocolo, foram divididos em seis grupos ($n = 10$ /grupo). No Dia 1, os grupos foram tratados com salina (controle) i.p., e os grupos experimentais receberam etanol (1,75 g/kg) i.p. Cinco minutos mais tarde, foram realizados testes no aparelho do rota-rod, como

descrito no procedimento geral. Duas horas após o teste, os animais dos grupos controle receberam salina e os dos grupos experimentais receberam uma dose adicional de etanol (1,25; 1,00 ou 0,75 g/kg). No dia seguinte (Dia 2), todos os grupos foram tratados com etanol, na dose de 1,75 g/kg, e novamente submetidos ao teste no rota-rod. O teste foi realizado do mesmo modo que no primeiro dia, sendo calculada a incoordenação motora máxima para cada grupo de animais.

Resultado

A figura 3 demonstra o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, em cada dose testada. Os resultados do experimento indicaram que camundongos tratados com etanol, no Dia 1, na dose de 1,75 g/kg, apresentaram uma incoordenação motora significativa, quando comparados aos grupos controle. No Dia 2, foi observado que animais que receberam apenas salina (S) no Dia 1 (controle), apresentaram incoordenação motora significativa nos três grupos. O grupo experimental, que recebeu dose adicional de 1,25 g/kg no Dia 1, apresentou redução da incoordenação motora, desenvolvendo tolerância rápida, no Dia 2. Esse efeito foi significativo, pela análise estatística do teste t- de Student: $t_{(1,18)} = 11,379$; $p < 0,0001$. Já os demais grupos, que receberam uma dose total de 2,75 ou 2,50 g/Kg no Dia 1, não desenvolveram a tolerância rápida no Dia 2, com o teste t- de Student apresentando valores não significantes: $t_{(1,18)} = 0,073$; $p = 0,9425$ e $t_{(1,18)} = 1,481$; $p = 0,1559$, respectivamente.

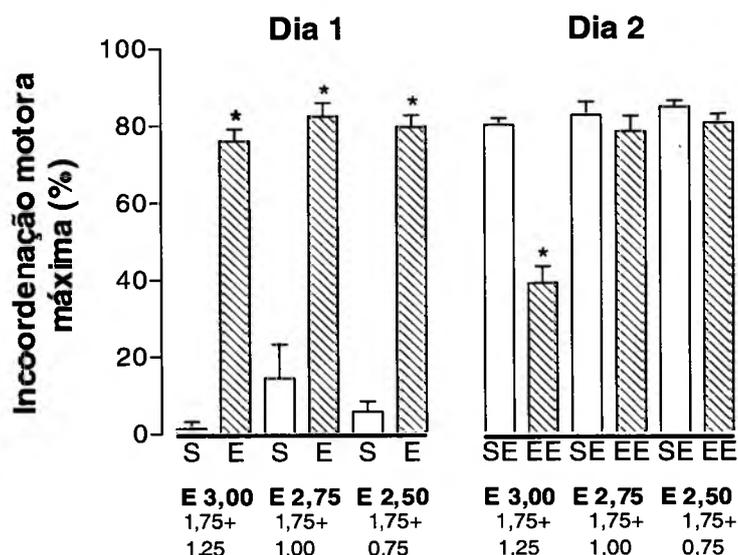


Figura 3 . Desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida por diferentes doses de etanol (2,50; 2,75 e 3,00 g/kg), em camundongos testados no rota-rod. No Dia 1, os grupos controle receberam salina (S), i.p., e os demais grupos receberam etanol (E), i.p., na dose de 1,75 g/kg. Os animais foram testados no rota-rod, 5 min após a injeção de salina ou etanol. Duas horas mais tarde, todos os grupos receberam uma dose adicional de etanol (E), complementando 3,00; 2,75 ou 2,50 g/kg. Os grupos controle receberam salina. Após 24 horas (Dia 2), todos os grupos, controle e experimentais, foram tratados com etanol, i.p., 1,75 g/kg, e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle (teste "t" de Student).

4.3 Experimento 3: influência da D-cicloserina sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod.

Objetivo do experimento: Analisar se o modelo do rota-rod em camundongos permite a verificação do efeito facilitatório da D-cicloserina sobre a aquisição da tolerância rápida ao etanol, de forma similar ao já observado em outros modelos animais.

Procedimento

Animais treinados e selecionados conforme protocolo foram divididos em quatro grupos por experimento ($n= 10/\text{grupo}$), sendo cada experimento realizado com uma dose de D-cicloserina (6,0 ou 10,0 mg/kg). Foram então denominados experimentos 3A e 3B, respectivamente. Os animais foram tratados previamente com salina ou D-cicloserina (6,0 ou 10,0 mg/kg). Após 30 min, os grupos controle receberam salina e os grupos experimentais etanol (1,75 g/kg). Depois de 5 min todos os grupos foram testados no rota-rod. Duas horas após a realização dos experimentos, os grupos controle receberam uma dose adicional de salina e os grupos experimentais etanol (1,00 g/kg). No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol (1,75 g/kg), sendo, 5 min mais tarde, testados no aparelho de rota-rod.

Resultado

As figuras 4 e 5 ilustram a influência da D-cicloserina sobre o desenvolvimento da tolerância rápida. A administração prévia de D-cicloserina, no Dia 1, na dose de 10 mg/kg, foi capaz de facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 2. No Dia 1, a Análise da Variância de Duas Vias (ANOVA) considerou significativa o fator tratamento (etanol ou salina), para os experimentos 3A: $F_{(1,36)}= 194,09$; $p<0,0001$; $F_{(1,36)}= 192,53$; $p<0,0001$; e 3B: $F_{(1,36)}= 441,92$; $p<0,0001$. A análise *post hoc* feita pelo teste de Tukey mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$), revelando o efeito agudo do etanol sobre a incoordenação motora dos animais submetidos ao teste do rota-rod (E) , comparados aos grupos controle (S). No Dia 2, não houve redução da

incoordenação motora induzida pelo etanol nos grupos que receberam etanol tanto no Dia 1 como no Dia 2 (EE), ou nos grupos que receberam tratamento prévio com D-cicloserina (6 mg/kg), no experimento 3A (D3/EE). Apenas no experimento 3B a Análise da Variância de Duas Vias considerou significante os fatores pré-tratamento (D-cicloserina ou salina): $F_{(1,36)}= 24,09$; $p<0,0001$; tratamento (etanol ou salina): $F_{(1,36)}= 22,99$; $p<0,0001$; e interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)}=24,61$; $p<0,0001$. A análise *post hoc*, feita pelo teste de Tukey, mostrou significância no Dia 2 ($p<0,05$), confirmando a facilitação do desenvolvimento da tolerância rápida pelo grupo que recebeu tratamento prévio com D-cicloserina, na dose de 10 mg/kg (D10/EE), no Dia 1, comparado aos grupos controle.

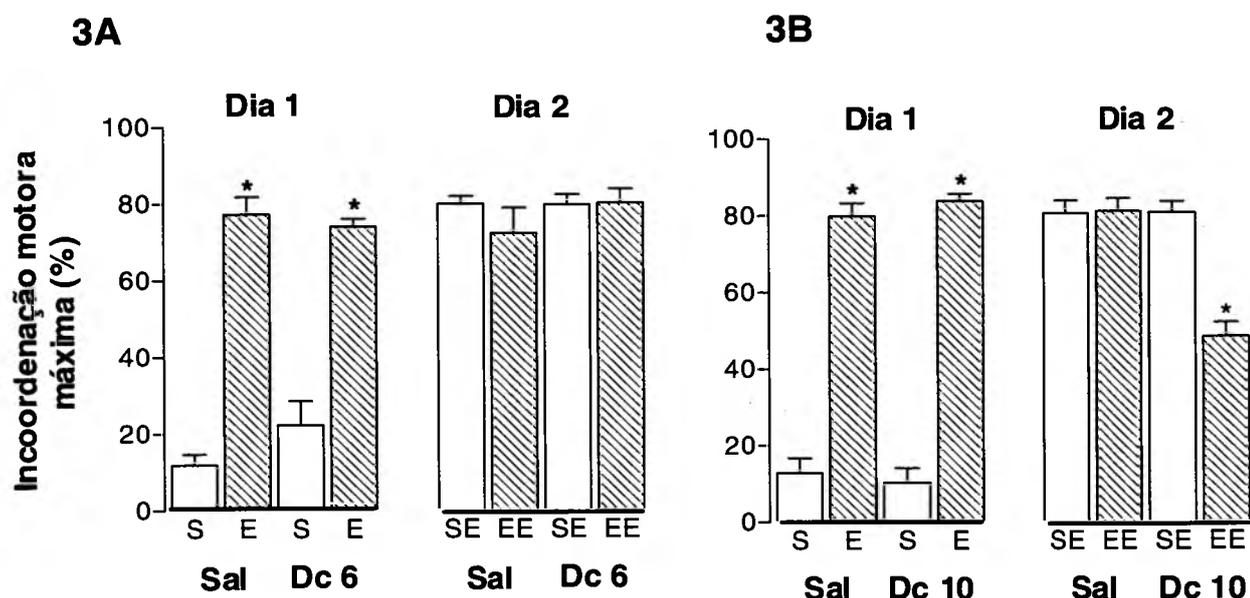


Figura 4. influência da D-cicloserina sobre o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, na dose de 2,75 g/kg, em camundongos testados no rota-rod. No Dia 1, os animais foram tratados com salina (Sal) ou D-cicloserina (Dc), i.p., nas doses de 6 ou 10 mg/kg. Após 30min. os grupos controle receberam salina (S) e os demais grupos receberam etanol (E), i.p., na dose de 1,75 g/kg. Os animais foram testados no rota-rod 5 min após a injeção de salina ou etanol. Duas horas mais tarde, os grupos experimentais receberam uma dose adicional de etanol, complementando 2,75 g/kg, e os grupos controle receberam salina. Após 24 horas (Dia 2), todos os grupos, controle (SE) e experimental (EE), foram tratados com etanol, i.p., 1,75 g/kg e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p<0,05$ comparado ao respectivo controle (ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey).

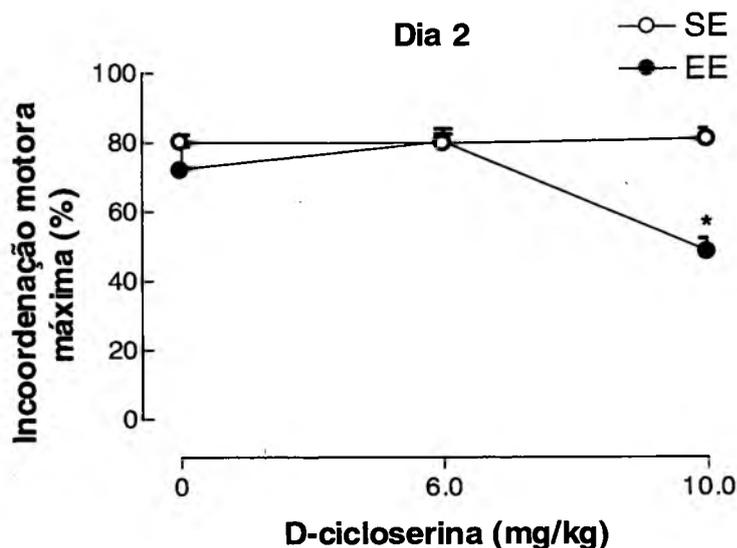


Figura 5. Efeitos da D-cicloserina, nas doses de 6 ou 10 mg/kg, sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no Dia 2, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (o) representa os grupos controle que receberam apenas salina no Dia 1. O símbolo (•) representa os animais que receberam etanol nos dois dias. Os resultados representam a média \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$, comparado ao respectivo controle (teste de Tukey).

4.4 Experimento 4: Influência do (-)baclofeno sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod.

Objetivo do experimento: Observar a participação do receptor GABA_B no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

Procedimento

Animais treinados e selecionados conforme protocolo, foram divididos em quatro grupos por experimento (n= 10/grupo), cada qual recebendo uma dose de (-)baclofeno (3,0; 5,0 ou 7,0 mg/kg). Foram então denominados experimentos 4A; 4B e 4C, respectivamente. Os animais foram tratados previamente com salina ou (-)baclofeno (3,0; 5,0 ou 7,0 mg/kg). Após 30 min, os grupos controle receberam

salina e os grupos experimentais etanol (1,75 g/kg). Depois de 5 min, todos os grupos foram testados no rota-rod. Duas horas após a realização dos experimentos os grupos controle receberam uma dose adicional de salina, e os grupos experimentais etanol (1,25 g/kg). No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol (1,75 g/kg), sendo, 5 min mais tarde, testados no aparelho de rota-rod. Dessa forma foi avaliada o efeito do (-)baclofeno no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

Resultado

As figuras 6 e 7 representam a influência do (-)baclofeno sobre o desenvolvimento da tolerância rápida. A administração prévia de (-)baclofeno, nas doses de 5 e 7 mg/kg, no Dia 1, foi eficaz em bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, no Dia 2. No Dia 1, A Análise da Variância de Duas Vias considerou significativa o fator tratamento (etanol ou salina), para os experimentos 4A: $F_{(1,36)} = 192,53$; $p < 0,0001$; 4B: $F_{(1,36)} = 358,23$; $p < 0,0001$ e 4C: $F_{(1,36)} = 183,62$; $p < 0,0001$. A análise *post hoc* feita pelo teste de Tukey foi considerada significativa ($p < 0,05$), demonstrando o efeito agudo do etanol sobre a incoordenação motora dos animais submetidos ao teste do rota-rod (E) , comparados aos grupos controle (S). Ainda no Dia 1, o efeito do pré-tratamento com (-)baclofeno foi significativo apenas no experimento 4C: $F_{(1,36)} = 27,02$ $p < 0,0001$, assim como a interação pré-tratamento x tratamento neste experimento: $F_{(1,36)} = 29,19$; $p < 0,0001$. Esses últimos dados são, provavelmente, devido ao efeito miorreaxante do (-)baclofeno, o que não foi observado com doses mais baixas, no estudo. No Dia 2, houve redução significativa da

incoordenação motora induzida pelo etanol, nos grupos controle que receberam etanol tanto no Dia 1 como no Dia 2 (EE). A Análise da Variância de Duas Vias considerou significativa o fator tratamento (etanol ou salina), para os experimentos 4A: $F_{(1,36)} = 61,15$; $p < 0,0001$; 4B: $F_{(1,36)} = 31,80$; $p < 0,0001$ e 4C: $F_{(1,36)} = 23,87$; $p < 0,0001$. A análise *post hoc*, feita pelo teste de Tukey, mostrou uma diferença estatisticamente significativa no Dia 2 ($p < 0,05$), confirmando o desenvolvimento da tolerância rápida para os grupos controle tratados com etanol nos dois dias, nos experimentos 4A; 4B e 4C (EE), e também no grupo que recebeu tratamento prévio com baclofeno, na dose de 3 mg/kg, no experimento 4A (B3/EE). A Análise da Variância de Duas Vias, no Dia 2, considerou significativa o fator pré-tratamento ((-)baclofeno ou salina) para os experimentos 4B: $F_{(1,36)} = 19,18$; $p < 0,0001$ e 4C: $F_{(1,36)} = 24,92$; $p < 0,0001$. A interação pré-tratamento x tratamento também foi considerada significativa para os experimentos 4B: $F_{(1,36)} = 25,92$; $p < 0,0001$ e 5C: $F_{(1,36)} = 42,23$; $p < 0,0001$. Esses resultados demonstram que o (-) baclofeno, nas doses de 5 e 7 mg/kg, administrado no Dia 1, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol, no Dia 2.

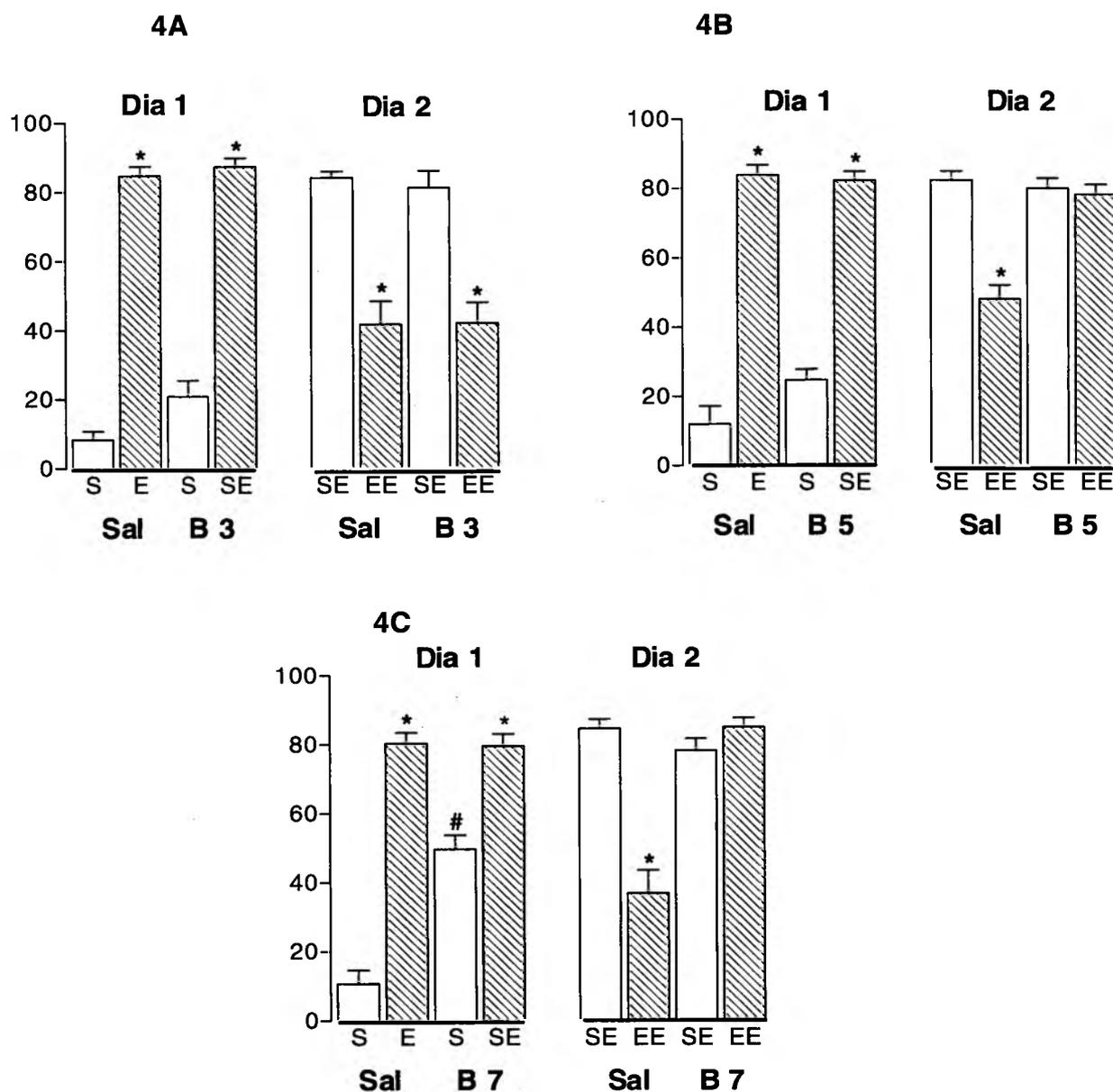


Figura 6. Influência do (-)-baclofeno (B 3; B 5 ou B 7), no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, em camundongos testados no rota-rod. No Dia 1, os animais foram tratados previamente com salina (Sal) ou (-)-baclofeno, i.p., nas doses de 3, 5 ou 7 mg/kg. Após 30min, os grupos controle receberam salina (S) e os demais grupos receberam etanol (E), i.p., na dose de 1,75 g/kg. Os animais foram testados no rota-rod 5 min após a injeção de salina ou etanol. Duas horas mais tarde, os grupos experimentais receberam uma dose adicional de etanol, complementando 3,0 g/kg, e os grupos controle receberam salina. Após 24 horas (Dia 2), todos os grupos, controle (SE) e experimental (EE), foram tratados com etanol, i.p., 1,75 g/kg e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com o grupo (S) (ANOVA de duas vias, seguida de teste de Tukey).

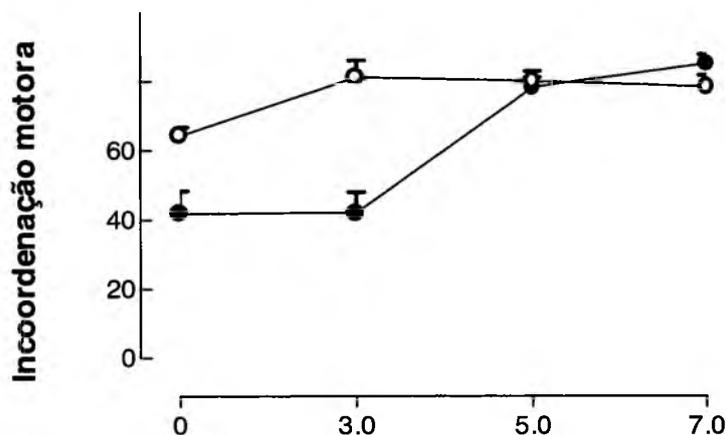


Figura 7. Efeitos do (-)baclofeno, nas doses de 3, 5 ou 7 mg/kg, sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no Dia 2, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (○) representa os grupos controle que receberam apenas salina no Dia 1, e etanol no Dia 2 (SE). O símbolo (●) representa os animais que receberam etanol nos dois dias (EE). Os resultados representam a média \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$, comparado ao respectivo grupo controle (teste de Tukey).

4.5 Experimento 5: Influência do CGP36742 sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod.

Objetivo do experimento: Observar a participação do receptor GABA_B na aquisição da tolerância rápida ao etanol

Procedimento

Animais treinados e selecionados conforme protocolo, foram divididos em quatro grupos por experimento (n= 10/grupo), cada qual com uma dose de CGP36742 (1,0; 3,0; 10,0 ou 30,0 mg/kg). Foram então denominados

experimentos 5A; 5B; 5C e 5D, respectivamente. Os animais foram tratados previamente com salina ou CGP36742 (1,0; 3,0 10,0 ou 30,0 mg/kg). Após trinta minutos, os grupos controle receberam salina e os grupos experimentais etanol (1,75 g/kg). Depois de 5 min todos os grupos foram testados no rota-rod. Duas horas após a realização dos experimentos, os grupos controle receberam uma dose adicional de salina, e os grupos experimentais etanol (1,00 g/Kg), totalizando 2,75 g/kg. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol (1,75 g/Kg), sendo testados no aparelho de rota-rod 5 min mais tarde.

Resultado

As figuras 7 e 8 apresentam os resultados da facilitação da aquisição da tolerância rápida pelo CGP36742. No Dia 1, a Análise da Variância de Duas Vias considerou significativa o fator tratamento (etanol ou salina), para os experimentos 5A: $F_{(1,36)} = 702,58$; $p < 0,0001$; 5B: $F_{(1,36)} = 1122,71$; $p < 0,0001$; 5C: $F_{(1,36)} = 464,72$; $p < 0,0001$ e 5D: $F_{(1,36)} = 293,89$; $p < 0,0001$. A análise *post hoc* feita pelo teste de Tukey foi significativa ($p < 0,05$), demonstrando o efeito agudo do etanol sobre a incoordenação motora dos animais submetidos ao teste do rota-rod (E), comparados aos grupos controle (S). Ainda no Dia 1, o efeito do pré-tratamento (CGP36742 ou salina) foi significativo apenas no experimento 5D: $F_{(1,36)} = 57,84$ $p < 0,0001$, assim como a interação pré-tratamento x tratamento neste experimento: $F_{(1,36)} = 39,01$; $p < 0,0001$. O teste de Tukey confirmou que o CGP36742, na dose de 30mg/kg, reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) os efeitos agudos do etanol sobre a incoordenação motora dos animais testados no rota-rod, comparados aos demais grupos, no Dia 1. No Dia 2, houve redução da incoordenação motora induzida pelo etanol nos grupos que receberam tratamento

prévio com CGP36742, nas doses de 3 e 10 mg/kg, seguido de etanol, no Dia 1 (C3/EE e C10/EE). Nesses experimentos, a Análise da Variância de Duas Vias considerou significativa os fatores pré-tratamento (CGP36742 ou salina): $F_{(1,36)}=18,81$; $p<0,0001$ e $F_{(1,36)}=30,83$; $p<0,0001$; tratamento (etanol ou salina): $F_{(1,36)}=24,87$; $p<0,0001$ e $F_{(1,36)}=44,51$; $p<0,0001$; e interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)}=13,15$ $p<0,0001$ e $F_{(1,36)}=18,87$; $p<0,0001$, respectivamente para os grupos 5B e 5C. A análise *post hoc*, feita pelo teste de Tukey, foi estatisticamente significativa ($p<0,05$) no Dia 2, confirmando o desenvolvimento da tolerância rápida para os grupos C3/EE e C10/EE, nos experimentos 5B e 5C, comparados aos grupos controle. Estes resultados demonstram que o CGP36742, nas doses de 3 e 10 mg/kg, facilitou a aquisição de tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol em camundongos, no modelo do rota-rod.

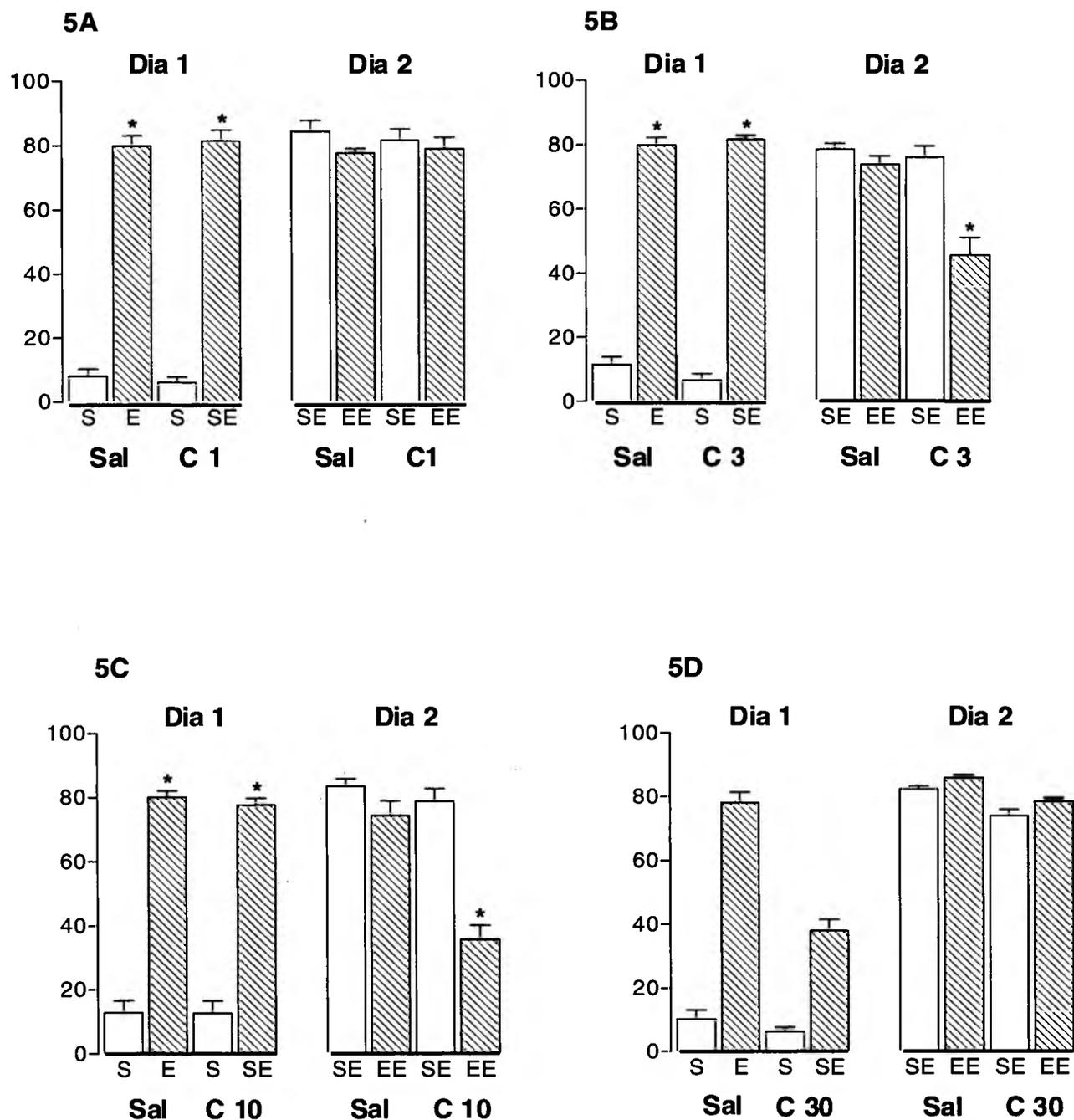


Figura 8. Influência do CGP36742 (C 1; C 3; C 10 ou C 30) no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, em camundongos testados no rota-rod. No Dia 1, os animais foram tratados previamente com salina (Sal) ou CGP36742, i.p., nas doses de 1, 3, 10 ou 30 mg/kg. Após 30 min os grupos controle receberam salina (S) e os demais grupos receberam etanol (E), i.p., na dose de 1,75 g/kg. Os animais foram testados no rota-rod 5 min após a injeção de salina ou etanol. Duas horas mais tarde, os grupos experimentais receberam uma dose adicional de etanol, complementando 2,75 g/kg, e os grupos controle receberam salina. Após 24 horas (Dia 2), todos os grupos, controle (SE) e experimental (EE), foram tratados com etanol, i.p., 1,75 g/kg e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle (ANOVA de duas-vias seguida de teste de Tukey).

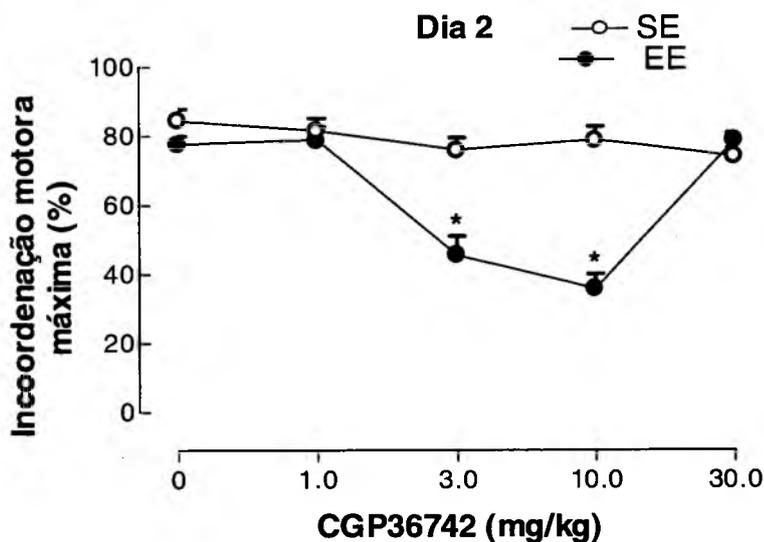


Figura 9. Efeitos do CGP36742, nas doses de 1, 3, 10 ou 30 mg/kg, administrado no Dia 1, sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod, no Dia 2. O símbolo (○) representa os grupos controle que receberam apenas salina no Dia 1, e etanol no Dia 2. O símbolo (●) representa os animais que receberam etanol nos dois dias. Os resultados representam a média \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$, comparado ao respectivo controle (teste de Tukey).

4.6 Experimento 6: Influência do CGP36742, seguido de (-)baclofeno, sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod.

Objetivo do experimento: Analisar a influência de mecanismos farmacológicos competitivos sobre a facilitação da aquisição da tolerância rápida induzida pelo bloqueio do receptor GABA_B.

Procedimento

Para este experimento, foram escolhidas as doses de CGP36742 que facilitaram o desenvolvimento de tolerância rápida, no experimento 5 (3 e 10 mg/kg), e o (-)baclofeno (5 mg/kg), que bloqueou o desenvolvimento de tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, no experimento 4. Foram então realizados dois experimentos, um para cada dose de CGP36742 referida acima, sendo denominados experimentos 6A e 6B. No primeiro, animais previamente treinados e selecionados foram divididos em oito grupos (n= 10/grupo). No Dia 1, os animais receberam o primeiro tratamento prévio (pré-tratamento 1), com salina ou CGP36742, nas doses de 3 ou 10 mg/kg, i.p. Após 30 min, foi administrado o segundo tratamento prévio (pré-tratamento 2), com salina ou (-)baclofeno, na dose de 5 mg/kg. Passados mais 20 min, cada grupo foi tratado com salina ou etanol 1,75 g/kg. Duas horas após, os grupos controle receberam salina, e os grupos experimentais dose adicional de etanol (1,0 g/kg), totalizando 2,75 g/kg. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol (1,75 g/kg, i.p.), e novamente testados no aparelho rota-rod, a fim de verificar a influência do CGP36742 sobre o tratamento prévio com (-)baclofeno 5 mg/kg, na aquisição da tolerância rápida ao etanol.

Resultado

A figura 10 retrata o resultado da interação CGP36742 e (-)baclofeno sobre o desenvolvimento da tolerância rápida. Os dados demonstraram que o CGP36742, nas doses de 3 e 10 mg/kg facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida. No entanto, não houve essa facilitação nos animais tratados com 3 mg/kg

de CGP36742 seguido por 5 mg/kg de (-)baclofeno. Foi observado ainda que o (-) baclofeno não impediu totalmente a facilitação do desenvolvimento da tolerância causada por 10 mg/kg de CGP36742. No Dia 1, a Análise da Variância de Três Vias considerou significativa somente o fator tratamento (etanol ou salina), para os experimentos 6A: $F_{(1,36)} = 1793,78$; $p < 0,0001$ e 6B: $F_{(1,36)} = 943,88$; $p < 0,0001$. A análise *post hoc* feita pelo teste de Tukey foi significativa ($p < 0,05$), revelando o efeito agudo do etanol sobre a incoordenação motora dos animais submetidos ao teste do rota-rod (E), comparados aos grupos controle (S). No Dia 2, em ambos os experimentos ocorreu redução da incoordenação motora induzida pelo etanol, nos grupos tratados com CGP36742 e salina, seguido de etanol 24 horas antes (C3+Sal/EE e C10+Sal/EE), confirmando os resultados obtidos nos experimentos 6B e 6C. Essa redução foi também observada nos grupos que receberam tratamento prévio com CGP36742 e (-)baclofeno, seguido de etanol, 24 horas antes (C3+B5/EE e C10+B5/EE). Para o Dia 2, a Análise da Variância de Três Vias considerou significativa todos os fatores: pré-tratamento 1 (CGP36742 ou salina): $F_{(1,72)} = 44,15$; $p < 0,0001$ e $F_{(1,72)} = 56,32$; $p < 0,0001$; pré-tratamento 2 ((-) baclofeno ou salina) $F_{(1,72)} = 9,48$; $p < 0,005$ e $F_{(1,72)} = 4,68$; $p < 0,03$; e tratamento (etanol ou salina): $F_{(1,72)} = 28,59$; $p < 0,0001$ e $F_{(1,72)} = 183,33$; $p < 0,0001$, respectivamente, para os experimentos 6A e 6B. Para as interações entre os tratamentos, a Análise da Variância de Três Vias demonstrou os seguintes efeitos, para todas as 4 combinações: pré-tratamento 1 x 2: $F_{(1,72)} = 6,46$; $p < 0,05$ e $F_{(1,72)} = 6,68$; $p < 0,05$; pré-tratamento 1 x tratamento: $F_{(1,72)} = 26,12$; $p < 0,0001$ e $F_{(1,72)} = 154,98$; $p < 0,0001$; pré-tratamento 2 x tratamento: $F_{(1,72)} = 17,44$; $p < 0,0001$ e $F_{(1,72)} = 9,47$; $p < 0,005$; pré-tratamento 1x 2 x tratamento: $F_{(1,72)} = 12,49$; $p < 0,001$ e $F_{(1,72)} = 8,05$; $p < 0,01$, também respectivamente para os experimentos 6A e 6B.

Com relação ao experimento 6A, a análise *post hoc*, feita pelo teste de Tukey, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no Dia 2, confirmando a facilitação na aquisição da tolerância rápida apenas para o grupo C3+Sal/EE. Não ocorreu facilitação da tolerância rápida para o grupo C3+B5/EE, neste experimento, ou seja, a administração de (-)baclofeno foi capaz de reverter este efeito facilitatório do CGP36742, na dose de 3 mg/kg, neste estudo. Por sua vez, para o experimento 6B, a análise *post hoc*, feita pelo teste de Tukey, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no Dia 2, confirmando a facilitação na aquisição da tolerância rápida para os grupos C10+Sal/EE e C10+B5/EE, comparados aos demais grupos. O teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$), ao comparar os grupos C10+Sal/EE com o C10+B5/EE, no experimento 6B. Estes dados revelaram que o tratamento prévio com CGP36742, no Dia 1, foi eficaz em facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, comparados aos demais grupos, no Dia 2. Porém, essa facilitação foi completamente revertida no grupo tratados com CGP36742 seguido de baclofeno no primeiro experimento (6A), e parcialmente revertida no segundo (6B).

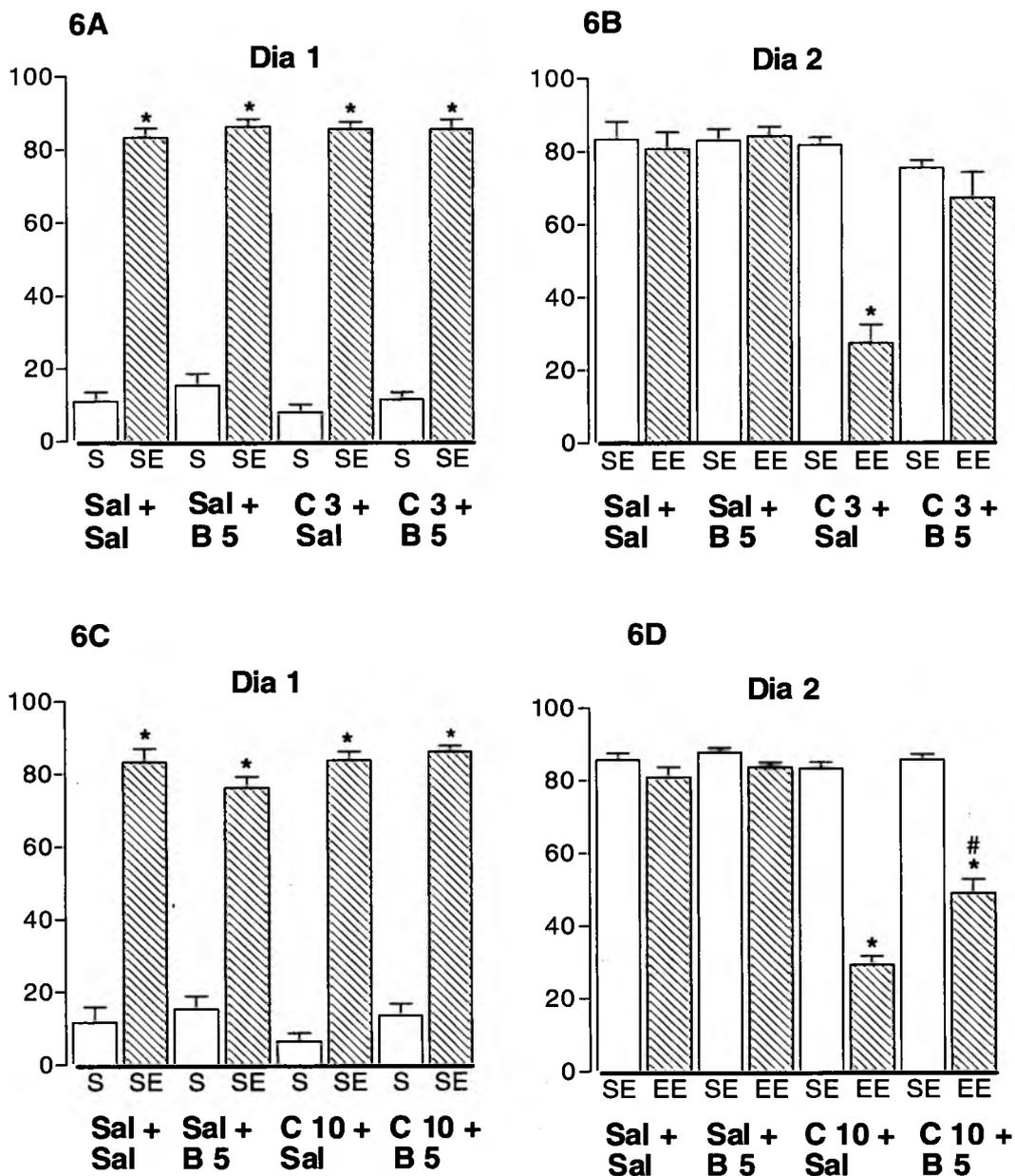


Figura 10. Influência do CGP36742 (C 3 ou C 10) seguido de (-)baclofeno (B 5), no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, em camundongos testados no rota-rod. No Dia 1, os animais foram tratados previamente com salina (Sal) ou CGP36742, i.p., nas doses de 3 ou 10 mg/kg. Após 30 min, foi administrado um segundo tratamento, em que os grupos controle receberam salina (Sal), i.p., e os demais grupos (-) baclofeno, i.p., na dose de 5 mg/kg. Passados 20 min, foi administrado um terceiro tratamento, com os grupos controle recebendo salina (S), i.p., e os grupos experimentais recebendo etanol (E), i.p., na dose de 1,75 g/kg. Os animais foram testados no rota-rod 5 min após a injeção de salina ou etanol. Duas horas mais tarde, os grupos experimentais receberam uma dose adicional de etanol, complementando 2,75 g/kg, e os grupos controle receberam salina. Após 24 horas (Dia 2), todos os grupos, controle (SE) e experimental (EE), foram tratados com etanol, i.p., 1,75 g/kg e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle, # $p < 0,05$ comparado com o grupo C10/SalEE (ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey).

4.7 Experimento 7: Influência do CGP56433 sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod.

Objetivo do experimento: Confirmar a participação do receptor GABA_B no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, através do bloqueio desse receptor por um segundo antagonista GABA_B.

Procedimento

Animais treinados e selecionados conforme protocolo, foram divididos em quatro grupos por experimento (n= 10/grupo; n= 40/experimento), cada qual com uma dose de CGP56433 (0,1; 0,3; 1,0 ou 3,0 mg/kg). Foram então denominados experimentos 7A; 7B; 7C e 7D, respectivamente. Os animais foram tratados previamente com salina ou CGP56433 (0,1; 0,3; 1,0 ou 3,0 mg/kg). Após trinta minutos, os grupos controle receberam salina e os grupos experimentais etanol (1,75 g/kg). Depois de 5 min todos os grupos foram testados no rota-rod. Duas horas após, os grupos controle receberam uma dose adicional de salina e os grupos experimentais etanol (1,00 g/kg), totalizando 2,75 g/kg. No dia seguinte todos os animais foram tratados com etanol (1,75 g/kg), e novamente testados no aparelho de rota-rod.

Resultado

Os resultados estão retratados na figuras 11 e 12. A administração do CGP56433 nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, no Dia 1, foi eficaz em facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo

etanol, no Dia 2. No Dia 1, A Análise da Variância de 2 Vias considerou significativa o fator tratamento (etanol ou salina), para os experimentos 7A: $F_{(1,72)}=1095,42$; $p<0,0001$; 7B: $F_{(1,72)}=1833,40$; $p<0,0001$; 7C: $F_{(1,72)}=287,80$; $p<0,0001$ e 7D: $F_{(1,72)}=2283,97$; $p<0,0001$. A análise *post hoc* feita pelo teste de Tukey foi significativa ($p<0,05$), refletindo o efeito agudo do etanol sobre a incoordenação motora dos animais submetidos ao teste do rota-rod (E), comparados aos grupos controle (S). No Dia 2, houve redução da incoordenação motora induzida pelo etanol nos grupos que receberam tratamento prévio com CGP56433, nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, seguido de etanol, no Dia 1(C0,3/EE; C1/EE e C3/EE). Nestes experimentos, a Análise da Variância de 2 Vias considerou significativa os fatores pré-tratamento (CGP56433): $F_{(1,72)}=11,60$; $p<0,005$; $F_{(1,36)}=26,55$; $p<0,0001$ e $F_{(1,36)}=82,41$; $p<0,0001$; tratamento (etanol ou salina): $F_{(1,72)}=5,59$; $p<0,05$; $F_{(1,72)}=46,12$; $p<0,0001$ e $F_{(1,72)}=33,97$; $p<0,0001$; e interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,72)}=12,47$; $p<0,005$; $F_{(1,72)}=30,47$; $p<0,0001$ e $F_{(1,72)}=51,19$; $p<0,0001$, respectivamente para os grupos 7B; 7C e 7D. A análise *post hoc*, feita pelo teste de Tukey, foi estatisticamente significativa no Dia 2, confirmando a facilitação da aquisição da tolerância rápida para os grupos C0,3/EE, C1/EE e C3/EE, nos experimentos 7B, 7C e 7D, comparados aos grupos controle. Esses resultados demonstram que o CGP56433, nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, facilitou a aquisição de tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol.

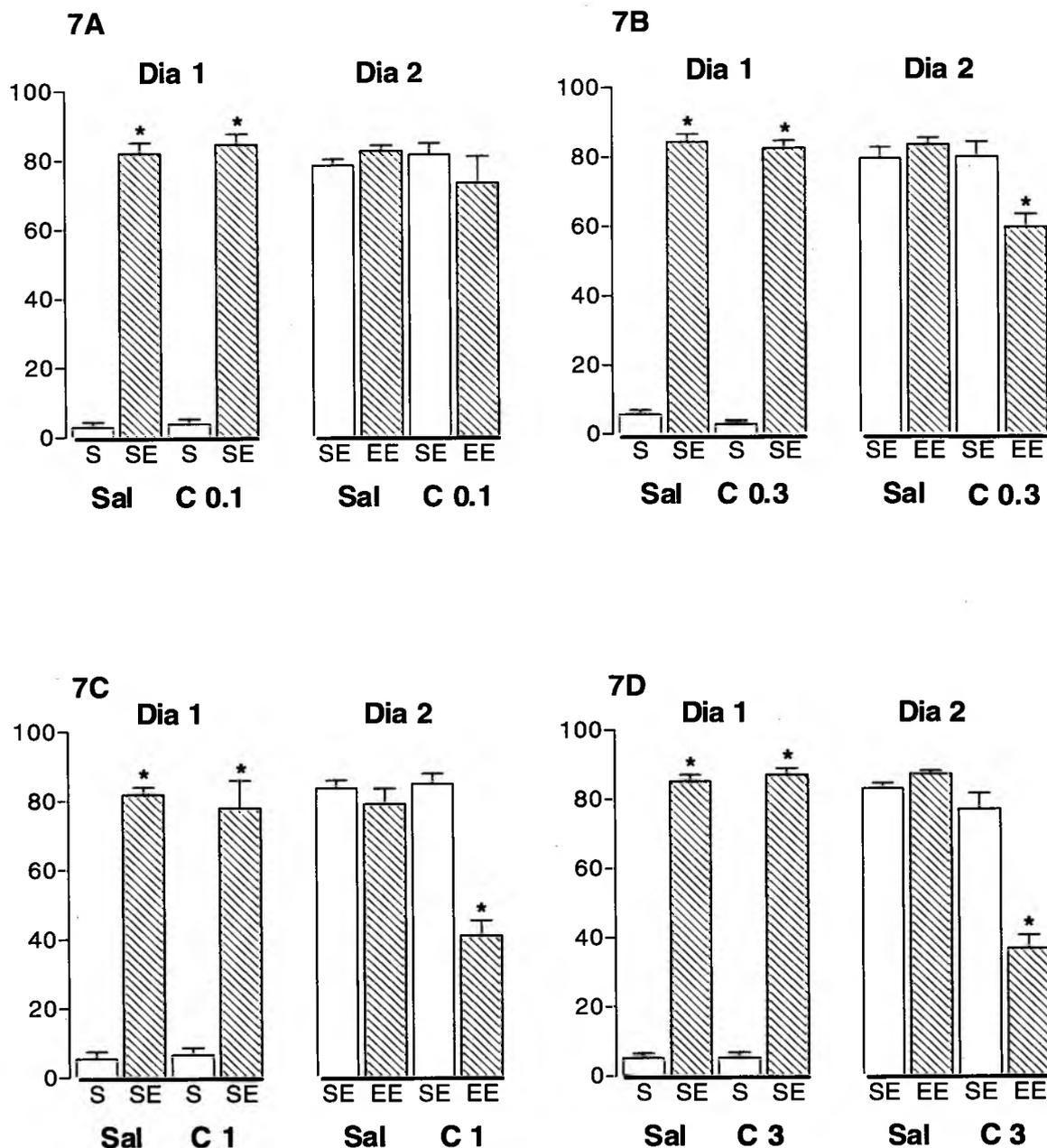


Figura 11. Influência do CGP56433 (C 0,1; C 0,3; C1 ou C3) no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, em camundongos testados no rota-rod. No Dia 1, os animais foram tratados previamente com salina (Sal) ou CGP56433, i.p., nas doses de 0,1; 0,3; 1,0 ou 3,0 mg/kg. Após 30 min, os grupos controle receberam salina (S) e os demais grupos receberam etanol (E), i.p., na dose de 1,75 g/kg. Os animais foram testados no rota-rod 5 min após a injeção de salina ou etanol. Duas horas mais tarde, os grupos experimentais receberam uma dose adicional de etanol, complementando 2,75 g/kg, e os grupos controle receberam salina. Após 24 horas (Dia 2), todos os grupos, controle (SE) e experimental (EE), foram tratados com etanol, i.p., 1,75 g/kg e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle (ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey).

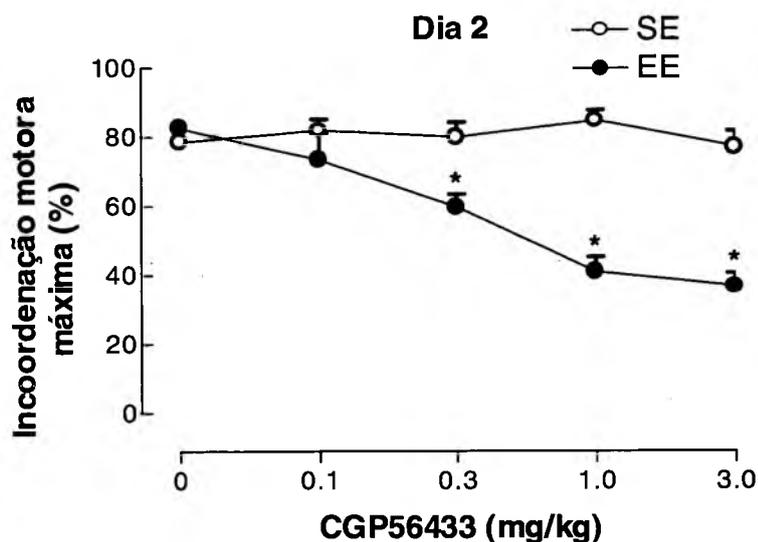


Figura 12. Efeitos do CGP56433, nas doses de 0,1; 0,3; 1,0 ou 3,0 mg/kg, administrado no Dia 1, sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod, no Dia 2. O símbolo (○) representa os grupos controle que receberam apenas salina no Dia 1, e etanol no Dia 2. O símbolo (●) representa os animais que receberam etanol nos dois dias. Os resultados representam a média \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$, comparado ao respectivo controle (teste de Tukey).

4.8 Experimento 8: Influência do CGP56433, seguido de (-)baclofeno, sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada pelo teste do rota-rod.

Objetivo do experimento: Verificar, a exemplo do objetivo do experimento 7, a influência de mecanismos farmacológicos competitivos sobre a aquisição da tolerância rápida facilitada pelo bloqueio do receptor GABA_B

Procedimento

Para este experimento, foram escolhidas as doses de CGP56433, que facilitaram o desenvolvimento de tolerância rápida (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg), no

experimento 7, e o (-)baclofeno, na dose de 5 mg/kg, que bloqueou o desenvolvimento de tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, no experimento 4. Foram então realizados três experimentos, um para cada dose de CGP56433 referida acima, denominados experimentos 9A, 9B e 9C. Animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em oito grupos (n= 10/grupo). No Dia 1, os animais receberam o primeiro tratamento prévio (pré-tratamento 1), com salina ou CGP56433, nas doses de 0,3, 1,0 ou 3,0 mg/kg, i.p. Após 30 min, foi administrado o segundo tratamento prévio (pré-tratamento 2), com salina ou (-)baclofeno, na dose de 5 mg/kg. Passados mais 20 min, cada grupo foi tratado com salina ou etanol, na dose de 1,75 g/kg, e testado no rota-rod 5 min depois. Duas horas após, os grupos controle receberam salina e os grupos experimentais dose adicional de etanol (1,0 g/kg), totalizando 2,75 g/kg. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol (1,75 g/kg, i.p.), e novamente testados no aparelho rota-rod.

Resultado

A figura 13 ilustra o resultado da interação entre o CGP56433 e o (-) baclofeno, e a influência no desenvolvimento da tolerância rápida. Os dados registrados revelam que o tratamento prévio com o CGP56433, na dose de 1,0 e 3,0 mg/kg, seguido de (-)baclofeno, no Dia 1, foi capaz de facilitar a aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, no Dia 2. No Dia 1 a Análise da Variância de Duas Vias considerou significativa o fator tratamento (etanol ou salina) para os experimentos 8A: $F_{(1,72)}= 3165,70$; $p<0,0001$; 8B: $F_{(1,72)}= 3789,25$; $p<0,0001$ e 8C: $F_{(1,72)}= 4281,68$; $p<0,0001$. A análise *post hoc* feita pelo teste de Tukey foi significativa ($p<0,05$), apontando o efeito agudo do etanol sobre

a incoordenação motora dos animais submetidos ao teste do rota-rod (E), comparados aos grupos controle (S). No Dia 2, houve redução significativa da incoordenação motora induzida pelo etanol, nos grupos tratados no Dia 1 com CGP56433 e salina, seguido de etanol (C0,3+Sal/EE; C1,0+Sal/EE e C3,0+Sal/EE), confirmando os resultados obtidos anteriormente neste estudo (experimento 6). A redução da incoordenação motora foi também observada, no Dia 2, nos experimentos 8B e 8C, para os grupos que receberam, no Dia 1, tratamento prévio com CGP56433 e (-)baclofeno, seguido de etanol (C1+B5/EE e C1+B5/EE). Para o Dia 2, com relação ao experimento 8A, a Análise da Variância de Três Vias considerou significativo os fatores: pré-tratamento 1 (CGP36742 ou salina): $F_{(1,72)} = 7,26; p < 0,01$; pré-tratamento 2 [(-)baclofeno) ou salina]: $F_{(1,72)} = 16,40; p < 0,0005$ e tratamento (etanol ou salina): $F_{(1,72)} = 12,49; p < 0,001$. Quanto às interações entre os tratamentos, também para o experimento 8A, a Análise da Variância de Duas Vias demonstrou os seguintes efeitos: pré-tratamento 1 x 2: $F_{(1,72)} = 7,39; p < 0,01$ e pré-tratamento 1 x tratamento: $F_{(1,72)} = 7,10; p < 0,01$; pré-tratamento 2 x tratamento: $F_{(1,72)} = 19,03; p < 0,0001$ e $F_{(1,72)} = 9,47; p < 0,005$; pré-tratamento 1x 2 x tratamento: $F_{(1,72)} = 12,49; p < 0,001$ e $F_{(1,72)} = 5,21; p < 0,05$. A análise *post hoc*, feita pelo teste de Tukey, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no Dia 2, confirmando a facilitação na aquisição da tolerância rápida para o grupo C0,3+Sal/EE, no experimento 8A. Não ocorreu facilitação da tolerância rápida para o grupo C0,3+B5/EE, neste experimento, ou seja, a administração de (-)baclofeno foi capaz de bloquear o efeito do CGP56433.

Já nos experimentos 8B e 8C, a Análise da Variância de Três Vias considerou significantes os fatores: pré-tratamento 1 (CGP36742 ou salina):

$F_{(1,72)} = 108,88$; $p < 0,0001$ e $F_{(1,72)} = 30,36$; $p < 0,0001$ e tratamento (etanol ou salina): $F_{(1,72)} = 116,25$; $p < 0,0001$ e $F_{(1,72)} = 28,67$; $p < 0,0001$, respectivamente para os experimentos 8B e 8C. A Análise da Variância de Três Vias demonstrou ainda o efeito da interação pré-tratamento 1 x tratamento: $F_{(1,72)} = 90,87$; $p < 0,0001$ e $F_{(1,72)} = 31,69$, respectivamente para os experimentos 8B e 8C. A análise *post hoc*, feita pelo teste de Tukey, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no Dia 2, confirmando a facilitação na aquisição da tolerância rápida para os grupos C3+Sal/EE e C3+B5/EE, no experimento 8B; C10+Sal/EE e C10+B5/EE, no experimento 8C, comparados aos demais grupos. O teste de Tukey, ao comparar os grupos que facilitaram a aquisição da tolerância rápida, tanto no experimento 8B como no 8C, considerou que não há diferença estatisticamente significativa entre eles, ou seja, a presença de (-)baclofeno não interferiu na eficácia do CGP56433, nas doses de 1 e 3 mg/kg, em facilitar a aquisição da tolerância rápida.

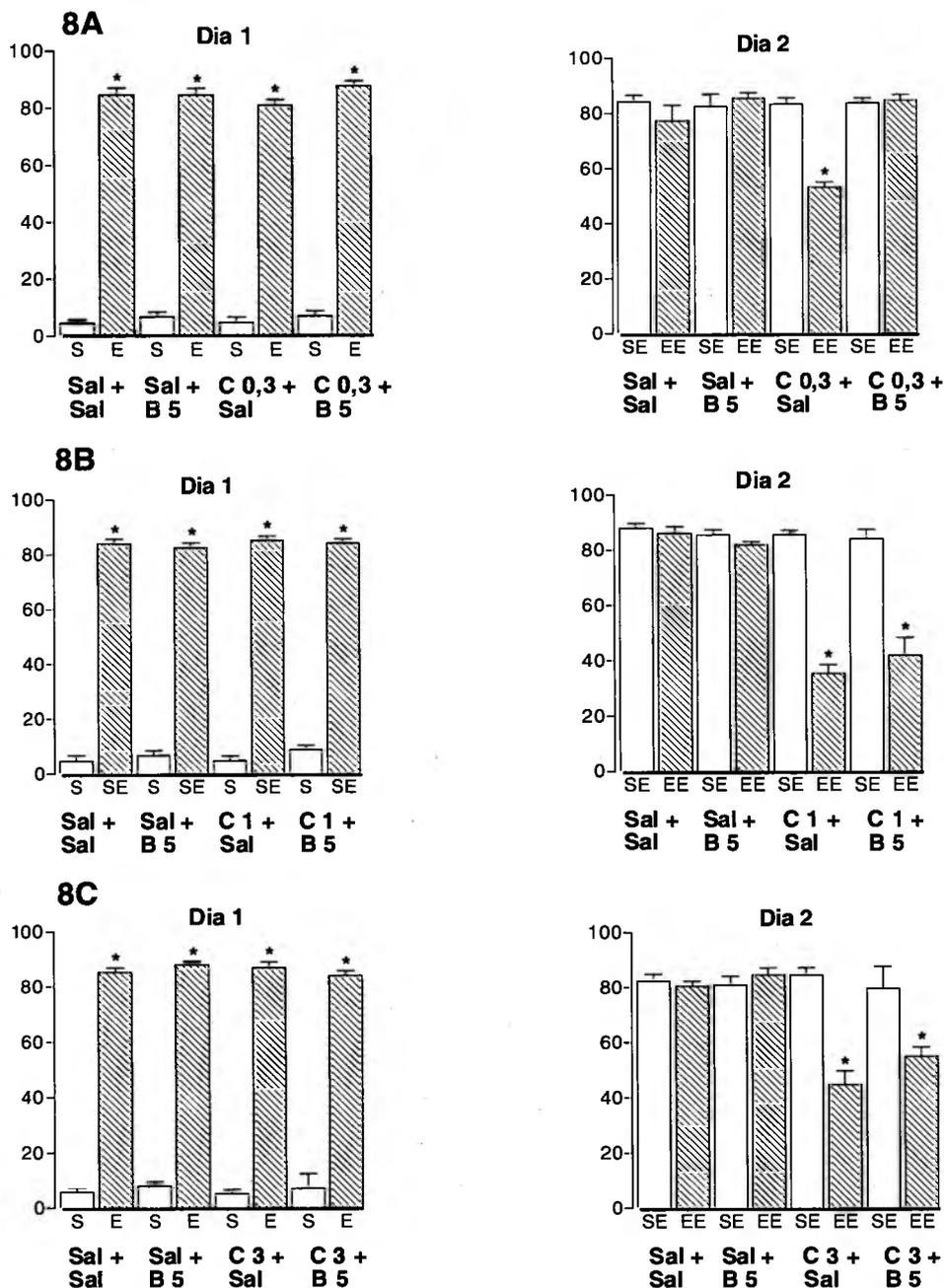


Figura 13. influência do CGP56433 (C 0,3; C 1 ou C 3) seguido de (-)baclofeno (B 5), no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, em camundongos testados no rota-rod. No Dia 1, os animais foram tratados previamente com salina (Sal) ou CGP56433, i.p., nas doses de 0,3; 1,0 ou 3,0 mg/kg. Após 30 min, foi administrado um segundo tratamento, em que os grupos controle receberam salina (Sal), i.p., e os demais grupos (-) baclofeno, i.p., na dose de 5 mg/kg. Passados 20 min, foi administrado um terceiro tratamento, com os grupos controle recebendo salina (S), i.p., e os grupos experimentais recebendo etanol (E), i.p., na dose de 1,75 g/kg. Os animais foram testados no rota-rod 5 min após a injeção de salina ou etanol. Duas horas mais tarde, os grupos experimentais receberam uma dose adicional de etanol, complementando 2,75 g/kg, e os grupos controle receberam salina. Após 24 horas (Dia 2), todos os grupos, controle (SE) e experimental (EE), foram tratados com etanol, i.p., 1,75 g/kg e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle (ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey).

4.9 Experimento 9: Dosagem alcoólica.

Objetivo do experimento: Analisar a possível interação farmacocinética entre o etanol e as diferentes drogas utilizadas nesse estudo.

Procedimento

Grupos de animais (n= 3) tratados previamente com D-cicloserina, nas doses de 6 ou 10 mg/kg; (D6 ou D10); (-)baclofeno nas doses de 3; 5 ou 7 mg/kg (B3; B5 ou B7); CGP36742 nas doses de 1; 3; 10 ou 30 mg/kg (C36/3;C36/10 e C36/30) ou CGP56433 nas doses de 0,1; 0,3; 1 ou 3 mg/kg (C56/0,1;C56/0,3;C56/1 ou C56/3, e que receberam etanol (1,75 g/kg) 30 min após, foram submetidos à punção intracardíaca, sendo então coletadas amostras de 0,5 ml de sangue (experimento 9A). A seguir, foi realizada alcoolemia, conforme técnica já descrita. O mesmo procedimento foi adotado para o experimento 9B, em que animais (n= 3) receberam 2 tratamentos prévios, com CGP36742 (3 ou 10 mg/kg) seguido por 5mg/kg de (-)baclofeno (C36/3+B ou C36/10+B) ou CGP56433 (0,3; 1 ou 3 mg/kg) seguido de 5mg/kg de (-)baclofeno (C56/0,3+B; C56/1+B ou C56/3+B). Os resultados foram comparados aos grupos-controle, que receberam GP36742 (C36/3+S ou C36/10+S); CGP56433 (C56/0,3+S; C56/1+S ou C56/3+S); (-)baclofeno (SB) ou salina (SS).

Resultado

As tabelas 2 e 3 retratam os níveis de alcoolemia em todos os grupos testados. No primeiro experimento, a Análise da Variância de Uma Via não revelou efeitos significantes entre os grupos. Para o segundo experimento, a Análise da Variância de Duas Vias também não revelou efeitos significantes. Esses resultados sugerem que não ocorreu interação farmacocinética entre as drogas utilizadas e o etanol.

Tabela 2. Alcoolemia de animais tratados com diferentes drogas (i.p.) 30 min antes da administração de etanol (1,75 g/kg, i.p.), comparados ao controle. Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 3 animais por grupo. * $p < 0,05$, comparado ao seu respectivo controle (Análise da Variância de Uma Via).

TRATAMENTO	ALCOOLEMIA (mg/dl)
S	191,68 \pm 14,22
D6	181,66 \pm 16,38
D10	210,06 \pm 2,55
B3	166,38 \pm 12,32
B5	192,98 \pm 15,67
B7	212,06 \pm 7,67
C36/3	196,83 \pm 12,91
C36/10	200,70 \pm 19,32
C36/30	188,52 \pm 18,56
C56/0,1	176,91 \pm 13,43
C56/0,3	188,35 \pm 16,61
C56/1	161,46 \pm 1,60
C56/3	175,16 \pm 9,38

Tabela 3. Alcoolemia de animais tratados com CGP36742 (C36) ou CGP56433 (C56), seguidos de (-)baclofeno (B), comparados aos respectivos controles. Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 3 animais por grupo. * $p < 0,05$, comparado ao seu respectivo controle (Análise da Variância de Duas Vias).

TRATAMENTO PRÉVIO	ALCOOLEMIA (mg/dl)
SS	186,39 \pm 5,58
SB	185,17 \pm 5,10
C36/3+S	203,56 \pm 6,03
C36/3+B	184,20 \pm 5,02
C3610+S	197,25 \pm 4,25
C3610+B	193,15 \pm 11,08
C56/0,3+S	199,08 \pm 7,62
C56/0,3+B	187,01 \pm 6,12
C56/1+S	185,43 \pm 7,19
C56/1+B	186,26 \pm 8,73
C56/3+S	171,46 \pm 7,97
C56/3+B	161,46 \pm 1,60

5. DISCUSSÃO

Tem sido postulado que o fenômeno da tolerância é um dos fatores determinantes no consumo de álcool, contribuindo para o desenvolvimento do alcoolismo (Morse e Flavin, 1992). O indivíduo tolerante aos efeitos do etanol requer uma maior ingestão da droga para atingir os níveis desejados. Por outro lado, a tolerância aos seus efeitos aversivos facilita o uso em grandes quantidades, contribuindo para os riscos de lesão hepática, cardíaca, pancreática e de outros órgãos (Kaiant, 1996).

O conceito de tolerância vem evoluindo desde as últimas duas décadas. De acordo com o conceito clássico, tolerância era uma resposta celular homeostática inata, análoga a respostas fisiológicas para mudanças na temperatura corporal ou na pressão arterial (Kaiant, 1971).

Os primeiros estudos que demonstraram a importância da aprendizagem no desenvolvimento da tolerância ao etanol foram realizados por Chen et al. (1968). Chamada inicialmente de tolerância comportamental, este tipo de tolerância foi mais tarde considerado como tolerância aumentada pelo aprendizado (LeBlanc et al., 1975). Isso significa que a experiência prévia com etanol pode facilitar a re aquisição de tolerância, mesmo após um período de abstinência.

Os efeitos da experiência e aprendizagem sobre a tolerância ao etanol podem ser avaliados por alguns modelos animais. No modelo da *aprendizagem operante*, os animais são treinados para a busca de um alimento pressionando uma alavanca ou correndo no labirinto (Leblanc et al., 1973; Holloway et al., 1989). Em outro modelo, o da *aprendizagem associativa* (condicionamento clássico ou pavloviano), um estímulo sensorial acompanha a oferta de etanol ao animal. Esse estímulo evoca uma resposta homeostática compensatória, que é a base do fenômeno da tolerância, previamente à administração do etanol (Lê et al., 1979).

Grupos de animais recebendo injeções diárias de etanol antes de desempenhar uma tarefa desenvolveram tolerância mais rapidamente do que grupos tratados diariamente com as mesmas injeções de etanol recebidas, após o teste. Esse terceiro modelo animal demonstrou que a tolerância à incoordenação motora induzida pelo etanol é facilitada quando os animais praticam uma tarefa intoxicados (Bitrán e Kalant, 1991).

O mesmo mecanismo de aprendizado foi sugerido por Jones e Vega (1972) como fator importante no desenvolvimento da tolerância aguda. Os autores demonstraram que um melhor desempenho motor é obtido pelo animal que recebe uma única dose de etanol, exposto a uma mesma tarefa repetidas vezes, com concentrações similares de etanol no cérebro. Assim, a prática de uma tarefa sob a influência de etanol é um fator importante no desenvolvimento da tolerância aguda e crônica.

Devido a esses novos conceitos, estudos sobre a tolerância vem recebendo um novo enfoque. Os estudos mais recentes não se limitam a induzir a tolerância nos animais e a observar as mudanças no funcionamento cerebral. As novas estratégias incluem uma intervenção química e/ou cirúrgica específica inicial, visando a alterar a capacidade de aprendizagem e memória do indivíduo, sendo então avaliada sua habilidade em desenvolver tolerância, comparado a um grupo controle (Kaiant, 1998).

Neste trabalho, foi empregado o teste do rota-rod. Como já descrito, o rota-rod foi utilizado inicialmente por Jones e Roberts (1968), tendo sofrido modificações quanto ao método de aplicação dos testes (Hoffmann e Tabakoff, 1984; Szabó et al., 1994), sendo bastante útil na avaliação da incoordenação motora gerada por neurotoxicidade central e/ou periférica (Bogo et al., 1981; Barreto et al., 1998), como ocorre com etanol.

No primeiro experimento, foi observado o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, no Dia 2, nos grupos de animais que receberam, no dia anterior (Dia 1), dose total de 3,0 g/kg. Essa dose foi fracionada em 1,50 g/kg ou 1,75 g/kg, antes do teste, com um reforço 2 horas após, de 1,50 g/kg ou 1,25 g/kg, respectivamente. A escolha do método de fracionamento das doses foi baseada em estudos com ratos Wistar, realizados por Khanna et al. (1991a). A dose de 1,75 g/kg, com reforço de 1,25g/kg, demonstrou mais nitidamente o fenômeno da tolerância rápida, sendo selecionada para a seqüência dos experimentos. Esses resultados, que servem

para padronizar os experimentos posteriores deste estudo, confirmam resultados obtidos previamente em nosso laboratório (Barreto et al., 1998).

Os dados obtidos reforçam a importância da prática de uma tarefa sob intoxicação alcoólica, para o desenvolvimento da tolerância. Tanto os animais que receberam a dose de 1,0 g/kg antes do teste, quanto os que receberam a dose de 2,0 g/kg no Dia 1, não desenvolveram tolerância rápida ao etanol no Dia 2. Os primeiros recuperaram-se rapidamente, após apenas uma prática com prejuízo motor nos 5 min iniciais. Os últimos não conseguiram recuperação parcial para realizar nenhuma das três práticas (aos 5, 10 e 15 min), devido ao estado de intoxicação alcoólica, caindo do eixo giratório apenas 2 a 3 segundos após serem colocados no rota-rod. Em outras palavras, os dois grupos de animais não realizaram práticas repetidas sob intoxicação alcoólica. É importante lembrar que todos os animais receberam uma dose total, no Dia 1, de 3,0 g/kg.

Já no segundo experimento, observamos que a redução da dose adicional de etanol em grupos de animais que receberam tratamento com 1,75 g/kg antes do teste, totalizando doses inferiores a 3,0 g/kg, impediu o desenvolvimento da tolerância rápida. Tais resultados sugerem que uma dose de 3,0 g/kg, com dose adicional mínima de 1,25 g/kg, é necessária para o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol. Esses resultados confirmam experimentos prévios em nosso laboratório, realizados com camundongos suíços fêmeas, no mesmo modelo (Barreto et al., 1998), sugerindo que o fator sexo não influencia no desenvolvimento da tolerância rápida.

Estando caracterizado o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol em camundongos suíços machos, no modelo do rota-rod, o estudo prosseguiu com a análise da influência da D-cicloserina no desenvolvimento da tolerância rápida.

Vem sendo bastante estudado o efeito inibitório do etanol sobre o sistema de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA (Tabakoff et al., 1991; Weight et al., 1991), e o envolvimento desse receptor nos fenômenos de tolerância ao etanol.

As atenções sobre este receptor ionotrópico estão relacionadas ao seu papel em fenômenos adaptativos e neurotóxicos do SNC, tais como LTP e crises convulsivas. Essa atuação ocorre basicamente através influxo de cálcio pelo canal iônico ligado ao receptor, cuja ativação é dependente de voltagem e mediada pelo íon Mg^{++} (Coilingridge e Lester, 1989). Além desses mecanismos, já foi citado anteriormente neste estudo que o complexo receptor NMDA é modulado por vários sítios regulatórios, destacando-se o da glicina (Tsai et al., 1995; Morato e Khanna, 1996), denominado co-agonista do receptor (Kleckner e Dingledine, 1988; Kemp e Lesson, 1993).

Assim, o etanol atua como um antagonista no receptor NMDA (Carboni et al., 1993). O etanol inibe o influxo de Ca^{++} estimulado pelo NMDA, e, conseqüentemente, a produção de GMPC, exercendo essas funções no sítio alostérico da glicina ((Woodward, 1994; Hoffman et al., 1989).

Diversos trabalhos têm demonstrado o papel do receptor NMDA no desenvolvimento da tolerância ao etanol, utilizando paradigmas nos quais a tolerância é influenciada pelo aprendizado e pela memória. Estudos têm demonstrado que antagonistas do receptor NMDA, como a dizolcipina [(+)-MK-801] e a ketamina, são capazes de inibir o desenvolvimento da tolerância rápida à hipotermia e à incoordenação motora induzida pelo etanol, em ratos e camundongos (Khanna et al., 1991; Khanna et al., 1992b; Khanna et al., 1993b; Szabó et al., 1994; Barreto et al., 1998). Essa influência também tem sido estudada com relação à tolerância crônica, que é observada após a administração de etanol por um período prolongado (Khanna et al., 1992a; Wu et al., 1993).

Por outro lado, tem sido demonstrado que a D-cicloserina, um agonista parcial do sítio da glicina do complexo NMDA, reverte as ações do etanol tanto em testes *in vitro* (Rabe e Tabakoff, 1990), quanto *in vivo*, em ratos submetidos a testes comportamentais no labirinto em cruz elevado (Ferreira e Morato, 1996; 1997). A D-cicloserina também facilita a aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol em ratos, no teste do *tilt-plane* (Khanna et al., 1993b 1995).

Embora o bloqueio da tolerância rápida por antagonistas NMDA tenha sido recentemente analisada em camundongos, utilizando-se o modelo do rota-rod (Barreto et al., 1998), a influência facilitatória sobre a tolerância, por agonistas como a D-cicloserina, não tinha ainda sido estudada nesse modelo animal.

Os dados obtidos no presente estudo revelaram que a D-cicloserina, na dose de 10 mg/kg, facilitou a aquisição da tolerância rápida na dose de 2,75 g/kg de etanol, dose esta insuficiente para desenvolver tolerância *per se*. Esse resultado demonstra ser o teste do rota-rod um modelo confiável para a análise de drogas capazes de exercer influência facilitatória sobre o desenvolvimento da tolerância rápida.

O sistema GABAérgico, especialmente através do receptor GABA_A, também vem sendo alvo de pesquisadores, no que diz respeito ao estudo das ações farmacológicas do etanol. Os estudos iniciais foram motivados pela semelhança de ações entre o etanol e os benzodiazepínicos, com trabalhos demonstrando que o etanol poderia ter suas ações aumentadas ou reduzidas por agonistas ou antagonistas GABA_A, respectivamente (Cott et al., 1976, Liljequist e Engel, 1982). Em estudos bioquímicos, o etanol aumentou o influxo das correntes de Cl⁻ em preparações cerebrais de cérebro de rato e camundongo (Allan e Harris, 1987; Mehta e Ticku, 1988). Outros trabalhos demonstraram que a administração crônica de etanol exerce suas ações em determinadas subunidades do receptor GABA_A (Mehta e Ticku, 1992) que, por sua vez, têm variações genéticas distintas, dependendo da espécie animal e do tipo de célula dentro de uma mesma espécie, modulando a ativação das correntes de Cl⁻ ativadas pelo receptor GABA_A (Reynolds et al., 1992).

Se a modulação do receptor GABA_A pelo etanol é bem conhecida, o mesmo não ocorre com o receptor GABA_B, que apenas mais recentemente tem sido pesquisado. Em experimentos *in vivo*, Allan e Harris (1989) observaram

redução da incoordenação motora, hipotermia e atividade motora induzidas pelo etanol, após o tratamento prévio com o faclofeno, antagonista GABA_B. Um ano mais tarde, foi demonstrado que o faclofeno é capaz de reverter o efeito anticonvulsivante do etanol (Mehta e Ticku, 1990). Ainda em um outro estudo, Mead e Little (1995) observaram que o (-)baclofeno, agonista GABA_B, provocou um aumento, e o antagonista GABA_B CGP35348 uma redução, ambos significativos, dos sintomas motores de privação em camundongos que receberam tratamento crônico com etanol. Já estudos com ligantes radioativos revelaram um aumento na densidade de receptores GABA_B, em camundongos recebendo tratamento crônico com etanol (Mizutani et al., 1993; Kuriyama et al., 1994).

Neste estudo, observamos que o tratamento prévio com baclofeno, nas doses de 5 e 7 mg/kg, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos da incoordenação motora induzidos pelo etanol, no Dia 2, em camundongos tratados com 3,0 mg/kg de etanol, no Dia 1. O efeito mais evidente foi observado após o tratamento prévio, no Dia 1, com (-)baclofeno 5 mg/kg. O baclofeno, na dose de 7 mg/kg, induziu relaxamento muscular significativo no grupo tratado com salina. Esse relaxamento muscular, não observado na dose de 5 mg/kg, prejudicou a prática dos animais, que demoraram a recuperar-se, mesmo ao serem submetidos ao teste do rota-rod, 15 min após a administração de etanol. Esse resultado pode influenciar nas condições do animal para a prática sob intoxicação alcoólica, fenômeno importante no desenvolvimento da tolerância rápida, como discutido anteriormente. O (-)baclofeno, na dose de 10 mg/kg, também foi administrado por via i.p., mas os animais apresentaram relaxamento

muscular excessivo, que os impediu de realizar a prática no aparelho do rota-rod, tendo estes efeitos persistido por cerca de 2 horas após o término do experimento (resultados não mostrados).

Já o tratamento prévio com os antagonistas GABA_B CGP36742 e CGP56433, nas doses de 3 e 10 mg/kg, e 0,3, 1,0 e 3,0 mg/kg, respectivamente, foi capaz de facilitar a indução de tolerância rápida aos efeitos do etanol, no Dia 2, quando este foi administrado na dose de 2,75 mg/kg, insuficiente para a indução de tolerância rápida *per se*. O CGP36742, na dose de 30 mg/kg, bloqueou parcialmente os efeitos do etanol no Dia 1, não induzindo tolerância rápida no Dia 2. Já os animais dos grupos experimentais que receberam tratamento prévio, no Dia 1, com CGP56433, na dose de 10 mg/kg, apresentaram aumento excessivo da atividade locomotora, que os impediu de realizar os testes no aparelho de rota-rod (resultados não mostrados).

Finalmente, quando os animais foram tratados previamente com CGP36742 ou CGP56433, seguido de (-)baclofeno (5 mg/kg) e administração posterior de etanol, respostas distintas foram observadas, sendo o CGP56433 mais eficaz em desenvolver tolerância rápida, em presença de (-)baclofeno. O CGP36742 foi capaz de facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol apenas na dose de 10 mg/kg, pois o (-)baclofeno (5 mg/kg) impediu total ou parcialmente o desenvolvimento da tolerância rápida, respectivamente nas doses de 3 e 10 mg/kg. Quanto ao CGP56433, o (-) baclofeno impediu a aquisição de tolerância rápida apenas quando este foi administrado na dose de 0,3 mg/kg, não interferindo nos demais resultados.

Esses dados sugerem um mecanismo de ação central destas drogas, com antagonismo competitivo pelo receptor GABA_B.

Os resultados obtidos neste estudo podem ser justificados por pelo menos quatro mecanismos de ação farmacológica. São eles: 1) interação farmacocinética entre as drogas testadas e o etanol, alterando a concentração plasmática de etanol; 2) uma possível ação direta das drogas testadas, facilitando ou bloqueando a ação do etanol, e, conseqüentemente, influenciando no desenvolvimento da tolerância rápida; 3) mecanismos de interação entre diferentes sistemas de neurotransmissores e 4) interferência na capacidade de retenção de aprendizado e memória, com envolvimento nos mecanismos de plasticidade sináptica.

A possível interação farmacocinética entre o etanol e cada uma das drogas empregadas, como a D-cicloserina, o (-)baclofeno o CGP36742; o CGP56433; além da associação CGP36742 ou CGP56433 com (-)baclofeno, foi excluída através da dosagem alcoólica no plasma de animais tratados previamente com essas substâncias, 5 min após a administração de etanol. Os resultados não revelaram diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos de animais, controle e experimental. Embora as dosagens alcoólicas tenham sido feitas por punção intracardíaca, ou seja, realizadas com amostras plasmáticas periféricas, e não diretamente no cérebro, estudos revelam que os níveis de etanol no plasma e no cérebro, colhidos no mesmo intervalo de tempo após a administração i.p., são bastante similares (Leblanc et al., 1975), e consistentes com a já estudada distribuição de etanol no plasma e sua rápida difusão pelas

membranas celulares dos capilares no cérebro (Gostomzyk et al., 1969; Tabakoff et al., 1986). Assim, os resultados obtidos não foram consequentes a qualquer alteração dos níveis plasmáticos de etanol causados pelas drogas.

Um segundo mecanismo de ação que poderia estar envolvido é o de uma ação direta, pelas drogas utilizadas neste estudo, no mecanismo de ação do etanol. Nos experimentos em que foi utilizada a D-cicloserina, essa droga poderia interferir na ação direta do etanol no complexo receptor NMDA, aumentando a intoxicação aguda e o estímulo para o desenvolvimento de tolerância. No entanto, como já foi citado, diversos trabalhos sugerem que o etanol possa atuar diretamente no sítio de glicina, mas inibindo a função do receptor NMDA, por mecanismos competitivos (Rabe e Tabakoff, 1990; Weight et al., 1993). Alguns trabalhos, no entanto, contestam estas evidências. Em estudos com ligantes radioativos, em tecido cerebral de camundongos, Snell (1993) não encontrou relação entre os efeitos do etanol no complexo NMDA e sua ação direta nos sítios de ligação de glicina. Além do mais, dois trabalhos realizados por um mesmo grupo demonstraram que a glicina é capaz de reverter a capacidade do etanol em inibir a liberação de dopamina estimulada pelo complexo NMDA, mas não de norepinefrina, estimulada pelo mesmo complexo (Gonzalez e Woodward, 1990). Finalmente, outro estudo apontam para uma relação entre esses resultados controversos e uma distinta distribuição regional cerebral de subunidades do receptor NMDA (Buller et al., 1993). Assim, os efeitos dependeriam da quantidade de receptores em uma determinada área, e da concentração da droga administrada.

Nossos resultados, no entanto, não sugerem o envolvimento de qualquer modificação da ação direta pela D-cicloserina, nas doses empregadas. Ao serem comparados, tanto os grupos tratados previamente com D-cicloserina, quanto os que receberam salina, não apresentaram diferenças significativas quando observados os efeitos do tratamento com etanol, no Dia 1.

Com relação às drogas utilizadas e que atuam no receptor GABA_B, os dados não sugerem que tenham induzido qualquer modificação direta na ação do etanol no SNC. No caso do (-)baclofeno, ao serem comparados, tanto os grupos tratados previamente com (-)baclofeno quanto os que receberam salina não apresentaram diferenças significativas, quando observados os efeitos do tratamento com etanol no Dia 1. No entanto, já foi relatado que os efeitos miorelaxantes do (-)baclofeno, nas doses de 7 e 10 mg/kg, interferiram na prática dos grupos controle no Dia 1, prejudicando ou impossibilitando, respectivamente, a prática no aparelho do rota-rod.

Quanto ao CGP36742, após a sua utilização nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos experimentais e os grupos controle, com relação ao tratamento, no Dia 1. Já quando o CGP36742 foi utilizado na dose de 30mg/kg, observou-se um bloqueio parcial das ações do etanol, não tendo os animais desenvolvido tolerância rápida no Dia 2. Já o uso do CGP56433, nas doses testadas, não revelou alterações significantes entre os grupos controle e experimental no Dia 1, exceto na dose de 10 mg/kg, que aumentou a atividade locomotora dos animais no grupo tratado com etanol, impossibilitando a realização da prática experimental.

Esses efeitos observados após doses mais elevadas de antagonistas GABA_B, não permitem descartar a hipótese de que o etanol esteja tendo suas ações afetadas pelo bloqueio, dependente da dose, do receptor GABA_B. No entanto, tais efeitos não foram evidenciados com as doses que facilitaram o desenvolvimento da tolerância rápida, neste trabalho. É curioso observar que, ao mesmo tempo em que a ação aguda do etanol é reduzida pelo CGP36742, na dose de 30 mg/kg no Dia 1, a atividade locomotora, um sinal de intoxicação alcoólica, está exarcebada pelo uso do outro antagonista GABA_B, o CGP56433, na dose de 10 mg/kg. O fato de terem as duas substâncias estruturas moleculares distintas, e de serem ainda pouco conhecidas, especialmente o CGP56433, deixa em aberto a possibilidade de estarem causando esse efeito não por uma eventual ação direta do etanol no receptor GABA_B, mas sim por outros mecanismos como por exemplo, uma ação direta e/ou indireta em outros sistemas de neurotransmissores.

Interações entre sistemas de neurotransmissores e sua relação com o desenvolvimento da tolerância ao etanol tem sido sugeridas na literatura. Há evidências de que a tolerância possa ser influenciada por diversos sistemas, como GABA, 5HT, NMDA, AVP e ACh (Kalant, 1996; Wu et al., 1994, 1996). Como já foi relatado, o sistema GABAérgico é composto principalmente por interneurônios inibitórios. A interação entre o sistema GABA_B e o complexo NMDA foi recentemente descrita através de um trabalho com ligantes radioativos. No trabalho citado, o agonista GABA_B (-)baclofeno reduziu, e alguns antagonistas GABA_B, entre eles o CGP36742, aumentaram, a liberação de GABA e também de

glutamato endógeno (Teoh et al., 1996). Os receptores GABA_B têm sido ainda envolvidos na modulação de secreção de neuropeptídeos como a vasopressina e a ocitocina (Kombian et al., 1996). No que concerne relação especificamente aos efeitos do etanol, além dos receptores GABAérgicos, a relação entre os receptores de serotonina, vasopressina e NMDA no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol vem recebendo atenção especial (Kalant, 1996).

Como pode ser observado, mecanismos complexos de interação entre sistemas de neurotransmissores parecem estar relacionados com o desenvolvimento da tolerância ao etanol. Em nossos estudos, no entanto, não parece haver uma influência das drogas testadas e o desenvolvimento da tolerância rápida, no tocante a uma ação direta do etanol nos vários sistemas em que ele atua, de forma similar ao que foi discutido no tópico anterior. Vale repetir que os grupos tratados previamente com D-cicloserina, (-)baclofeno, CGP36742 e CGP56433, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto à incoordenação motora, quando observados os efeitos do tratamento com etanol no Dia 1, comparados aos respectivos controles. As exceções foram feitas aos resultados obtidos com o CGP36742, na dose de 30 mg/kg, e com o CGP56433, na dose de 10 mg/kg, incapazes de facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Tendo discutido esta terceira possibilidade de ação, resta a análise dos efeitos das drogas empregadas em estudos de aprendizagem e memória, que poderiam estar associados ao desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Como já mencionado, a tolerância pode ser facilitada pela prática de uma tarefa (Leblanc et al., 1973; Bitrán e Kalant, 1991). Por outro lado, muitos estudos têm demonstrado que drogas que prejudicam o aprendizado e a memória

reduzem a magnitude da tolerância ao etanol, benzodiazepínicos, barbitúricos e opióides (para revisão ver Morato et al, 1998).

Têm sido bastante estudados os fenômenos ligados à LTP, uma forma de plasticidade sináptica exibida por muitas vias glutamatérgicas do SNC de vertebrados, especialmente através do receptor NMDA (Collingridge e Singer, 1990; Collingridge et al., 1992). Já foi descrito na literatura que o etanol reduz a LTP no hipocampo (Tremwel e Hunter, 1990), através de uma ação direta no receptor NMDA (Morriset e Schwartzwelder, 1993).

Por outro lado, interneurônios inibitórios GABAérgicos realizam um papel modulatório na indução de LTP, uma vez que a hiperpolarização causada pela liberação de GABA intensifica o bloqueio do receptor NMDA, por sítios regulatórios de íons Mg^{++} presentes no canal do complexo NMDA, reduzindo a liberação de glutamato (Collingridge et al., 1992; Recasens, 1995). Estudos recentes demonstram que a administração crônica de etanol reduz a magnitude da LTP hipocampal em ratos, através de mudanças nos sistemas de neurotransmissores GABAérgico e colinérgico, sem reduzir o número de receptores glutamatérgicos (Peris et al, 1997a, 1997b). Assim, a atividade GABAérgica tem um papel fundamental na indução de LTP. Uma maior liberação de GABA leva a uma inibição do complexo NMDA, e uma redução na sua liberação leva a um aumento na sua atividade, com facilitação da retenção de aprendizado e memória.

Embora a ação de GABA dependa de estímulo de receptores pós-sinápticos $GABA_B$, a inibição de sua liberação está ligada à estimulação dos auto-

receptores pré-sinápticos, feita pelo próprio GABA liberado na fenda sináptica. No entanto, esse efeito modulatório do auto-receptor $GABA_B$ ocorre mais tardiamente (Recasens, 1995), com predomínio inicial da liberação do neurotransmissor inibitório GABA. Assim, o bloqueio do receptor $GABA_B$, por ação de antagonistas desse receptor, mesmo ocorrendo nos níveis pré e pós-sinápticos, leva a um predomínio da ação pós-sináptica. Ocorre inibição de GABA e da estimulação da liberação de glutamato; o inverso se dá após a administração de um agonista $GABA_B$ (Teoh et al., 1996). Essa interligação entre o sistema GABAérgico e o sistema glutamatérgico está ilustrada na figura 14.

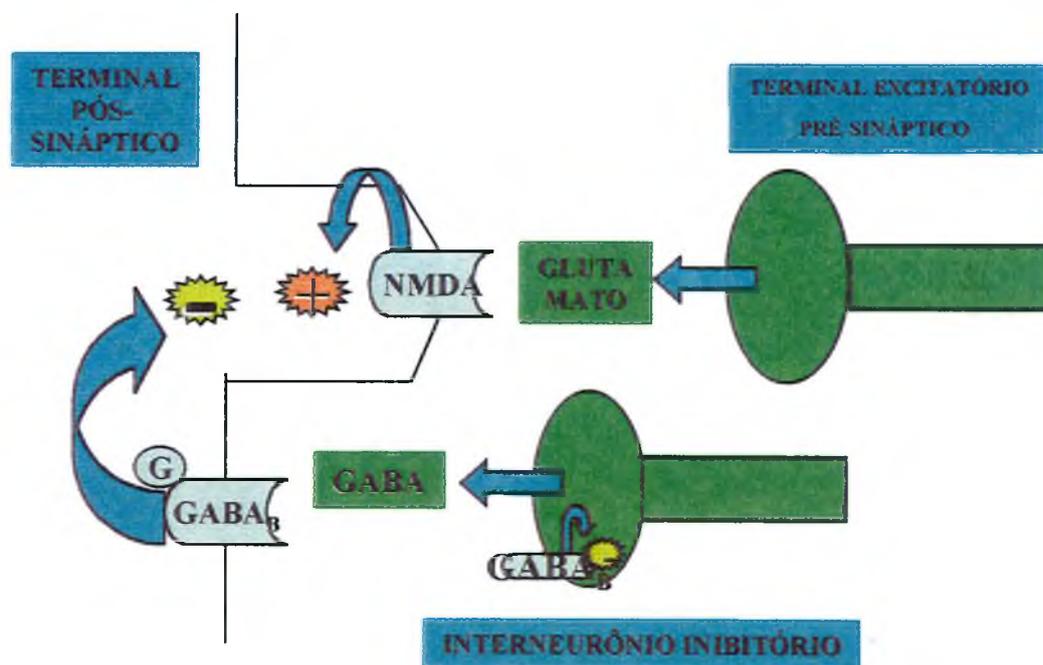


Figura 14. Interação entre o sistema GABAérgico e o sistema glutamatérgico. O diagrama mostra uma sinapse na área CA_1 do hipocampo. O glutamato é liberado do terminal pré-sináptico, atuando no receptor NMDA, após estimulação da via comissural colateral de Schaeffer. A estimulação dessa via também ativa o interneurônio inibitório GABA. A liberação de GABA age no receptor pós-sináptico $GABA_B$, inibindo a estimulação excitação neuronal provocada pela ativação do receptor NMDA. Auto-receptores $GABA_B$ são também ativados, reduzindo a liberação subsequente de GABA e a regulação inibitória no neurônio pós-sináptico (adaptado de Collingridge et al., 1992).

Esses mecanismos modulatórios acionados pelos receptores GABA_B vêm despertando interesse clínico. Estudos em animais tem demonstrado que o CGP36742 atua aumentando a capacidade de retenção de memória em diferentes modelos e espécies (Mondadori et al., 1993, 1996; Bittiger et al., Carletti et al., 1993), o mesmo sendo observado em estudos com antagonistas GABA_B mais potentes, como o CGP71982 e o CGP55845 (Getova e Bowery, 1998). O CGP36742, que é ativo por via oral, também já foi testado em voluntários humanos, com boa tolerabilidade e resultados promissores, (Gleiter et al., 1996). Existe uma expectativa de que drogas que bloqueiam o receptor GABA_B, como as que foram testadas em nosso laboratório, podem contribuir para a melhora de distúrbios de memória e mesmo de quadros neurológicos demenciais como a Doença de Alzheimer (Gleiter et al., 1996). Quanto ao CGP56433, não existem relatos na literatura concernentes ao seu uso experimental ou clínico.

Os resultados do presente estudo sugerem existir uma estreita ligação entre os receptores NMDA, onde atua a D-cicloserina, e o sistema GABA, onde atuam o (-)baclofeno, o CGP36742 e o CGP56433. Essas drogas parecem influenciar o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, em camundongos, através de mecanismos de aprendizagem e memória. Esses efeitos decorrem, possivelmente, de uma modulação do complexo NMDA e, conseqüentemente, da LTP. Nossos resultados reforçam observações anteriores de que a tolerância sofre influência do aprendizado, agora também sob a ótica da participação dos receptores GABA_B.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. Foi confirmado o desenvolvimento da tolerância rápida após a utilização de duas doses de etanol no primeiro dia. A dose total mínima para este desenvolvimento foi de 3,0 g/kg (1,5+1,5 ou 1,75+1,25 g/kg). A relação entre a prática sob intoxicação alcoólica e o desenvolvimento da tolerância rápida sugere que mecanismos de aprendizagem e memória estão envolvidos nesse processo.
- 6.2. A D-cicloserina (10 mg/kg), agonista do sítio da glicina do receptor NMDA, facilitou a aquisição da tolerância rápida ao etanol. Este dado confirma resultados obtidos em outros modelos animais, sugerindo que o modelo do rota-rod é confiável para a observação da influência de drogas sobre a facilitação do desenvolvimento da tolerância rápida, em camundongos.
- 6.3. Verificou-se que o baclofeno (5 e 7 mg/kg) impediu o desenvolvimento da tolerância rápida. No entanto, os resultados com a dose mais elevada foram prejudicados pelo efeito miorrelaxante induzido por esse agonista GABA_B.
- 6.4. Foi observada a facilitação no desenvolvimento da tolerância rápida pelo CGP36742 (3 e 10 mg/kg), de forma dependente da dose. Esta influência do receptor GABA_B foi confirmada pelos mesmos efeitos obtidos após a

administração do CGP56433 (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg), outro antagonista GABA_B.

- 6.5. Foram observadas diferenças nas respostas dos dois antagonistas GABA_B testados, quando seguidos de baclofeno (5 mg/kg). O baclofeno impediu total ou parcialmente a facilitação da tolerância rápida pelo CGP36472 (3 e 10 mg/kg, respectivamente). O CGP56433 (1,0 e 3,0 mg/kg) não sofreu influência do baclofeno (5 mg/kg), o qual impediu a facilitação da tolerância apenas na dose de 0,3 mg/kg de CGP56433. Estes resultados sugerem que o CGP56433 foi mais eficaz que o CGP36742 em facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida.
- 6.6. A interferência, dependente da dose, do baclofeno sobre o CGP36742 e o CGP56433, sugere um mecanismo competitivo destas drogas pelo receptor GABA_B, reforçando a hipótese de uma ação central destas substâncias.
- 6.7. As dosagens de alcoolemia revelaram que não houve interação farmacocinética entre as soluções utilizadas e o etanol, nas doses administradas.
- 6.8. Os resultados do presente estudo sugerem a atuação do receptor GABA_B no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, ligada a mecanismos de aprendizagem e memória. Essa influência decorre, possivelmente, da

modulação do receptor glutamatérgico NMDA, pelas drogas que atuam no receptor GABA_B.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRIGHT, A. L.; BARRON, W. B.; FASICK, M. P.; POLINKO, P.; JANOSKY, J. Continuous intrathecal baclofen infusion for spasticity of cerebral origin. *JAMA*, 270:2475-2477, 1993.

ALLAN, A. M.; MAYES, C. G.; DRASSKI, L. J. Gamma-aminobutyric acid-activated chloride channels in rats selectively bred for differential acute sensitivity to Alcohol. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 15(2):212-218, 1991.

ALLAN, A. M.; MAYES, C. G.; DRASSKI, L. J. Gamma-aminobutyric acid and alcohol actions; neurochemical studies of long sleep and short sleep mice. *Life Sci.*, 39:2005-2015, 1986.

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.

ALLAN, A. M. e HARRIS, R. A. A new alcohol antagonist: phaclofen. *Life Sci.*, 45: 771-1779, 1989.

BABBEDGE, R. C.; BLANDWARD, 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.

BARRETO, P. S.; LEMOS, T.; MORATO, G. S. NMDA receptor antagonists block the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Add. Biol.*, 3: 55-64, 1998.

BERTON, F.; FRANCESCONI, W. G.; MADAMBA, S. G.; ZIELGLGANSBERGER, W.; SIGGINS, G. R. Acamprosate enhances N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission but inhibits

- presynaptic GABA_B receptors in nucleus accumbens neurons. *Alc. Clin. Exp. Res.*, 22(1): 183-191, feb, 1998.
- BITTIGER, H.; BERNASCONI, R.; FRÖSTL, W. et al. GABA_B antagonists: potential new drugs. *Pharmacol. Commun.*, 2:70-74, 1992.
- BITRÁN, M. e KALANT, H. Learning factor in rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 39: 917-922, 1991.
- BLISS, T. V. P. e COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361:31-39, 1993.
- BOGO, V.; HILL, T. A.; YONG, R. W. Comparison of the accelarod 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.
- BONANNO, G. e RAITERI, M. Aminobutyric acid (GABA) autoreceptors in rat cerebral cortex and spinal cord represent pharmacologically distinct subtypes of GABA_B receptor. *J. Pharmacol.*, 172:41-49, 1989.
- BONANNO, G.; FONTANA, G.; RAITERI, M. GABA_A autoreceptors regulating release in rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.*, 154:223-224, 1988.
- BORG, S. KAVANDE H.; LIEBERG, P.; MOSSER, D.; VALVERIUS, P. 5 hydroxindoleacetic acid in cerebrospinal fluid in alcoholic patients under different clinical conditions. *Alcoholism Res.*, Oxford: Pergamon Press, 1993.
- BOWERY, N. G.; HUDSON, A. L.; PRICE, G. W. GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neurosci.*, 20:365-83, 1987.

- BOWERY, N. G. e HUDSON, A. L. γ Aminobutyric acid reduces the evoked release of ^3H -noradrenaline from sympathetic nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.*, 66:108, 1979.
- BOWERY, N. G.; DOBLE, A.; HILL, D. R.; HUDSON, A. L.; SHAW, J. S.; SHAW, J. S.; TURNBUL, M. J.; WARRINGTON, R. Bicuculline insensitive GABA receptors on peripheral autonomic nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.*, 71:53-70, 1981.
- BOWERY, N. G. e KNIGHT, A. R. The pharmacology of adenylyl cyclase modulation by GABA_B receptors in rat brain slices. *Neuropharmacol.*, 35(6):703-712, jun, 1996.
- BRESLIN, F. C.; SOBELL, S. L.; SOBELL, L. C. Alcohol treatment outcome methodology: state of the art 1989-1993. *Add. Behav.*, 22(2):145-155, 1997.
- BROWN, Z. W. e AMIT, Z. The effects os selective catecholamines depletion by 6 hydroxydopamine on ethanol consumption in rats. *Neurosci. Lett.*, 5: 333-336, 1997.
- BULLER, A. L.; MORRISSET, R. A.; SEEBURGH, P. H.; MONAGHAN, D. T. Interaction of ethanol (EtOH) with recombinant heteromeric NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 17:475, 1993.
- BURITOVA, J.; CHAPMAN, V.; HONORE, P.; BESSON, J. M. The contribution of GABA_B receptor-mediated events to inflammatory pain processing: carrageenan oedema and associated spinal c-Fos expression in rat. *Neurosci.* 73(2):487-496, jul, 1996.
- CALAPAI, G.; MAZZAGLIA, G.; SAUTEBIN, L.; CONSTANTINO, G.; MARCIANO, M.; CUZZOCREA, S.; ROSA, M.; CAPUTI, P. Inhibition of nitric oxide formation reduces voluntary ethanol consumption in the rat. *Psychopharmacol.*, 125:198-491, 1996.

- CAMPBELL, V.; BERROW, N.; DOLPHIN, A. C. GABA_B receptor modulation of CA²⁺ currents in rat sensory neurones by the G_o antisense oligonucleotide studies. *J. Physiol.*, 470:1-11, 1993.
- CARBONI, A.; FRAU, R.; Di CHIARA, G. Differential inhibitory effects of a 5-HT₃ antagonist on drug-induced stimulation of dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.*, 164: 515-519, 1989.
- CIRAULLO, A. M.; ALPERT, N.; FRANKO, K. J. Naltrexone for the treatment of alcoholism. *Am. Fam. Phys.*, 56(3): 803-806, 1997.
- CHU, D. C. M., ALBIN, R. L., YOUNG, A. B., PENNEY, J. B. Distribution of kinetics of GABA_B binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neurosci.*, 34:34-57, 1990.
- CHIN, J. H. e GOLDSTEIN, D. B. Effects of low concentrations of ethanol on the fluidity of spinlabelled erythrocyte and brain membranes. *Mol. Pharmacol.*, 13, pp. 435-441, 1977.
- COLLINGRIDGE, G. L.; HARVEY, J.; FRENGUELLI, B. G.; BORTOLOTTI, Z. I. B.; DAVIES, C. H. Amino acid receptors and long term potentiation: targets for the development of cognitive enhancers. *Int. Acad. Biomed. Res.*, 2:41-49, 1992.
- COLLINGRIDGE, G. L. e LESTER, R. A. J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 40:143-210, 1989.
- COLLINGRIDGE, G. L. e SINGER, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *TIPS*, 11:290-296, jul, 1990.

- COTT, J. A.; CARLSON, J.; ENGEL, M. Suppression of ethanol induced locomotor stimulation by GABA-like drugs, *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.*, 295:203,1976.
- CRABBE, J. C.; RIGTER, H.; UIJLEN, J.; STRIBOS, C. Rapid development of tolerance to hipotermic effect of EtOH in mice. *J. Pharmacol Exp Ther.*, 208:128-133, 1979.
- DAVIES, C. H.; STARKEY, S. J.; POZZA, M. F.; COLLINDRIDGE, J. L. GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature*, 349:609-611, 1991.
- DeLOREY, T. M. e OLSEN, R. W. GABA and glicine. In: SIEGEL et. Col., **Basic Neurochem.** 4 th New York: Raven Press, p. 389-399, 1994.
- DIANA, M.; GESSA, G. L.; ROSSETTI, Z. L. Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of dopamine mesolimbic system. *Alcohol Alcoholism*, 27(4):329-333, 1992.
- DINGWALL, J. C.; EHRENFREUND, J.; HALL, R. G.; JACK, J. Synthesis of γ -aminopropylphosphonous acids using hypophosphorous acid synthons. *Phosp. Sulf.*, 30:571-574. 1987.
- DUNLAP, K. e FISHBACH, G. D. Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature*, 276: 837-39, 1978.
- EDWARDS, G: Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. *Br. Med. J.*, 1: 1058-1061, 1976.
- ERICKSON, C. K. e GRAHAM, D. T. Alterations in cortical and reticular acetylcholine release by ethanol in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185:585-593, 1973.

FERREIRA, V. M. M.; MORATO, G. S. Influence of age and of pre-treatment with D-cycloserine on the behavior of ethanol-treated rats tested in the elevated plus-maze apparatus. *Add. Biol.*, 1:395-404, 1996.

FERREIRA, V. M. M. e MORATO, G. S. D-Cycloserine blocks the effects of ethanol and HA-906 in rats tested in the elevated plus-maze. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 21:9:1638-1642, 1997.

FLOOD, J. F.; MOXLEY, J. E.; LAUTHORN, T.H. Effect on memory processing by D-cycloserine, an agonist of the NMDA/glycine receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 221:249-254, 1992.

FRANKS, N. P. e LIEB, W. R. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature*, 310: 599-601, 1984.

FRÖESTL, W.; MICKEL, S. J.; VON SPRECHER, G.; BITTIGER, H.; OLPE, H. P. Chemistry of new GABA_B antagonists. *Pharmacol. Commun.*, 2:52-56, 1992.

GALDUROZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; CARLINI, E. A. IV levantamento sobre o uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas – CEBRID., 1997.

GARDNER, J. Fetal alcohol syndrome – recognition and intervention. *MCN Am. J. Matern. Child Nurs.*, 22(6):318-322, nov, 1997.

GETOVA, D., BOWERY, N. B. The modulatory effects of high affinity GABA_B receptor antagonists in an active avoidance learning paradigm in rats. *Psychopharmacol.*, 137(4):369-73, 1998.

- GLEITER, C. H. e FARGER, G.; Dipl-Ing (FH); MÖBIUS, H. J. Pharmacokinetics of CGP36742, an orally active GABA_B antagonist, in humans. *Clin. Pharmacol.*, 36:428-438, 1996.
- GONZALES , R. A. e WOODWARD, J. J. Ethanol inhibits N-Methyl-D aspartate-stimulated [³H]norepinephrine release from rat cortical slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 253:1138-1144, 1990.
- GORDON, A. S. e DIAMOND, I. Adenosine mediates the effects of ethanol on the CAMP signal transduction system. In: TABERNER P. V., BADAWY A. A. B., eds. *Adv. Biom. Alc. Res.*, Oxford: Pergamon Press, 1993.
- GOUGS, A.; KHANNA, J. M.; LE, A. D.; KALANT, H. Tolerance to ethanol and cross-tolerance to pentobarbital and barbital. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24:801-807, 1986.
- GUASTELLA, J.; NELSON, N.; NELSON, H. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science*, 24:1303-1306, 1990.
- HILL, D. R. e BOWERY, N. G. 3H-Baclofen and 3H-GABA_A bind to bicuculline insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature*, 290:149-152, 1981.
- HOFFMAN, P. L.; RABE, C. S.; MOSES, F.; TABAKOFF, B. – N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux na cyclic GMP production. *J. Neurochem.*, 52:1937-1940, 1989.
- HOFFMAN, P. L. e TABAKOFF, B. Neurohypophyseal peptides maintain tolerance to the incoordinating effects of ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 21:539-543, 1984.
- HOFFMAN, P. L. e TABAKOFF, B. Ethanol's action on brain neurochemistry. In: TARTER, R. E., VAN THIEL, D. H. (eds) *Alcohol and the brain: chronic effects*. Plenum Press, New York, p 19-68, 1985.

- HOFFMAN, P. L.; ISHIZAWA, H.; GIRI, P. R.; DAVE, J. R.; GRANT, L.; GULYA, K.; TABAKOFF, B. The role of vasopressin in alcohol tolerance. *Ann. Med.*, 22:269-274, 1990.
- JELLINEK, E. M.: The disease concept of alcoholism. New Haven, CT, College & University Press, 1960.
- JONES, B. M. e VEGA, A. Cognitive performance measured on the ascending and descending limb of the blood alcohol curve. *Psychopharmacol.*, 23:99-114, 1972.
- JONES, B. J.; ROBERTS, D. J. The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J. Pharmacol. Rev.*, 20:302-304, 1968.
- KALANT, H. e KHANNA, J. M. Methods for study of tolerance. In: *Modern Methods in Pharmacology*, v.6, Wiley-Liss, 1990.
- KALANT, H.; LeBLANC, A. E.; GIBBINS, R. J. Tolerance to, and dependence on, some non-opiate psychotropic drugs. *Pharmacol. Rev.*, 23:135-191, 1971.
- KALANT, H. e KHANNA, J. M. Current state of knowledge about the mechanisms of alcohol tolerance. *Add. Biol.*, 1: 133-141. 1996.
- KALANT, H. Research from tolerance: what can we learn from history? *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 22(1):67-76, 1998.
- 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 C57Bl mice. *Psychopharmacol.*, 120:49-56, 1995.

- KATADA, T. e UI, M. Direct modification of membrane adenylate cyclase system by islet-activation protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 79:3129-3133, 1982.
- KAUPMANN, K.; HUGGEL, K.; HELD, J.; FLOR, P. J.; BISCHOFF, S. Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 239-246, mar, 1997.
- KEMP, J. A. e LESSON, P. D. The glycine site of the NMDA receptor – five years on. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 14:20-25, 1993.
- KERR, D. I. B. e ONG, J. GABAergic mechanisms in the gut and their role in the regulation of intestinal motility. In: *GABA_B Receptors in Mammalian Function*, p 153-174,
- KHANNA, J. M. Methods for the study of tolerance. In: *Modern Methods in Pharmacol.* v.6, Wiley-Liss, 1990.
- KHANNA, J. M.; SHAH, G.; WEINER, J.; H. PETER, H. WU., KALANT, H. Effect of NMDA receptor antagonists on rapid tolerance to ethanol. *Eur. J. Pharmacol.*, 230:23-31, 1993a.
- KHANNA, J. M.; KALANT, H.; SHAH, G.; CHAU, G. Effect of D-cycloserine on rapid tolerance to ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 45:983-986, 1993b.
- KHANNA, J. M.; KALANT, H.; WEINER, J.; CHAU, A.; SHAH, G. Ketamine retards chronic but not acute tolerance to ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 42, 347-350, 1992a.

- KHANNA, J. M.; MIHIC, S. J.; WEINER, J.; SHAH, G.; WU, P. H.; KALANT, H.;
Differential inhibition by NMDA antagonists of rapid tolerance to, and cross-
tolerance between, ethanol and chlordiazepoxide. *Brain Res. Bull.*, 574,251-
256, 1992b.
- KHANNA, J. M.; WU, P. H.; WEINER, J.; KALANT, H. NMDA antagonist inhibits
rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, 26:643-645, 1991.
- KHANNA, J. M.; MORATO, G. S.; CHAU, A; SHAH, G. D-cicloserine enhances
rapid tolerance to ethanol motor incoordination. *Pharmacol. Biochem.
Behav.*, 52:609-714, 1995.
- KIANMAA, K e TABAKOFF, B. – Neurochemical correlates of tolerance and
strain differences in the neurochemical effects of ethanol. *Pharmacol.
Biochem. Behav.*, 18:383-388, 1983.
- KLECKNER, N. W. e DINGLEDINE, R. Requirement for glycine in activation of
NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241:835-837.
- KORPI, E. L. Role of GABA_A receptors in actions of alcohol and in alcoholism:
recent advances. *Alc. Alcohol.*, 29:115-129,1994.
- KURIYAMA, K.; MIZUTANI, H.; HIROUCHI, M.; ICHIDA, T.; HASHIMOTO, T.
Alteration in cerebral GABA_B receptor functions during formation of alcohol
dependence. *Alc. Alc. Suppl.*, 2:193-197, 1994.
- LÊ, A. D.; POULOS, C. X.; CAPELL, H. D. Conditioned tolerance to the
hypothermic effect of ethanol. *Science*, 206:1109-1110, 1979.
- LeBLANC, A. E.; KALANT, H.; GIBBINS, R. J. Acute Tolerance to Ethanol in the
Rat. *Psychopharmacol.*, 41:43-46, 1975.

- LEMOS, T. Estudo do papel da ativação do receptor GABA_B em um modelo de epilepsia de ausência em ratos. (Tese de doutoramento). São Paulo: EPM/UNIFESP, 1996.
- LI Y. W. e GUYENET, P. G. Activation of GABA_B receptors increases a potassium conductance in rat bulbospinal neurons of the C1 area. *Am. J. Physiol.*, 271(5 Pt 2): R 1304-R 1310, nov, 1996.
- LILJEQUIST, S. e ENGEL, J. Effects of GABAergic agonists and antagonists on various ethanol-induced behavioral changes. *Psychopharm.*, 78:71-75, 1982.
- LITTLE, H. J.; DOLIN, S. J.; WHITTINGTON, M. A. Possible role of calcium channels in ethanol tolerance and dependence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 560:465-466, 1988.
- LITTLE H. J. The role of neuronal calcium channels in dependence of ethanol and other sedatives/hypnotics. *Pharmac. Ther.*, 50: 347-365, 1991.
- LITTLETON, J. M. Development of membrane tolerance to ethanol may limit intoxication and influence dependence liability. In: Sandler, M (ed.) *Psychopharmacology of alcohol*. New York: Raven Press, 1980.
- LOVINGER, D. M. Ethanol potentiation of 5HT₃ receptor-mediated ion current in NCB-20 neuroblastoma cells, *Neurosci. Lett.*, 122, pp. 57-60, 1991.
- LUKASIEWICZ, P. D. GABA_C receptors in the vertebrate retina. *Mol Neurobiol*, 12(3):188-194, jun, 1996.
- MARTZ, A, DIETRICH R. A, HARRIS R. A. Behavioral evidence for the involvement of γ -aminobutyric acid in the actions of ethanol. *Eur. J. Pharmacol.*, 89, 53-62, 1983.

- McDONALD, R. L.; TWYMAN, R. E. Biophysical properties and regulation of GABA_A receptor channels. *Semin. Neurosci.*, 3:219-230, 1991.
- McGEER, P. L. e McGEER, E. G. Amino acid neurotransmitters. In: Siegel et al., *Basic neurochemistry*, 4th ed. New York: Raven Press, p 311-332, 1989.
- MEAD, A. J. e LITTLE, H. J. GABA_B receptors have a role in causing behavioral hyperexcitability, both during ethanol withdrawal and in naive mice? *Psychopharmacol.*, 117:232-239, 1995.
- MEHTA, A. K. e TICKU, M. K. Are GABA_B Receptors involved in the pharmacological effects of ethanol? *Eur. J. Pharmacol.*, 182:473-480, 1990.
- MEHTA, A. K. e TICKU, M. K. Ethanol potentiation of GABAergic transmission in cultured spinal cord neurons involves γ -aminobutyric acid-gated chloride channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246: 558, 1988b.
- MELLANBY, E. Alcohol: Its absorption into, and disappearance from, the blood under different conditions. *Special Report Series*, 31. London, National Research Council, 1919.
- MINTZ, I. M. e BEAN, B. P. GABA_B receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron.*, 10: 889-898, 1993.
- MIZUTANI, H.; HASHIMOTO, T.; NAKAYASU, H.; KURIYAMA, K. Alterations in cerebral GABA_B receptor binding during the formation of alcohol dependence. *Pharmacol. Comm.*, 3:139-146, 1993.
- MYERS R. D.; BORG, S.; MOSSBERG, R. Antagonism by naltrexone of voluntary alcohol selection in the chronically drinking macaque monkey. *Alcohol*, 3: 383-388, 1986.

- MONDADORI, C.; JAEKEL, J.; PREISWERK, G. CGP36742: the first orally active GABA_B blocker improves the cognitive performance of mice, rats and rhesus monkeys, *Behav. Neur. Biol.*, 60:62-68, 1993.
- MORATO, G. S. e KHANNA, J. M. N-methyl-D-aspartate receptors, nitric oxide, and ethanol tolerance. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 29: 1415-1426, 1996.
- MORATO, G. S.; FERREIRA V. M. M. ; KHANNA, J. NMDA antagonists and tolerance to drugs. (*submetido para publicação*), 1998.
- MORATO, G. S. e FERREIRA V. M. M. Influence of age and of pre-treatment with D-cycloserine on the behavior of ethanol-treated rats tested in the elevated plus maze. *Add. Biol.*, 1: 395-404, 1996.
- MORRISET, R. A. e SWARTZWELDER, S. H. Attention of hippocampal long-term potentiation by ethanol: a patch-clamp analysis of glutamatergic and GABAergic mechanisms. *J. Neurosci.*, 13(5):2222-2232, 1993.
- MORSE, R. M. e FLAVIN, D. K. The definition of alcoholism. *JAMA*, 268: 1012-1014, 1992.
- NUTT D. J. , GLUE, P, MOLYNEUX, S.; CLARK, E. Alpha α_2 -adrenoceptor activity in alcohol withdrawal: a pilot study of the effects of i.v. clonidine in alcoholics and normals. *Alc. Clin. Exp. Res.*, 12:14-18, 1988.
- OLPE, H. R. e KARLSSOM, G. The effects of baclofen and two GABA_B receptor antagonists on long-term potentiation. *Nauntyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 342:194-197, 1990.
- OGATA, N., INNOUE, M., MATSUO, T. Contrasting properties of K⁺ conductances induced by baclofen and gamma-aminobutyric acid in slices of the guinea pig hippocampus. *Synapse*, 1:62-69, 1987.

- O'MALLEY, S. S.; JAFFE, A. J.; CHANG, G.; SCHOTTENFELD, R. S.; MEYER, R. E.; ROUNSAVILLE, B. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. *Arch. Gen. Psych.*, 49:881-887, 1992.
- O'MALLEY, S. S.; JAFFE, A. J.; CHANG, G.; RODE, S.; SCHOTTENFELD, R. S.; MEYER, R. E.; ROUNSAVILLE, B. Six month follow-up of naltrexone and psychotherapy for alcohol dependence. *Arch. Gen. Psych.*, 53:217-224, 1996.
- ONG, J., HARRISON, N. L., HALL, R. G., BARKER, J. L., JOHNSTON, G. A. R., KERR, D. I. B. 3-Aminopropanephosphinic acid is a potent agonist at peripheral central presynaptic GABA_B receptors. *Brain Res.*, 526: 138-142, 1990.
- ONG, J. e KERR, D. I. B. GABA_A and GABA_B receptor-mediated modification of intestinal motility. *Eur.J. Pharmacol.*, 86:9-17, 1983.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID – 10**. Ed. Artes Médicas Sul, 1992.
- PARMAR, B. S., SHAH, K. H., GANDHI, I. C. Baclofen in trigeminal neuralgia – a clinical trial. *Indian J. Dent. Res.*, 1:109-13, 1989.
- PERIS, J., ANDERSON, K. J., VICKROY, T. W., KING, M. A. , WALKER, D. W. Neurochemical basis of disruption of hippocampal long term potentiation by chronic alcohol exposure. *Front. Biosci.*, 15, 2:309-16, 1997a.
- PERIS, J., EPPLER, B. HUM, WALKER, D. W., HUNTER, B. E., MASON, K. ANDERSON, K. J. Effects of chronic ethanol exposure on GABA receptors and GABA_B receptor modulation of 3H-GABA release in the hippocampus. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21(6):1047-52, 1997b.

- PHAM, T. M. e LACAÏLLE, J. C.- Multiple postsynaptic actions of GABA via GABA_B receptors on CA1 pyramidal cells of rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.*, 76(1):69-80, jul, 1996.
- POULOS, C. X. e COPPEL, H. Homeostatic theory of drug tolerance: a general model of physiological adaptation. *Psychol. Rev.*, 98:390-408, 1991.
- RABE, C. S. e TABAKOFF, B. Glycine site-directed agonists reverse the actions of ethanol at N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol. Pharmacol.*, 38:753-757, 1990.
- RASTOGI, S. K.; THYAGARAJAN, R.; CLOTHIER, J; TICKU, M. K. Effect of chronic ethanol treatment on benzodiazepine and picrotoxin sites on the GABA receptor complex in rats. *Neuropharmacol.*, 25:1179, 1986.
- RECASENS, M. Putative molecular mechanisms underlying long-term potentiation (LTP): the key role of excitatory amino acid receptors. *Thérapie*, 50:19-34, 1995.
- REYNOLDS, J. N.; PRASAD, A; MacDONALD, J. F. Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl⁻ currents in neurons of the chick, rat and mouse central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.*, 224:173-181, 1992.
- RHIM H.; TOTH, P. T.; MILLER R. J. Mechanism of inhibition of calcium channels in rat nucleus tractus solitarius by neurotransmitters. *Br. J. Pharmacol.*, 118(6): 1341-1350, jul, 1996.
- SAMSON, H. H. e HODGE, C. W. The role of the mesoaccumbens dopamine system in ethanol reinforcement: studies using the techniques of microinjection and voltammetry. In: TABERNER, P. V.; BADAWY, A. A. B. (eds) **Advances in Biomedical Alcoholism Research**. Oxford: Pergamon Press, 1993.

- SASAKI, H.; MATSUZAKI, T.; NAKAGAWA, H. A.; SEKIZAWA, K.; MARUYAMA, Y. Cognitive function in rats with alcohol ingestion. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 52(4): 845-848, 1995.
- SAEED, D. M. Brain adenosinergic modulation of acute ethanol-induced motor impairment. In: TABERNER P. V., BADAWY, A.A.B. (eds) *Advances in Biomedical Alcoholism Research.*, Oxford: Pergamon Press, 1993.
- SHEFNER, S. A. – Electrophysiological effects of ethanol on brain neurons. In: Watson, R.R. (ed.) *Biochemistry and physiology of substance abuse*. v.2, Boca Raton: CRC Press, 1990.
- SHEFNER, S. A. e TABAKOFF, B. – Basal firing rate of locus coeruleus neurons affects sensitivity to ethanol. *Alcohol*, 2:239-243, 1985.
- SCHOFIELD, P. R.; DARLISON, M. G.; FUJITA, N. et al. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. *Nature*, 328:221-227, 1987.
- SINGH, L. e WOODRUFF G. N. CCK Antagonists: pharmacology and applications to drug abuse. *Alcohol*, 1:27, 1992.
- SNELL, L. D.; TABAKOFF, B.; HOFFMAN. P. L. Radioligand binding to the N-methyl-D-aspartate receptor/ionophore complex: alterations by ethanol *in vitro* and by chronic *in vivo* ethanol ingestion. *Brain Res. Bull.*, 602:91-98, 1993.
- STEVENS, D. R.; GALLAGHER, J. P.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Further studies on the action of baclofen on neurons of the dorsolateral septal nucleus of the rat *in vitro*. *Brain Res. Bull.*, 358:360-363, 1985.
- SZABÓ, G.; TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P. L. The NMDA receptor antagonist dizolcipine differentially affects environment-dependent and environment independent ethanol tolerance. *Psychopharmacol.*, 113:511-517, 1994.

TABAKOFF, B.; HELLEVUO, K.; HOFFMAN, P. L. Alcohol, In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin, Germany, p. 373-458, 1995.

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

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

TABAKOFF, B. e HOFFMAN, P. L. Biochemical pharmacology of alcohol. In MELTZER, H. I. (ed.) **Psychopharmacology – the third generation of progress**. New York: Raven Press, 1987.

TABAKOFF, B.; RABE, C. S.; HOFFMAN, P. L. Selective effects of sedative/hypnotic drugs on excitatory amino acid receptors in brain. **Ann. NY Acad. Sci.**, 625:488-495, 1991.

TABAKOFF, B. e HOFFMAN, P. L. Alcohol: neurobiology. In: LOWINSON, JH, RUIZ, P.; MILLMAN, R. B. **Substance abuse: a comprehensive textbook**. Baltimore: Williams and Wilkins, pp.152-185, 1992.

TEOH, H. ; MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G. GABA, glutamate and substance P like immunoreactivity release: effects of novel GABA_B antagonists. **J. Physiol**, (1):494:217:230, jul, 1996.

TREMWEL, M. F. e HUNTER, B. E. The effects of chronic ethanol exposure on long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus. **Soc. Neurosci.**, 980, 1990.

TRUJILLO, K. A. e AKILL, H. Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for NMDA receptors in drug tolerance. **Drug Alc. Dep.**, 38:139-154, 1995.

- TSAI, G.; GASTFRIEND, D. R.; COYLE, J. T. The glutamatergic basis of human alcoholism. *Am. J. Psychiatr.*, 142:332-340, 1995.
- VOLPICELLI, J. R.; ALTERMAN, A. I.; HAYASHIDA, M.; O'BRIEN, C. P., Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch. Gen. Psychiatr.*, 49: 876-880, 1992.
- VVAA. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, 4th Edition, American Psychiatric Association. Washington, DC, 1994.
- VVAA. Twelve steps and twelve traditions. In: **Alcoholics Anonymous** 16 ed., Alcoholics Anonymous Grapevine, Inc, and Alcoholics Anonymous Publishing, 1994.
- WAFFORD K. A. Ethanol sensitivity of the GABA_A receptor expressed in *Xenopus* oocytes requires 8 amino acids contained in the γ 2L subunit. *Neuron.*, 7: 27-33, 1991.
- WALDVOGEL, H. L.; FAULL, R. L. M.; JANSEN, K. L. R.; DRAGUNOW, M.; RICHARDS, J. G.; et al. GABA, GABA_A receptors and benzodiazepine receptors in the human spinal cord: and immunohistochemical study at the light and electron microscope levels. *Neurosci.*, 39:361-85, 1990.
- WALDMEIER, P. C. e BAUMANN, P. A. GABA_B receptors and transmitter release. In: BOWERY, N.G., BITTIGER, H., OLPE, H-R. (eds) **GABA_B Receptors in Mammalian Function**. Wiley Chichester, p 63-80, 1990.
- WEIGHT, H.; LOVINGER, D. M.; WHITE, G.; PEOPLES R. W. Alcohol and anesthetic actions on excitatory amino acid-activated ion channels. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 625:97-107, 1991.

- WHEELER, D. B.; RANDAL, A.; TSEIN, R. W. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. **Science**, 264:107-11, 1994.
- WEISS, F.; LORANG, M.T.; BLOOM, F. E.; KOOB, G. F. Oral self-administration stimulates dopamine release in the rat *nucleus accumbens*: genetic and motivational determinants. **Pharmacol. Exp. Ther.**, 267:250-258, 1993.
- WILDE, M. I. e WAGSTAFF, A. J. Acamprosate, a review of its pharmacology and clinical potential in the management of alcohol dependence after detoxication. **Drugs**, 53(6): 1038-1053.
- WOODWARD, J. J. A comparison of the effects of ethanol and the competitive glycine agonist 7-chlorokynurenic acid on N-methyl-D-aspartate acid-induced neurotransmitter release from rat hippocampal slices. **J. Neurochem.**, 62:987-991, 1994.
- WOODWARD, J. J. e GONZALES, R. A. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated endogenous dopamine release from rat striatal slices: reversal by glycine. **J. Neurochem.**, 54:712-715, 1990.
- WU, P.H.; MIHIC, S. J.; LIU, J. F.; LÊ, A. D.; KALANT, H. Blockade of chronic tolerance to ethanol by the NMDA antagonist, (+) MK-801. **Eur. J. Pharmacol.**, 231:157-164, 1993.
- WU, P. H.; LIU, J. F.; LANÇA, A. J.; LÊ, A. D.; 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.; LIU, J. F.; LANÇA, A. J.; KALANT, H. Development of alcohol tolerance in the rat after a single exposure to combined treatment with arginine⁸-vasopressin, **J. Pharmacol. Exp.**, 276: 1283-1291, 1996.

YAMADA, K.; NODA, Y.; NAKAYAMA, S.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; HASEGAWA, T.; 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.

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

ZERNIG, G.; FABISH, K.; FABISH, H. Pharmacotherapy of alcohol dependence. *TIPS*, 18:239-231, 1997.