

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CURTA E LONGA DURAÇÃO
AO ETANOL: PARTICIPAÇÃO DAS VIAS NITRÉRGICAS E
DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS**

VANIA MARIA MORAES FERREIRA

Florianópolis, SC, Brasil
Julho/2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CURTA E LONGA DURAÇÃO AO
ETANOL: PARTICIPAÇÃO DAS VIAS NITRÉRGICAS E DOS
RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS**

VANIA MARIA MORAES FERREIRA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Florianópolis, SC, Brasil
Julho/2000

**“ EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CURTA E LONGA DURAÇÃO AO ETANOL:
PARTICIPAÇÃO DAS VIAS NITRÉRGICAS E DOS RECEPTORES
GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS”.**

POR

VANIA MARIA MORAES FERREIRA


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

Banca Examinadora:



Gina Struffaldi Morato

FMC/UFSC-(Orientadora)



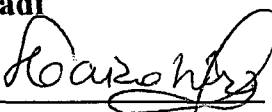
C. Fernando Valenzuela

**UNIVERSIDADE DO NOVO
MÉXICO – USA**



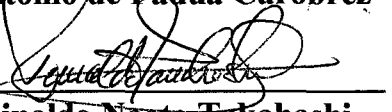
Gerson Chadi

ICB - USP



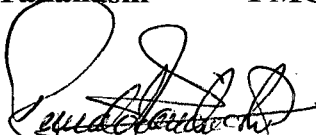
Antônio de Pádua Carobrez

FMC/UFSC



Reinaldo Naoto Takahashi

FMC/UFSC


Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 18 de Julho de 2000.

ORIENTADORA

Prof. Dra. Gina Struffaldi Morato

CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Carlos Fernando Valenzuela

Esta tese foi realizada no laboratório de Psicofarmacologia do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (Brasil), e no laboratório de Neurociências da Escola de Medicina da Universidade do Novo México (Estados Unidos), durante o Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, nível Doutorado, com o auxílio financeiro do CNPq.

“O conhecimento intelectual é o que nos diferencia de alguns técnicos laboratoriais. O gosto pela leitura e o conhecimento obtido dela é o que tem de mais prazeroso na pesquisa.”

GS Morato & CF Valenzuela

“Você é a pessoa que mais conhece os seus resultados, portanto acredite neles.”

CF Valenzuela

DEDICATÓRIA ESPECIAL

*Este trabalho é dedicado especialmente aos meus orientadores **Profa. Dra. GS Morato** e **Prof. Dr. CF Valenzuela** que me ensinaram tudo o que sei em termo de pesquisa. Sei que uma longa estrada ainda me espera pela frente. Quem sabe mais tarde possamos nos encontrar.*

AGRADECIMENTOS

- ↪ Aos professores do Departamento de Farmacologia (UFSC, Brasil), pelo aprendizado.
- ↪ Aos professores do Departamento de Neurociências (UNM, EUA), pela amizade. Fica a admiração pela grande união entre eles.
- ↪ Aos meus orientadores, pelo ensinamento e incentivo à pesquisa.
- ↪ Aos meus amigos, pelo companheirismo. Agora fica a saudade.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIACÕES | x |
| LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELA..... | xi |
| RESUMO..... | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| | |
| I. INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| 1. ASPECTOS GERAIS DO ALCOOLISMO | 1 |
| 2. ALCOOLISMO NO BRASIL..... | 5 |
| 3. HOMEOSTASIA DO CÉREBRO DIANTE DO CONSUMO DO ÁLCOOL | 8 |
| 4. ASPECTOS NEUROCOMPORTAMENTAIS DA DEPENDÊNCIA AO ÁLCOOL | 10 |
| 5. ALVOS CELULARES E MOLECULARES DAS AÇÕES AGUDA E CRÔNICA DO ÁLCOOL | 15 |
| 5.1. Receptores glutamatérgicos ionotrópicos..... | 17 |
| 5.2. Efeitos do álcool sobre os receptores glutamatérgicos ionotrópicos | 20 |
| 5.3. Óxido Nítrico..... | 23 |
| 5.4. Efeitos do álcool sobre as vias nitrérgicas | 26 |
| | |
| II. HIPÓTESES | 28 |
| | |
| III. OBJETIVOS..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1 – Papel das vias nitrérgicas e dos receptores NMDA no efeito ansiolítico do etanol | 31 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 31 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| a) Animais | 33 |
| b) Drogas | 33 |
| c) Labirinto em cruz elevado e arena | 34 |
| d) Cirurgia e métodos de microinjeção | 34 |
| e) Cânulas | 35 |
| f) Histologia | 35 |
| g) Procedimentos experimentais..... | 36 |
| h) Análise estatística..... | 37 |
| 3. RESULTADOS | 38 |
| a) 7-NI intraperitoneal..... | 38 |
| b) 7-NI intrahipocampal | 40 |
| c) Doadores de NO | 42 |
| d) 8-Bromo-GMPc..... | 44 |
| e) D-cicloserina | 46 |
| f) D-cicloserina, 7-NI e etanol | 48 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 50 |
| 5. CONCLUSÕES PARCIAIS | 58 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 2 – Efeitos da exposição de longa duração ao etanol na expressão das subunidades dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e NOS hipocampais | 59 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 59 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 62 |
| a) Exposição crônica ao etanol..... | 62 |
| b) <i>Western Immunoblotting</i> | 65 |
| 3. RESULTADOS | 67 |
| a) Peso corporais dos animais diante do consumo da dieta alcoólica | 67 |
| b) Receptores glutamatérgicos durante o tratamento crônico com etanol..... | 69 |
| c) Enzimas NOS durante o tratamento crônico com etanol..... | 74 |
| d) Avaliação comportamental da síndrome de abstinência ao álcool | 75 |
| e) Receptores glutamatérgicos durante a abstinência ao álcool..... | 78 |
| f) Enzimas NOS durante a abstinência ao álcool | 84 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 85 |
| 5. CONCLUSÕES PARCIAIS | 91 |
| IV. DISCUSSÃO GERAL..... | 92 |
| V. CONCLUSÕES FINAIS..... | 94 |
| VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 95 |

ABREVIACOES MAIS USADAS

| | |
|--------|---|
| AMPA | α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propionato |
| AMPC | Monofosfato cíclico de adenosina |
| DCS | D-cicloserina |
| GABA | cido gama aminobutírico |
| GC | Guanilato ciclase |
| GLY | Glicina |
| GMPc | Monofosfato cíclico de guanosina |
| i.p. | Intraperitoneal |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| 7-NI | 7-Nitroindazol |
| NO | xido nítrico |
| NOS | Sintase do óxido nítrico |
| PKG | Proteína quinase dependente de GMPc |
| PSD-95 | Densidade ps-sináptica 95 |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SNP | Nitroprussiato de sódio |
| SNAP | S-nitroso-N-acetilpenicilamina |

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELA

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Representação esquemática da homeostasia do cérebro | 9 |
| Figura 2 – Administração intraperitoneal de 7-NI em ratos tratados com etanol | 39 |
| Figura 3 – Tratamento intrahipocampal de 7-NI com uma dose subefetiva de etanol..... | 41 |
| Figura 4 – Doadores de NO no efeito ansiolítico do etanol..... | 43 |
| Figura 5 – Análogo do GMPc no efeito ansiolítico do etanol..... | 45 |
| Figura 6 – D-cicloserina intrahipocampal no efeito ansiolítico do etanol..... | 47 |
| Figura 7 – Associação D-cicloserina, 7-NI e etanol..... | 49 |
| Figura 8 – Representação esquemática do mecanismo de ação do etanol/NMDA/NO..... | 57 |
| Quadro 1 – Ingredientes para o preparo das dietas | 63 |
| Quadro 2 – Escores da síndrome de abstinência ao álcool..... | 64 |
| Figura 9 – Pesos dos animais alimentados com uma dieta rica em etanol..... | 67 |
| Figura 10 – <i>Western Blot</i> das subunidades dos receptores NMDA..... | 69 |
| Figura 11 – <i>Western Blot</i> das inserções da subunidade NR1 | 70 |
| Figura 12 – <i>Western Blot</i> das subunidades dos receptores AMPA | 72 |
| Figura 13 – <i>Western Blot</i> das subunidades dos receptores Kainato | 73 |
| Figura 14 – <i>Western Blot</i> da enzima NOS neuronal | 74 |
| Tabela 1 – Resultado dos escores da síndrome de abstinência ao álcool | 76 |
| Figura 15 – Resultado comportamental da avaliação dos escores totais..... | 77 |
| Figura 16 – Receptores NMDA na abstinência ao álcool | 79 |
| Figura 17 – Inserções da subunidade NR1 na abstinência ao álcool..... | 80 |
| Figura 18 – Receptores AMPA na abstinência ao álcool..... | 82 |
| Figura 19 – Receptores Kainato na abstinência ao álcool..... | 83 |
| Figura 20 – Enzima NOS na abstinência ao álcool..... | 84 |

INTRODUÇÃO

GERAL

1. ASPECTOS GERAIS DO ALCOOLISMO

A dependência ao álcool, conhecida como alcoolismo, é um distúrbio crônico que resulta de uma variedade de fatores genéticos, psicosociais e ambientais (Morse e Flavin, 1992). É caracterizada com base na presença de tolerância aos efeitos do álcool, controle motor prejudicado, síndrome de abstinência ao álcool quando há uma parada ou uma redução na ingestão da bebida, uso continuado da bebida devido as conseqüências adversas, e dificuldade em controlar o consumo em decorrência do grande desejo ou compulsão para a mesma (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1994; Tabakoff e Hoffman, 1996). Quando, porém, o uso excessivo e compulsivo pode ser controlado ou parado para evitar as conseqüências indesejadas, o consumo moderado de bebida alcoólica se faz presente. O mais baixo limite a ser considerado, nesse caso, pode se encontrar na faixa de 4,5-50 g/dia, e o mais alto na faixa de 27-80 g/dia, variando de acordo com a cultura de cada país (Eckardt *et al.*, 1998).

As manifestações acima, entretanto, não são determinadas somente geneticamente, psicossocialmente ou ambientalmente, mas também são provenientes de diferenças individuais relacionadas à farmacocinética do álcool. O nível alcoólico resultante no cérebro pode variar entre indivíduos, e depende de parâmetros que incluem taxas de absorção a partir do trato gastrointestinal, volume de distribuição corporal e taxa de metabolismo (Tabakoff e Hoffman, 1996; Eckardt *et al.*, 1998). Fatores inerentes à idade, sexo, peso corporal, tipo de bebida alcoólica, número de drinques/dia, ocasião e outras variáveis também se tornam essenciais na análise da dependência alcoólica que afeta aproximadamente 7-10% da população dos Estados Unidos e resulta em problemas sociais, considerável morbidade e mortalidade (McGinnis e Foege, 1993; Rice, 1993; Diamond e

Gordon, 1997). Naquele país, mais de 20% de todas as admissões hospitalares envolve complicações médicas provocadas pelo uso excessivo de bebida alcoólica, e o custo socioeconômico anual é de cerca de 70-100 bilhões de dólares por ano (Shalala, 1993; Diamond e Gordon, 1997).

Como pôde-se observar, fica, até certo ponto, fácil de se fazer um estudo epidemiológico mais detalhado sobre a dependência alcoólica em países como os Estados Unidos visto a precisão das informações no que diz respeito a esse fato. Em países subdesenvolvidos, entretanto, dados estatísticos relacionados ao distúrbio do alcoolismo ainda são escassos. No Brasil, por exemplo, os estudos são encontrados principalmente nos maiores centros de pesquisa na área, entres eles São Paulo, Porto Alegre, Rio de Janeiro e Santa Catarina. Em alguns desses estudos fica claro o grande consumo de bebida alcoólica pela população em geral, sem restrição de idade. Cabe enfatizar que os Estados Unidos, impedindo a venda para menores de 21 anos, faz com que isto se torne um dos fatores positivos na redução do consumo do álcool a favor deles. Mais adiante, aspectos relacionados ao consumo dessa droga no Brasil serão mencionados.

Nossa visão geral dos aspectos relacionados ao alcoolismo inclui muitas questões relacionadas aos mecanismos moleculares pelos quais o álcool influencia as proteínas celulares, o que determina a sensibilidade ou resistência ao álcool, e quais ações moleculares são responsáveis por conseqüências comportamentais específicas da ingestão do álcool e abuso à esta droga. Através de estudos multidisciplinares, muitas descobertas têm surgido nas últimas décadas, que têm levado à mudanças na conceituação e tratamento do alcoolismo.

Atualmente, há grande interesse na terapia e prevenção da dependência do álcool. O racional para tais terapias é baseado em algumas premissas. *Primeiro*, o avanço na

Neurobiologia tem identificado sistemas de neurotransmissores que contribuem para o início e para a manutenção do consumo de bebida alcoólica. Um entendimento de como mudanças específicas nas funções desses sistemas afetam a susceptibilidade ao álcool fornece um ponto de partida para o desenvolvimento de medicamentos. Os medicamentos podem, teoricamente, ser desenvolvidos para aumentar ou diminuir a síntese, liberação ou concentração sináptica de neurotransmissores, ou modular sistemas transduccionais de sinais. *Segundo*, novas drogas que reduzem o consumo de álcool em animais podem também reduzir o consumo em humanos. *Terceiro*, o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de dependências de outras drogas, sugere que isto possa também ser possível para o tratamento do alcoolismo. Visto que as atuais estratégias de tratamento e prevenção deste distúrbio ainda são geralmente inefetivas, um melhor entendimento dos mecanismos de ação que levam ao desenvolvimento da dependência ao álcool se faz necessário.

A sensibilidade inicial ao álcool prediz o abuso a esta droga em uma fase tardia da vida, provavelmente pelo fato de que a resistência ao álcool, até certo ponto, faz com que as pessoas consumam muito mais e com uma frequência muito maior as bebidas alcoólicas. Essas pessoas têm maior probabilidade de se tornarem dependentes do que aquelas outras que são mais sensíveis aos efeitos daquela droga (Schuckit, 1994). Portanto, é importante entender, a níveis celulares e moleculares, os fatores que regulam a sensibilidade das proteínas neuronais que são alvos para as ações agudas do álcool.

Quando a dependência ao álcool é estabelecida, o cérebro passa por certas mudanças adaptativas para continuar funcionando apesar da presença da droga. Como uma consequência desta adaptação, entretanto, certas alterações ocorrem no cérebro quando o álcool é removido. Em decorrência disto, períodos de abstinência são marcados por uma

sensação de desconforto frente à esta situação e um desejo muito grande de consumir a droga motiva o uso continuado. Em decorrência desses fatores, há também interesse substancial no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que levam a mudanças adaptativas induzidas pela exposição de longa duração ao álcool e os papéis dessas mudanças na síndrome de abstinência.

2. ALCOOLISMO NO BRASIL

O consumo de substâncias psicoativas se constitui em um dos fenômenos mais frequentes na população brasileira, com os primeiros contatos, na maioria das vezes, ocorrendo durante a adolescência (Forster *et al.*, 1996; Pechansky, 1998; Souza e Martins, 1998). Levando em consideração o álcool, a grande frequência de consumo se dá, principalmente, pela quantidade e facilidade na aquisição desta droga. O Brasil, em decorrência da massiva produção de álcool, produz acima de 1 milhão de litros desta droga/ano (cerca de 6,6 litros/pessoa/ano). Esta expressiva produção é, em parte, resultante de um enorme programa de plantação de cana-de-açúcar que foi criado com o objetivo de produção barata de álcool como um substituto do petróleo para os carros. Um dos efeitos dessa superprodução de cana-de-açúcar é a depreciação no preço de bebidas alcoólicas. O litro da cachaça, por exemplo, é cotado a menos de U\$ 2.00, o que favorece o consumo deste destilado mais popular produzido a partir da cana-de-açúcar (Laranjeira, 1996).

Através de estudos com adolescentes brasileiros, foi verificado que 88,9% da amostra selecionada já havia consumido bebida alcoólica algumas vezes, seguido pelo consumo de tabaco (37,7%), independentemente da classe social. Este estudo foi baseado no uso de questionários auto-aplicáveis contendo questões demográficas, sobre a percepção e comportamentos intrínsecos relacionados ao consumo de drogas, entre elas 10 classes de substâncias psicoativas (álcool, tabaco, solventes, barbituratos, anfetaminas, tranquilizantes, maconha, cocaína, alucinógenos e opióides). Os resultados da pesquisa mostraram que, seja legal ou ilegal, o consumo de substâncias psicoativas se torna um dos fenômenos mais frequentes em nosso país, principalmente nas primeiras fases da adolescência (Muza *et al.*, 1997a, b). Em um outro estudo bem mais recente, entretanto, o

álcool continua sendo uma das substâncias psicoativas de maior prevalência de uso na vida, com uma estimativa de 53,2% da amostra selecionada em 24 cidades do estado de São Paulo. Neste estudo foi verificado que 6% da mesma amostra populacional era dependente àquela droga, valores estes próximos aos observados em estudos de outros países (CEBRID, 2000). Este grande consumo pode ser em decorrência de diversas variáveis, assim como pode ser fator determinante de muitas moléstias, conforme demonstrado por estudos das características sociais, demográficas e clínicas da doença (Carvalho *et al.*, 1995; Hochgraf *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 1996; Hirata *et al.*, 1997).

Em termos das características sociais e demográficas associadas ao consumo do álcool, as mulheres brasileiras começam a beber e consomem muito mais a droga, em uma fase mais tardia da vida do que os homens. Adicionalmente, é atribuído ao sexo feminino a maior incidência de suicídios com causas relacionadas diretamente ao alcoolismo (Vianna e Monteiro, 1991; Hochgraf *et al.*, 1995; Pechansky, 1998). A violência familiar e agressões físicas são algumas das maiores queixas das vítimas de dependentes em álcool (Carvalho *et al.*, 1995; Cruz, 1999; Gianini *et al.*, 1999; Orpinas, 1999). Além disso, outros fatores tais como idade, nível de educação, renda salarial e raça também estão associados, de alguma forma, àquele distúrbio (Moreira *et al.*, 1996).

Em relação aos estudos clínicos brasileiros, o alcoolismo está implicado com *elevada pressão arterial* (Faintuch, 1995; Cordeiro *et al.*, 1998), *pancreatite crônica* (Mott *et al.*, 1989, Dani *et al.*, 1990; Cunha *et al.*, 1997; Porto *et al.*, 1999); *doenças hepáticas* (Cotrim *et al.*, 1988) e *carcinomas do trato respiratório e sistema digestivo* (Hamada *et al.*, 1991; Dietz *et al.*, 1998; Schlecht *et al.*, 1999). Os mais altos riscos, entretanto, são aqueles relacionados ao cérebro, mas, infelizmente, os estudos clínicos relacionados a essas implicações no Brasil ainda são escassos. No que diz respeito aos estudos experimentais,

poucos são os grupos que atualmente se dedicam às pesquisas envolvendo a ação do álcool no SNC. Os efeitos da tolerância à incoordenação motora (Barreto *et al.*, 1998; Zaleski *et al.*, submetido à publicação; Barbosa e Morato, submetido à publicação); efeito hipotérmico (Carreño *et al.*, 1997), avaliação de respostas comportamentais relacionadas à atividade ansiolítica do etanol (Ferreira e Morato, 1996, 1997); efeitos reforçadores (Blatt e Takahashi, 1999), estimulação locomotora e sensibilização produzida pela associação do álcool e outras drogas (Gevaerd e Takahashi, 1999; Gevaerd *et al.*, 1999) e problemas associados à Síndrome Alcoólica-Fetal, que provoca sérios problemas ao recém-nascido e ao longo de todo o desenvolvimento, devido a ingestão de álcool por mães grávidas (Silva *et al.*, 1981; Grinfeld *et al.*, 1999a, b), são algumas das principais linhas de pesquisas que ainda mantêm a contribuição de nossos país para novas descobertas relacionadas ao tratamento de um distúrbio tão complexo como o do alcoolismo.

Como vimos, vários são os fatores que, direta e indiretamente, podem estar implicados na dependência ao álcool. Ainda que de maneira escassa, campanhas publicitárias em nosso país mostram os riscos do consumo das drogas e tentam ajudar na conscientização dos danos que elas podem produzir, entretanto são falhas em relação ao uso/abuso do álcool devido ser uma droga liberada. Neste trabalho, serão fornecidas várias informações teóricas e dados experimentais que propiciarão conhecimentos dos fatores relacionados ao consumo do álcool e as implicações cerebrais, assim como os desequilíbrios homeostáticos nos sistemas de neurotransmissores presentes no SNC em decorrência do consumo de curta e longa duração dessa droga.

3. HOMEOSTASIA DO CÉREBRO DIANTE DO CONSUMO DO ALCÓOL

Todas as atividades que ocorrem no SNC envolvem comunicações entre as células nervosas. Grupos de neurônios com funções similares estendem-se de uma região para outra, formando circuitos neurais que interagem uns com os outros para integrar todas as funções centrais (Koob *et al.*, 1994; Di Chiara *et al.*, 1996). No que diz respeito ao alcoolismo, vários são os circuitos envolvidos nos diferentes aspectos deste distúrbio que interferem na homeostasia cerebral. Sob condições normais, é possível verificar um equilíbrio entre os neurotransmissores inibitórios e excitatórios (figura 1-A). O consumo alcoólico, entretanto, pode deprimir as funções cerebrais, alterando o balanço homeostático entre aquelas neurotransmissões (Valenzuela, 1997).

O álcool pode atuar especificamente como um depressor por aumentar a neurotransmissão inibitória, por diminuir a neurotransmissão excitatória ou através de uma combinação de ambos. No caso do *consumo de curta duração*, o balanço homeostático é inclinado em direção aos efeitos inibitórios (figura 1-B) tanto por aumentar as funções dos neurotransmissores inibitórios e neuromoduladores (i.e ácido gama-aminobutírico – GABA; glicina e adenosina), quanto por reduzir as funções dos neurotransmissores excitatórios (i.e. glutamato e aspartato) (Valenzuela, 1997). Pesquisas sugerem que após *exposição de longa duração*, o cérebro tenta restaurar o equilíbrio compensando os efeitos depressores do álcool. Desta maneira, o cérebro diminui a neurotransmissão inibitória e aumenta a neurotransmissão excitatória (figura 1-C). As ações excitatórias (e.g., redução das inibições sociais) parecem ser causadas, pelo menos em parte, pela supressão dos sistemas de neurotransmissores inibitórios (Pohorecky, 1977). Durante a *síndrome de*

abstinência ao álcool, estas mudanças compensatórias não são opostas pela presença da droga e o balanço muda em direção a um estado de excitabilidade aumentada (figura 1-D). Este estado de hiperexcitabilidade é caracterizado por crises epileptiformes, delírios e ansiedade (Valenzuela, 1997).

Em resumo, o álcool, diferente dos benzodiazepínicos, pode tanto aumentar as ações do principal sistema inibitório do cérebro, quanto atuar bloqueando alguns aspectos dos sistemas excitatórios endógenos cerebrais. Esta ação dual de aumentada inibição e diminuída excitação explica porque o álcool causa tantos prejuízos sobre as funções do SNC (Nutt, 1999), além de variadas alterações neurocomportamentais nas pessoas que o consome.

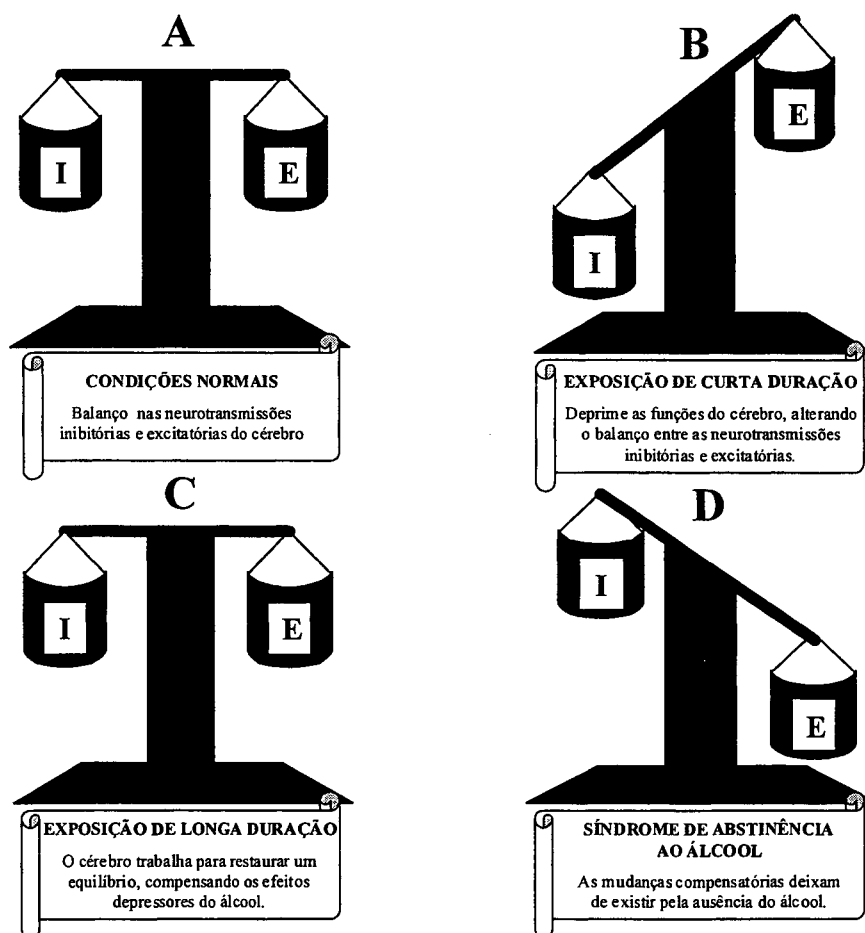


Figura 1 – Representação esquemática dos efeitos do álcool no balanço das neurotransmissões inibitórias e excitatórias no cérebro (adaptado de Valenzuela, 1997).

4. ASPECTOS NEUROCOMPORTAMENTAIS DA DEPENDÊNCIA AO ÁLCOOL

É bem conhecido que os efeitos comportamentais produzidos pelo álcool em humanos e em animais ocorrem em concentrações milimolares. Levando em consideração o etanol, as concentrações sanguíneas em que um indivíduo começa a perceber mudanças fisiológico-comportamentais podem ser de 5-20 mM ou aproximadamente 20-90 mg/dl (Eckardt *et al.*, 1998). A leve intoxicação ocorre de 20-25mM (concentração alcoólica sanguínea de aproximadamente 100 mg/dl) (Woodward, 1999). Outros trabalhos mencionam que em pessoas não dependentes à esta droga, a intoxicação se desenvolve em um nível alcoólico sanguíneo de 10-35 mM (50-150 mg/dl), produzindo euforia e perda das inibições sociais, ataxia, alterações na memória, falta de atenção, tempo de reação diminuído e sonolência, todos contribuindo para que o consumo do álcool seja uma das maiores causas de acidentes de diferentes origens (Urso *et al.*, 1981; Goldstein, 1983; Diamond e Messing, 1994).

As concentrações alcoólicas no sangue e no cérebro se equilibram rapidamente após a ingestão da bebida devido esta droga atravessar facilmente as barreiras cerebrais. Quando presente em níveis sanguíneos elevados (> 150 mg/dl), o álcool é considerado amnésico (Goldstein, 1983). Nas concentrações de 100 mM (aproximadamente 400 mg/dl de álcool no sangue) os efeitos podem ser fatais, principalmente em decorrência da depressão respiratória e hipotensão (Urso *et al.*, 1981; Diamond e Messing, 1994). Essa intoxicação é muito pior nos indivíduos não tolerantes (Woodward, 1999), visto que as pessoas dependentes são mais resistentes à intoxicação alcoólica do que aquelas não dependentes (Lindblad e Olsson, 1976; Urso *et al.*, 1981).

Os efeitos neurocomportamentais do álcool podem ser prazerosos, estimulantes ou sedativos, e dependem da dose, do tempo de ingestão, se a ingestão é crônica ou intermitente, da expectativa de quem bebe, do ambiente no qual o álcool é consumido, da personalidade de quem bebe, e da predisposição genética para a dependência ao álcool. Entretanto, sabe-se que uma das principais razões do homem fazer uso desta droga é por causa de seu efeito ansiolítico (Nutt, 1999). Uma das mais antigas teorias baseadas na aprendizagem, usada para explicar a transição entre beber moderado e abuso do álcool e alcoolismo é a hipótese da redução de tensão ou redução do estresse/ansiedade (Collins e Marlatt, 1983; Pohorecky, 1991). Cabe enfatizar, portanto, que diante do consumo prolongado dessa droga, as pessoas podem manifestar alguns sinais e sintomas cerca de 6-24 horas após o último drinque, característico de uma síndrome de abstinência ao álcool (Hall e Zador, 1997). Neste caso, ao invés de apresentar efeito ansiolítico, o consumo prolongado pode levar a efeitos ansiogênicos (File *et al.*, 1993; Gatch *et al.*, 1999).

A síndrome de abstinência ao álcool pode ser classificada em três conjuntos de sintomas: o *primeiro* consiste daqueles relacionados com hiperatividade autonômica, os quais aparecem horas após o último drinque e têm um pico em 24-48h. Nesta etapa, as pessoas podem se queixar de ansiedade, conforme mencionado anteriormente; náusea, vômito, tremor e agitação. No *segundo*, são comuns as excitações neuronais, as quais incluem as crises epileptiformes, que ocorrem com 12-48h após a abstinência ao álcool (O'Brien, 1996). Por fim, o *terceiro* conjunto de sintomas compreende o *delirium tremens* (ou delírio da retirada do álcool), o qual aparece somente em estados mais graves da doença, e é caracterizado por alucinações visuais e auditivas, confusão e desorientação, perda da consciência, atenção prejudicada e pronunciada hiperatividade autonômica. Se não tratado, o dependente pode morrer por colapso respiratório e cardiovascular

(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1994; O'Brien, 1996; Hall e Zador, 1997).

Um objetivo-chave da pesquisa do alcoolismo é explicar porque as pessoas começam a beber, porque algumas bebem em excesso, e porque outras são incapazes de parar o consumo do álcool diante de conseqüências prejudiciais e/ou difíceis. Além disso, há interesse no entendimento dos fatores que influenciam o consumo dessa droga, que levam a transição do seu consumo médio a moderado para um consumo descontrolado. Os reforços positivo e negativo são alguns desses fatores que estão envolvidos na manutenção do alcoolismo, fazendo com que as pessoas consumam cada vez mais a droga. O reforço positivo é o processo pelo qual uma ação torna-se repetitiva com o objetivo de dar prazer ou recompensa. O reforço negativo é baseado, não somente na recompensa, mas também no fato de que a droga alivia um sintoma desagradável ou doloroso (Gardner e Lowinson, 1993; Koob *et al.*, 1993).

Os diversos efeitos fisiológicas e comportamentais do álcool se devem as ações em várias regiões do cérebro. O hipocampo que faz conexões recíprocas com várias estruturas cerebrais, entre elas córtex, amígdala, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal, formando um sistema cerebral responsável por reações comportamentais (Handley, 1994), parece estar implicado com muitos desses efeitos (Ryabinin, 1998). Além disso, apesar de exercer somente um papel indireto nas respostas dos neurocircuitos responsáveis pelos processos reforçadores do álcool, sugere-se que o hipocampo esteja relacionado com a dependência ao álcool (Hollmann e Heinemann, 1994; Ulrichsen *et al.*, 1996; Koob *et al.*, 1998; Devaud e Morrow, 1999; Wirkner *et al.*, 1999, Costa *et al.*, submetido à publicação). Além disso, sabe-se que o Sistema de Inibição Comportamental (do inglês *Behavioural Inhibition System* – BIS) proposto por Gray (1987), responde a vários eventos punitivos e

estímulos novos, onde drogas com propriedades ansiolíticas, como o álcool por exemplo, podem atenuá-lo em consequência de sua ação no sistema septohipocampal. Dessa forma, pode-se sugerir que o hipocampo seja uma das principais áreas do sistema nervoso central envolvida nos efeitos do álcool.

Por outro lado, apesar de haver dúvidas quanto à validade de se usar primatas não-humanos ou animais de pequeno porte para estudos envolvendo comportamento consumatório de álcool (Cícero, 1979), vários trabalhos têm mostrado que tais animais são importantes para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no alcoolismo. Embora este seja um distúrbio único para humanos, muitos estudos têm desenvolvido modelos animais com o objetivo de elucidar substratos neurais envolvidos com esse comportamento (Deutsch e Eisner, 1977; Samson, 1986; McBride e Li, 1998).

Os modelos animais são usados como ferramentas nas pesquisas de componentes com potencial terapêutico e como simulações para pesquisas dos mecanismos envolvendo comportamento emocional. Vários deles podem mimetizar o alcoolismo humano e estão disponíveis para estudar as funções normais e anormais do sistema nervoso. Dois modelos que merecem ser mencionados aqui, visto que serviram de base para a execução de nossos estudos, são o labirinto em cruz elevado e a administração oral prolongada de álcool. O teste do labirinto em cruz elevado é usado extensivamente na descoberta de agentes ansiolíticos e ansiogênicos, e para investigar bases psicológicas e neuroquímicas da ansiedade (Rodgers *et al.*, 1997). É um modelo animal validado etologicamente, porque usa estímulo natural que pode induzir ansiedade em humanos (Dawson e Tricklebank, 1995; Rodgers *et al.*, 1997). A auto-administração oral de álcool, por sua vez, tem sido um modelo animal frequentemente usado para o estudo da motivação do consumo do álcool ou para o estudo das consequências da dependência alcoólica em ratos (Moy *et al.*, 1997).

É importante enfatizar que um perfeito modelo experimental para uso com animais é isomórfico às condições humanas e que torna-se útil quando pode ser mostrado que tem uma analogia relevante, ou seja, quando ele revela alguns aspectos de um processo complexo através de hipóteses testadas em humanos (McBride e Li, 1998). Através deles é possível realizar pesquisas celulares e moleculares, envolvendo neurotransmissores e receptores, que se constituem em ferramentas fundamentais para o estudo de muitos aspectos fisiológicos, farmacológicos, bioquímicos e comportamentais relacionados ao alcoolismo.

5. ALVOS CELULARES E MOLECULARES DAS AÇÕES AGUDA E CRÔNICA DO ÁLCOOL

As ações do álcool no cérebro são complexas, visto a diversidade de áreas e diferentes neurotransmissores no SNC que são afetados por esta droga (Litten *et al.*, 1996; Eckardt *et al.*, 1998). Essas ações, provavelmente, podem ser alteradas por vários mecanismos que, no passado, pareciam difíceis de serem identificados, principalmente quanto aos efeitos específicos (Allan e Harris, 1991; Tabakoff e Hoffman, 1992).

Uma das teorias mais importantes das ações do álcool foi baseada na observação de que esta droga alterava as propriedades dos lipídios nas membranas neuronais, aumentando a fluidificação das membranas (Goldstein e Chin, 1981; Rottenberg, 1986). Essa idéia de que o álcool atua dissolvendo as membranas neuronais, alterando as funções inespecificamente, tem sido substituída pela visão de que o álcool atua especificamente sobre certas enzimas e receptores do cérebro. Este fato não indica que o álcool atua como um transmissor em um sentido convencional; essas ações provavelmente representam perturbações fisico-químicas causadas pela lipoafinidade do álcool por partes alostéricas das proteínas. Entretanto, a identificação dessas proteínas sensíveis ao álcool, não somente ajudam a explicar as ações desta droga, como também servem de alvos para novos tratamentos (Nutt, 1999).

Recentes evidências sugerem que as proteínas envolvidas na transdução de sinais podem ser os mais importantes alvos celulares para o álcool administrado aguda e cronicamente (Alling, 1999). Componentes da cascata de transdução de sinais que parecem ser influenciados por essa droga incluem canais iônicos (Snell *et al.*, 2000), segundos mensageiros (Pandey, 1998), proteínas G (Davis-Cox *et al.*, 1996), reguladores de

expressão gênica (Wilke *et al.*, 1994), neurotransmissores e seus receptores (Finn *et al.*, 2000; Snell *et al.*, 2000) e incluindo como caso especial o óxido nítrico (NO) (Ikeda *et al.*, 1999; Singhal *et al.*, 1999; Venkov *et al.*, 1999). Grande interesse tem sido dado para a participação do sistema glutamatérgico e das vias nitrérgicas na maior parte dos efeitos do álcool no SNC, mas devido à diversidade de áreas cerebrais em que eles se encontram presentes e devido as interações com diferentes neurotransmissores, tornou-se difícil de se obter resultados experimentais homogêneos em várias áreas de pesquisa quando o assunto se trata de sistema glutamatérgico e álcool, NO e álcool ou a interação de todos eles. Neste trabalho, vamos examinar e estender os estudos com esses neurotransmissores nos efeitos agudo e crônico do álcool.

5.1 Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos têm sido divididos em dois grupos: os N-metil-D-aspartato (*NMDA*), que são sensíveis ao NMDA e acoplados a canais de alta condutância iônica, permeável ao sódio, potássio e cálcio; e os não-NMDA, que fazem parte os receptores α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propionato (*AMPA*) e *Kainato*, ativados pelo AMPA, quisqualato e kainato, e são acoplados a canais iônicos permeáveis principalmente ao sódio e potássio (Watkins e Evans, 1981; Mayer e Westbrook, 1987). Sabemos que o álcool tem extenso efeito sobre o SNC através de suas ações diretas e indiretas em vários sistemas neuroquímicos. Nos últimos anos, um dos mais importantes sistemas envolvidos com os efeitos daquela droga integra os receptores glutamatérgicos ionotrópicos.

Pesquisas têm mostrado a importância dos receptores NMDA em vários aspectos das funções fisiológicas (Collingridge e Singer, 1990; Snell *et al.*, 2000), o que tem feito deles, um dos mais bem estudados, principalmente devido à disponibilidade de agonistas e antagonistas seletivos (Watkins e Evans, 1981). A multiplicidade de sítios modulatórios naquele complexo receptor favorece diversas possibilidades para intervenção farmacológica. Entre aqueles inclui-se o sítio modulatório positivo para glicina (GLY) (Wroblewski e Danysz, 1989). A GLY não é simplesmente um forte potenciador das respostas do glutamato, mas é absolutamente necessária para a abertura dos canais dos receptores NMDA, assim exercendo um papel de um co-agonista (Johnson e Ascher, 1987; Kleckner e Dingledine, 1988; Vyklícky *et al.*, 1990). A participação de agonistas e antagonistas do sítio da GLY nos complexos receptores NMDA tem sido alvo de muitos estudos comportamentais, em especial aqueles relacionados à ansiedade (Corbett e Dunn,

1993; De Souza *et al.*, 1998; Teixeira e Carobrez, 1999). Várias linhas de pesquisa sugerem que o álcool é um antagonista daquele sítio (Ferreira e Morato 1996, 1997; Nunez *et al.*, 2000; Snell *et al.*, 2000).

Cabe enfatizar, que além do sítio da GLY, as subunidades que integram os receptores também são fundamentais para a atividades dos mesmos. Os receptores NMDA consistem de seis subunidades (NR1, NR2 (A-D) e NR3A), cada uma derivada de um gene separado, as quais se combinam para formar um receptor multimérico. Estudos *in vitro* mostram que para a funcionalidade dos receptores NMDA, é necessária a presença de pelo menos uma subunidade NR1 (Ishii *et al.*, 1993; Monyer *et al.*, 1994; Behe *et al.*, 1995). Esta subunidade é amplamente distribuída através do cérebro e é considerada a subunidade-chave dos receptores NMDA. As ações fisiológicas desses receptores parecem ser determinadas pela co-associação de uma subunidade NR1 com NR2 (A, B, C ou D) (Meguro *et al.*, 1992; Ishii *et al.*, 1993; Seeburg *et al.*, 1995) e/ou uma subunidade NR3A (Sucher *et al.*, 1995; Das *et al.*, 1998). As subunidades NR1 e NR2 expressam os sítios de reconhecimentos para a GLY e para o glutamato, respectivamente (Williams *et al.*, 1996; Laube *et al.*, 1997). Todas essas subunidades compartilham um pouco de suas seqüências idênticas com outros canais acoplados a ligantes, incluindo membros dos subgrupos dos receptores AMPA e kainato (Moriyoshi *et al.*, 1991; Monyer *et al.*, 1992; Nakanishi, 1992; McBain e Mayer, 1994; Zukin e Bennett, 1995).

Os AMPA são os receptores primários envolvidos na transmissão excitatória rápida da maioria dos neurônios no SNC (Hollmann e Heinemann, 1994) e são constituídos pelas subunidades GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4 (Keinänen *et al.*, 1990). A família dos receptores Kainato, por sua vez, compreende as subunidades GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2 (Hollmann e Heinemann, 1994). Os papéis desses receptores têm sido focos dos

mais recentes estudos nas mais diversas áreas da Neurociência (Valenzuela *et al.*, 1998a, b; Bortolotto *et al.*, 1999, Chittajallu *et al.*, 1999; Valenzuela e Cardoso, 1999; Weiner *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2000). Os receptores AMPA e Kainato são encontrados em muitas regiões do SNC, incluindo o hipocampo como uma das áreas do cérebro mais rica na expressão das subunidades destes receptores (Keinänen *et al.*, 1990; Petralia *et al.*, 1994) e ganham, atualmente, um lugar privilegiado nas pesquisas voltadas para as explicações de vários distúrbios, incluindo o alcoolismo. Com isto, pesquisas biomédicas básicas têm exercido um papel importante no entendimento dos mecanismos neurais pelos quais o álcool produz intoxicação aguda, dependência e síndrome de abstinência.

5.2 Efeitos do álcool nos receptores glutamatérgicos ionotrópicos

Os receptores glutamatérgicos têm sido implicados, pelo menos em parte, nos mecanismos através dos quais o álcool produz grande parte dos seus efeitos agudos e crônicos. Entre os receptores glutamatérgicos ionotrópicos o que tem sido melhor estudado e que parece exercer um papel-chave nas ações daquela droga incluem-se os receptores sensíveis às ações do NMDA. Quando administrado agudamente, o álcool tem efeitos inibitórios nas ações desses receptores, bloqueando as ações dos canais iônicos neuronais. Em contrapartida, a administração crônica dessa droga causa um aumento compensatório no número de canais iônicos e elevada sensibilidade dos neurônios àqueles canais (Danysz *et al.*, 1992; Harris, 1999). Além disso, o álcool pode também interferir nas respostas dos receptores Kainato (Dildy-Mayfield e Harris, 1995; Valenzuela *et al.*, 1998b) e AMPA (Lovinger, 1993), sugerindo que os receptores não-NMDA também sejam sensíveis àquela droga.

Tem sido demonstrado em experimentos *in vitro* que o álcool aumenta a regulação das subunidades específicas dos receptores NMDA, mostrando que os canais iônicos contendo as subunidades NR2A e NR2B são mais sensíveis a esta droga do que aqueles contendo as subunidades NR2C e NR2D (Koltchine *et al.*, 1993; Masood *et al.*, 1994; Chu *et al.*, 1995). Em experimentos *in vivo* foi mostrado que ratos alimentados por 12 semanas com dietas líquidas contendo etanol, aumentaram a expressão das subunidades NR1 no hipocampo, mas não em outras estruturas cerebrais (Trevisan *et al.*, 1994). Bhave *et al.* (1999) sugeriram que as ações do álcool em inibir os receptores NMDA quando os neurônios granulares cerebelares estão expressando a mais alta proporção de subunidades NR2B, é um resultado da mais alta afinidade desses receptores para os níveis endógenos de

GLY. Outro grupo de pesquisadores, entretanto, mostraram que esta sensibilidade ao etanol não está relacionada com a composição da subunidade dos receptores NMDA e nem com a sensibilidade do ifenprodil, um antagonista específico da subunidade NR2B, mas sim, exclusivamente, com uma interação cinética com a GLY (Popp *et al.*, 1999).

Ao contrário do que é conhecido sobre os efeitos da exposição crônica ao etanol sobre as funções dos receptores NMDA, poucos estudos têm investigado esses efeitos sobre os receptores AMPA e Kainato. No que diz respeito ao Kainato, apesar dos papéis exercidos por esses receptores nas complexas funções do cérebro ainda serem pouco entendidos, trabalhos estão surgindo para se compreender as consequências das respostas inibitórias desses receptores pelo etanol, visto que estudos indicam que as funções de recombinantes dos receptores Kainato (Dildy-Mayfield e Harris, 1995; Valenzuela *et al.*, 1998a), e dos receptores Kainato em neurônios granulares cerebelares isolados farmacologicamente, são inibidas pelo etanol (Valenzuela *et al.*, 1998b).

Recentes investigações revelaram que nas concentrações de 5-50 mM, o etanol atenuou a atividade mediada pelos receptores NMDA (Wirkner *et al.*, 1999; Woodward, 1999), mas teve poucos efeitos nas respostas mediadas pelos subtipos de receptores não-NMDA, AMPA e Kainato (Lovinger *et al.*, 1989, 1990). Desta maneira, a visão prevalente é de que aquela droga atua primariamente sobre os receptores NMDA, influenciando a neurotransmissão mediada pelo glutamato. Outros estudos, entretanto, indicaram que as respostas neuronais para a ativação dos receptores AMPA e Kainato podem também ser moduladas pelo etanol, embora em concentrações maiores (> 50 mM) do que aquelas usadas para induzir modulação dos receptores NMDA (Lu e Yeh, 1999). Além disso, também é discutido que os receptores AMPA e Kainato apresentam uma significativa

sensibilidade às ações agudas do etanol em várias regiões do SNC, incluindo o hipocampo (Lovinger *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1995).

Em resumo, uma das respostas adaptativas do SNC à exposição crônica ao etanol é um aumento na regulação dos receptores NMDA em humanos (Michaelis *et al.*, 1990) e em ratos (Dahchour e De Witte, 2000), particularmente no hipocampo, conforme medido pela ligação específica de ligantes (Gulya *et al.*, 1991; Snell *et al.*, 1993) e pela imunoreatividade das subunidades dos receptores NMDA (Trevisan *et al.*, 1994). Além disso, resultados também indicam que os receptores Kainato hipocampais são agudamente inibidos pelo etanol (Costa *et al.*, 2000) e levantam a possibilidade de que, quando administrada cronicamente, esta substância psicoativa pode também alterar a função desses receptores.

Neste contexto, é importante investigar se mudanças compensatórias na expressão e/ou função dos receptores NMDA, AMPA e Kainato hipocampais ocorrem após a exposição crônica ao etanol. Este estudo agudo limitou-se somente a observações comportamentais. Neste trabalho escolhemos estudar os efeitos da exposição aguda e crônica ao etanol sobre os receptores glutamatérgicos ionotrópicos porque estes podem ser alvos importantes nas intervenções farmacológicas que aliviam alguns dos sintomas e consequências da dependência e da síndrome de abstinência ao álcool.

5.3 Óxido Nítrico

A descoberta de que as ações biológicas do fator relaxante derivado do endotélio eram devidas à liberação endógena de NO (Ignarro *et al.*, 1987; Khan e Furchgott, 1987; Palmer *et al.*, 1987) revelou a existência de uma via bioquímica ubíqua (Moncada *et al.*, 1989). Ao contrário dos neurotransmissores clássicos, o NO é sintetizado de acordo com a demanda, pelas sintases do óxido nítrico (NOS), que são enzimas contendo o grupo heme com uma seqüência similar ao da citocromo P-450 redutase. Elas contêm um domínio oxigenase N-terminal e um domínio redutase C-terminal (Nathan e Xie, 1994). A atividade da NOS requer uma homodimerização bem como três co-substratos (L-arginina, dinucleotídeo de nicotinamida fosfato de adenina reduzida – NADPH, e O₂) e 5 cofatores ou grupos prostéticos (dinucleotídeo de adenina flavina - FAD, mononucleotídeo de flavina - FMN, calmodulina, tetrahydrobiopterina e heme) (Marletta, 1994; Nathan e Xie, 1994).

Várias isoformas distintas de NOS têm sido descritas e representam os produtos de três genes distintos (Marletta, 1994; Nathan e Xie, 1994), sendo duas formas constitutivas e uma induzida. Entre as formas constitutivas de NOS dependentes de cálcio-calmodulina (Ca⁺⁺-CAM), incluem uma neuronal, a *NOS_n* (também designada NOS1), identificada primeiramente em neurônios. Entretanto, além do cérebro (cerebelo, córtex, estriado, bulbo olfatório, hipocampo, hipotálamo e prosencéfalo basal), encontra-se também presente na medula dorsal e sistema nervoso periférico. Outra forma constitutiva de NOS é a endotelial, a *NOS_e* (também designada NOS3), primeiramente identificada no endotélio vascular. A forma induzida por estímulos imunológicos ou inflamatórios, a *NOS_i* (também designada NOS2), é expressa independentemente de Ca⁺⁺ (Bredt *et al.*, 1991; Vincent e Kimura, 1992; Marletta, 1994; Nathan e Xie, 1994). Visto que essas enzimas sintetizadoras

do NO podem ser encontradas em praticamente todas as regiões do cérebro (Dawson *et al.*, 1991; Southam e Garthwaite, 1993), fica fácil entender porque o NO está presente na maior parte das regiões cerebrais, controlando múltiplos pontos da neurotransmissão no SNC, e envolvido em um número de eventos das mais diferentes naturezas.

Evidências indicam que o sistema glutamato/NOS/guanilato ciclase (GC) solúvel é de importância primária em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos no cérebro (Garthwaite, 1991; De Sarro *et al.*, 1993; Lipton *et al.*, 1993; Dawson, 1995; Collingridge e Bliss, 1995; Pantazis *et al.*, 1998; Takagi *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2000). Muito dos conhecimentos sobre essa interação neuroquímica deriva de estudos *in vivo* e *in vitro* fazendo-se uso de várias técnicas, onde mostram que as vias da NOS/GC cerebral são principalmente controladas pelos receptores NMDA, AMPA, metabotrópicos e também podem ser influenciadas por outros transmissores (GABA, acetilcolina e neuropeptídeos) através de circuitos polissinápticos interagindo com o sistema glutamatérgico (Vincent *et al.*, 1998; Fedele e Raiteri, 1999).

O NO parece influenciar, de alguma forma, comportamentos relacionados à ansiedade. A administração de inibidor da NOS, L-N^G-nitro-arginina (L-NOARG) em ratos, reduziu significativamente o aumento da exploração nos braços abertos do labirinto em cruz elevado induzido pelo gás anestésico óxido nítrico. Este antagonismo dos efeitos do óxido nítrico também foi revertido pelo pré-tratamento intracerebroventricular com L-arginina, mas não com D-arginina. Os resultados nos mostraram a participação do NO mediando o efeito ansiolítico daquele gás (Caton *et al.*, 1994). Além disso, foi demonstrado que o pré-tratamento sistêmico com L-NOARG antagonizou o efeito ansiolítico do benzodiazepínico clordiazepóxido em camundongos testados naquele mesmo modelo experimental. Estes dados sugeriram que a produção de NO pode mediar os efeitos

de alguns ansiolíticos (Quock e Nguyen, 1992). Por outro lado, um inibidor da NOS, N^G-nitro-L-arginina metil-ester (L-NAME) quando administrado na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) ou sistemicamente em ratos, aumentou a exploração daqueles animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado sem nenhuma alteração no número de entradas nos braços fechados, uma resposta característica de compostos com atividade ansiolítica (Guimarães *et al.*, 1994). Neste contexto, o NO foi considerado uma substância ansiogênica. Com estas contradições de informações fica clara a necessidade de estudos complementares relacionados a participação desse mensageiro não convencional com as respostas comportamentais de ansiedade.

Outros estudos mostram que as ações do NO podem se dar em decorrência de influência direta ou indireta nos receptores NMDA. As interações entre os receptores NMDA e o NO podem também ocorrer devido a presença de proteínas que se ligam às subunidades NR2A e NR2B dos receptores NMDA e sinalizam moléculas, tais como as NOS (Sattler *et al.*, 1999; Takagi *et al.*, 2000). A densidade pós-sináptica 95 (PSD-95) representa uma classe de proteínas de ancoramento que servem para localizar vários canais iônicos nas densidades pós-sinápticas e contém domínios PDZ, os quais interagem com os receptores NMDA. Estudos envolvendo essas proteínas não fizeram parte de nossos objetivos, entretanto devido às informações anteriormente citadas, é possível supor, que o NO possa estar envolvido em comportamentos ligados à ansiedade e a distúrbios como o do alcoolismo devido à interação com os receptores NMDA.

5.4 Efeitos do álcool nas vias nitrérgicas

Trabalhos têm mostrado que alguns dos efeitos do álcool são mediados através das vias nitrérgicas. Agentes como os inibidores da NOS e doadores de NO, parecem estar implicados em muitas das respostas comportamentais àquela droga. Ratos pré-tratados com L-NAME atrasaram o início da perda dos reflexos posturais induzida pelo álcool, enquanto que o doador de NO, dinitrato de isosorbida, diminuiu o tempo de duração da perda daqueles reflexos. Esses dados complementados por outros, foram claros em sugerir que as vias nitrérgicas têm alguma participação no efeito sedativo do álcool (Adams *et al.*, 1994). O NO parece também exercer um papel importante no consumo voluntário daquela droga. Essas informações foram baseadas em estudos com a administração de L-NOARG e/ou o L-NAME, que produziram uma significativa redução, dependente da dose, na ingestão do álcool (Rezvani *et al.*, 1995; Calapai *et al.*, 1996). Por fim, a L-NOARG também foi eficaz em prevenir o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo álcool, enquanto um excesso do substrato L-arginina reverteu as ações inibitórias da L-nitro-arginina relacionadas àquelas respostas (Khanna *et al.*, 1993; 1995).

Quando se considera que o consumo excessivo de álcool ocorre por longo tempo, sabe-se que podem ocorrer mudanças comportamentais, estruturais e funcionais no cérebro, afetando inúmeras regiões, incluindo o cerebelo (Walker *et al.*, 1981; Popp *et al.*, 1999) e hipocampo (Freund e Anderson, 1999). O cerebelo, que sofre alterações pela exposição ao álcool durante o desenvolvimento e na fase adulta, tem a mais alta concentração de NOS (Bredt *et al.*, 1990b). Em ratos, a maior atividade da NOSn está presente no cerebelo (Matsumoto *et al.*, 1993), entretanto, entre as áreas do cérebro, onde uma alta atividade da NOS é também observada e parece ser influenciada pela ação do

álcool é o hipocampo (Lancaster, 1992). Embora a ligação entre tratamento agudo e crônico de álcool e a atividade da NOS no hipocampo não esteja clara, é possível que os receptores NMDA tenham uma participação nessas interações.

II. HIPÓTESES

Duas são as hipóteses que estão envolvidas neste estudo:

CAPÍTULO 1 – Diferentes mecanismos de ação parecem estar envolvidos com as respostas comportamentais de ansiedade. Componentes das vias nitrérgicas e os receptores NMDA parecem constituir importantes fatores relacionados ao efeito ansiolítico do álcool.

Uma diversidade de informações contraditórias envolvem as vias nitrérgicas com os efeitos produzidos pelo etanol ou relacionados com o comportamento de ansiedade. Alguns trabalhos mostram que inibindo-se a NOS, o efeito ansiolítico de determinadas drogas pode ser bloqueado, sugerindo que o NO possa mediar os efeitos de alguns ansiolíticos. Outros resultados mostram que os inibidores da NOS podem, *per se*, apresentar efeito ansiolítico, indicando ser o NO uma substância ansiogênica. Estudos mostram também que os receptores NMDA exercem grande influência na maior parte dos efeitos produzidos pelo etanol, em humanos e em animais experimentais. Levando-se em consideração vários resultados experimentais obtidos *in vivo* e *in vitro*, nossa hipótese é de que o álcool apresenta efeito ansiolítico, e que este pode ser modulado por componentes envolvendo as vias nitrérgicas. Pode-se supor que a ação ansiolítica produzida pelo etanol é em decorrência dessa interação entre os receptores NMDA e NO.

HIPÓTESES

CAPÍTULO 2 - A exposição de longa duração ao álcool altera a expressão das subunidades dos receptores NMDA, AMPA e Kainato hipocampais.

A inibição crônica de neurotransmissores excitatórios frequentemente resulta em um aumento na regulação das funções de seus receptores (Tsai e Coyle, 1998). Os receptores NMDA, por exemplo, são inibidos agudamente pelo etanol. Após prolongada exposição ao álcool, a expressão de algumas subunidades desses receptores é aumentada como um mecanismo compensatório. É possível que, além dos NMDA, os receptores AMPA e Kainato hipocampais apresentem um aumento compensatório em suas expressões durante a exposição crônica ao etanol. Além disso, visto que estudos *in vitro* mostram que pode existir uma interação entre os receptores NMDA e NO, então é de supor que uma alteração na expressão da enzima NOS também possa ocorrer em resposta ao tratamento de longa duração ao etanol.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Para testar as nossas hipóteses, tínhamos os seguintes objetivos:

1. Estudar os efeitos de agonistas e antagonista das vias nitrérgicas no efeito ansiolítico do etanol.
2. Estudar a interação entre o NO e os receptores NMDA na resposta comportamental de ansiedade, em ratos tratados com etanol e testados no labirinto em cruz elevado.
3. Determinar se a exposição de longa duração ao etanol e a abstinência a esta droga resultam em uma mudança na expressão das subunidades dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA, AMPA e Kainato, assim como da NOS no hipocampo de ratos, fazendo-se uso da técnica de *Western Blot*.

CAPÍTULO I

PAPEL DAS VIAS NITRÉRGICAS E DOS RECEPTORES NMDA NO EFEITO ANSIOLÍTICO DO ETANOL

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras evidências indicam que o NO age como um neuromodulador e mensageiro intercelular e retrógrado que medeia várias funções no SNC (Palmer *et al.*, 1988; Moncada *et al.*, 1991; Zhuo *et al.*, 1993; Schuman e Madison, 1994). Por exemplo, o NO exerce um papel importante na regulação de um número de processos fisiológicos, fisiopatológicos e comportamentais, tais como plasticidade sináptica (O'Dell *et al.*, 1991), neurotoxicidade (Dawson, 1995; Ikeda *et al.*, 1999; Sattler *et al.*, 1999) e ansiedade (Caton *et al.*, 1994; Guimarães *et al.*, 1994; De Oliveira *et al.*, 1997; Volke *et al.*, 1997). Conforme já mencionado, o NO é formado a partir do aminoácido L-arginina, pela NOS, a qual existe em 3 isoformas: endotelial, induzida e neuronal (Förstermann *et al.*, 1994). A maioria dos estudos indica que a GC, enzima que catalisa a formação do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), é ativada pelo NO no cérebro (Bredt e Snyder, 1990a; East e Garthwaite, 1991; Garthwaite, 1991; Southam e Garthwaite, 1993; Dawson e Snyder, 1994). Esta via dependente da GC-GMPc provavelmente é o maior efetor das ações do NO no SNC.

Os efeitos do etanol nas vias nitrérgicas neuronais têm sido foco de recentes pesquisas. A maioria destes estudos têm se concentrado nas ações da exposição crônica àquela droga e têm tido resultados conflitantes em alguns casos. O tratamento crônico tem mostrado aumentar seletivamente a formação de NO no cerebelo de ratos (Xia *et al.*, 1999) e também em culturas de neurônios corticais (Chandler *et al.*, 1997). Ao contrário, a atividade da NOS nas camadas superficiais dos colículos superiores diminuiu após o consumo crônico do etanol (Zima *et al.*, 1998). Foi relatado recentemente que a estimulação das vias dependentes do GMPc protege os grânulos neuronais do cerebelo

contra a neurotoxicidade induzida pelo etanol (Pantazis *et al.*, 1998). Têm sido mostrado que as vias nitrérgicas também interferem nas ações *in vivo* do etanol. Demonstrou-se que a inibição da NOS bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol (Khanna *et al.*, 1993, 1995; Morato e Khanna, 1996) e reduziu os sinais da síndrome de abstinência ao álcool (Uzbay *et al.*, 1997). Visto que o NO se encontra distribuído pelo cérebro como um todo, a interação com os mais diversos sistemas de neurotransmissores, entre eles os receptores NMDA, pode ocorrer (Choi *et al.*, 2000). A proposta deste estudo foi examinar o papel das vias nitrérgicas, dos receptores NMDA e da interação entre estes dois sistemas na ação ansiolítica do etanol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

a) Animais

Um total de 320 ratos machos Wistar com 4 meses de idade foram obtidos do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram alojados em grupos de 8 por caixa, com livre acesso à água e ração, em condições laboratoriais, em temperatura constante de $23 \pm 1^\circ \text{C}$ e ciclo de luz claro/escuro de 12h (6:00 às 18:00h). O presente estudo procurou seguir algumas das recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institutes of Health (NIH), dos Estados Unidos.

b) Drogas

O etanol e hidrato de cloral foram provenientes da Merck (Hawthorne, NY, USA). O etanol (concentração de 14% p/v) foi preparado fazendo-se uso de 0,15 M de NaCl. 7-Nitroindazol (7-NI); 3',5'-monofosfato sódico de 8-bromoguanosina cíclico (8-Bromo-GMPc) e D-cicloserina (DCS) foram obtidos da Research Biochemicals International (Natick, MA, USA). Pentobarbital sódico, da Abbott Laboratory (São Paulo, Brasil). Propilenoglicol, nitroprussiato de sódio (SNP), dimetil sulfóxido (DMSO), hidróxido de sódio (NaOH), monolaurato de polietileno sorbitano (Tween 20), cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA). S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) foi sintetizado (Field *et al.*, 1978) e doado pelo Dr. J. Assreuy (Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil). As drogas ou seus veículos foram injetados por via intraperitoneal ou na região temporal do hipocampo. As doses e os tempos de tratamento foram selecionados através da literatura e/ou experimentos preliminares.

c) Labirinto em cruz elevado e arena

O equipamento foi feito em madeira, em forma de cruz, elevado 50 cm do chão (Handley e Mithani, 1984), com dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois fechados (50 x 10 x 40 cm), opostos entre si. Para minimizar a queda dos animais nos braços abertos, estes foram circundados com uma proteção em acrílico com 1 cm de altura. O equipamento foi colocado em uma sala parcialmente iluminada (44 lux). A arena em madeira (60 x 60 x 35 cm) foi utilizada principalmente para aumentar a atividade exploratória e adaptação dos animais ao ambiente do teste. O efeito ansiolítico foi definido por um aumento na proporção das entradas nos braços abertos e no tempo de exploração naqueles braços, relativo ao número total de entradas em ambos os braços e também ao tempo total experimental. Uma diminuição naqueles parâmetros foi considerado indicativo de um efeito ansiogênico (Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987). Uma redução no número de entradas nos braços fechados foi indicativo de efeito sedativo.

d) Cirurgia e métodos de microinjeção

Ratos foram adaptados em um estereotáxico para implantação de cânulas intrahipocampus unilaterais, sob anestesia de Equitesin[®]. Este anestésico foi preparado misturando-se vigorosamente duas soluções. A solução A continha hidrato de cloral (8,5 g), MgSO₄.7H₂O (4,252 g) e H₂O (91,40 ml). A solução B continha pentobarbital sódico (1,94 g), etanol (13,0 ml) e propilenoglicol (85,6 ml). O volume injetado foi 0,3 ml/100 g do peso corporal de cada animal. As coordenadas para a implantação da cânula guia foram 5 mm posterior ao bregma (AP -5mm); 5 mm lateral a linha mediana (ML ±5 mm) e 6 mm a partir da superfície ventral do crânio (DV -6 mm). Em um estudo preliminar verificou-se que não houve diferenças com as drogas administradas em animais

implantados com cânulas no lado esquerdo ou direito. Por isso, em cada estudo metade dos animais foi implantada com cânulas no lado esquerdo e outra parte no lado direito.

e) Cânulas

Foram preparadas cânulas-guias de 10 mm de comprimento, feitas a partir de agulhas descartáveis 25x7. As cânulas foram ancoradas à calota craniana com parafusos de aço inoxidável e cimento de acrílico. Um fio de aço foi introduzido nas cânulas-guias para prevenir a obstrução. Após à implantação das cânulas, os ratos permaneciam pelo menos de 5-7 dias para recuperação cirúrgica. Para as microinjeções das drogas, foram utilizadas agulhas de 12 mm de comprimento (2 mm mais longas que as cânulas-guias), 0,3 mm de diâmetro, adaptadas de agulhas odontológicas, conectadas a microseringas (Hamilton), por tubo de polietileno. Para nos certificarmos do fluxo de injeção da droga, uma bolha de ar foi produzida dentro do tubo de polietileno adaptado à microseringa.

f) Histologia

Após o testes comportamentais, cada animal foi novamente anestesiado com Equitesin® e perfundido transcárdiacamente com NaCl 0,9% seguido da solução de formalina 10%. Uma microinjeção de 0,5 µl de azul de Evans foi aplicada através da cânula-guia para marcar exatamente a localização das microinjeções. Os cérebros foram removidos e mantidos em solução de formalina a 10% por cerca de 5 dias. Os cortes cerebrais (10 µm) foram obtidos usando um micrótomo de congelação, sendo em seguida colocados em lâminas para posteriores análises. Os sítios de injeção foram verificados histologicamente sob um microscópio óptico, de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (1997).

g) Procedimentos experimentais

Administração intraperitoneal

Dois grupos de 40 ratos foram injetados intraperitonealmente com 7-NI (6 mg/kg) ou salina. Após 30 minutos, cada grupo foi dividido em 4 subgrupos que receberam intraperitonealmente etanol (1,0 ou 1,2 g/kg, 14% p/v) ou salina. Outros dois grupos de 40 animais foram pré-tratados com DCS (9 mg/kg I.P) ou salina. Metade dos animais em cada grupo recebeu, contralateralmente, injeções de 7-NI (6 mg/kg I.P) ou salina. O etanol (1,0 g/kg I.P) foi administrado 30 min após o pré-tratamento com DCS/7-NI.

Administração intrahipocampal

Neste experimento, cânulas foram estereotaxicamente implantadas na região temporal do hipocampo (AP -5mm; ML \pm 5mm; DV -6mm) de ratos anestesiados com Equitesin[®] conforme descrito anteriormente. Esta região do hipocampo envolve as áreas CA1, CA3 e giro denteado. Após um período de 5-7 dias, dois grupos de 20 animais foram intraperitonealmente injetados com etanol (1,0 g/kg, 14% p/v) ou salina. Dez minutos mais tarde, eles receberam, intrahipocampalmente, 0,5 μ l de 7-NI (20 nmol). Para as injeções intrahipocampais, o 7-NI foi dissolvido em salina fosfatada tamponada (PBS) contendo 20% DMSO, 50 mM NaOH, e 16% Tween-20. Uma solução idêntica que não continha 7-NI foi usada como controle.

Em uma outra etapa seguinte, 40 ratos receberam injeções de salina, enquanto 60 outros animais receberam injeções de etanol (1,2 g/kg, 14% p/v, IP). Após 10 minutos, cada grupo foi dividido para receber um dos seguintes tratamentos: 8-Bromo-GMPc (20 ou 40 nmol), SNAP (20 ou 40 nmol), SNP (20 ou 40 nmol). Para os experimentos com DCS (2 e 20 nmol/ μ L) foram utilizados dois grupos com 40 animais.

Análise comportamental

O comportamento foi analisado no teste do labirinto em cruz elevado 5 ou 15 min após as injeções intrahipocâmpais ou intraperitoneais, respectivamente. Cada animal foi colocado na arena por 5 minutos. Em seguida, cada rato foi transferido para o centro do equipamento, com a face voltada para um dos braços fechados, e colocado para explorar o equipamento por um período de 5 minutos. Um observador fazia as anotações do número de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos/fechados. Após observar cada animal, o labirinto era limpo com álcool 10% (v/v). A percentagem de entradas e a percentagem de tempo de exploração nos braços abertos foram calculadas respectivamente em relação ao número total de entradas nos dois braços e em relação ao tempo total experimental.

h) Análise estatística

Os dados foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) com variáveis independentes (pré-tratamento e tratamento) e com variáveis dependentes (percentagem de entradas nos braços abertos, percentagem de tempo nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados). A comparação múltipla *post hoc* foi realizada através do teste da Menor Diferença Significativa (do inglês *Least Significant Difference* - LSD). O nível de significância foi de 5%.

3. RESULTADOS

a) Efeitos da administração intraperitoneal do 7-NI no comportamento de ratos tratados com etanol

A injeção intraperitoneal de um inibidor competitivo de NOS, 7-NI (6 mg/kg), aumentou a percentagem de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, em animais injetados com 1,0 g/kg de etanol (Figura 2A-B). Quando administrada isoladamente, a mesma dose de etanol não foi capaz de induzir efeito ansiolítico. A ANOVA de duas vias revelou que o 7-NI aumentou significativamente a percentagem de entradas nos braços abertos [tratamento: $F_{(1,36)}= 11,81$; $p<0,01$ e interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)}= 6,99$; $p<0,05$] e a percentagem de tempo de exploração naqueles braços [tratamento: $F_{(1,36)}= 10,91$; $p<0,01$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)}= 4,36$; $p<0,05$]. A administração de uma dose maior de etanol (1,2 g/kg, I.P) produziu efeito ansiolítico de magnitude similar àquela produzida pela associação de 1,0 g/kg etanol com o 7-NI (Figura 2D-E). Entretanto, a co-administração de 7-NI com 1,2 g/kg de etanol produziu um efeito sedativo, como indicado pela redução no número de entradas nos braços fechados [tratamento: $F_{(1,36)}= 10,15$; $p<0,01$] (Figura 2F). Deve ser enfatizado que a injeção de 7-NI isoladamente, não promoveu nenhum efeito na percentagem de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do labirinto, assim como nos braços fechados.

b) Efeitos da administração intrahipocampal de 7-NI no comportamento de ratos tratados com etanol

Foram testados os efeitos da administração intrahipocampal de 7-NI sobre a ansiólise induzida pelo etanol. As respostas destes experimentos foram similares aquelas observadas após administração intraperitoneal (Figura 3A-B). Quando dado 10 min após a administração de etanol, o 7-NI aumentou significativamente a percentagem de entradas nos braços abertos [pré-tratamento: $F_{(1,36)}= 9,26$; $p<0,01$; tratamento: $F_{(1,36)}= 8,29$; $p<0,01$] e a percentagem do tempo de exploração nos braços abertos [pré-tratamento: $F_{(1,36)}= 23,47$; $p<0,01$; tratamento: $F_{(1,36)}= 10,97$; $p<0,01$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)}= 4,60$; $p<0,05$]. A administração isolada de 7-NI pela via intrahipocampal ou em combinação com o etanol (1,0 g/kg) não afetou o número de entradas nos braços fechados (Figura 3C).

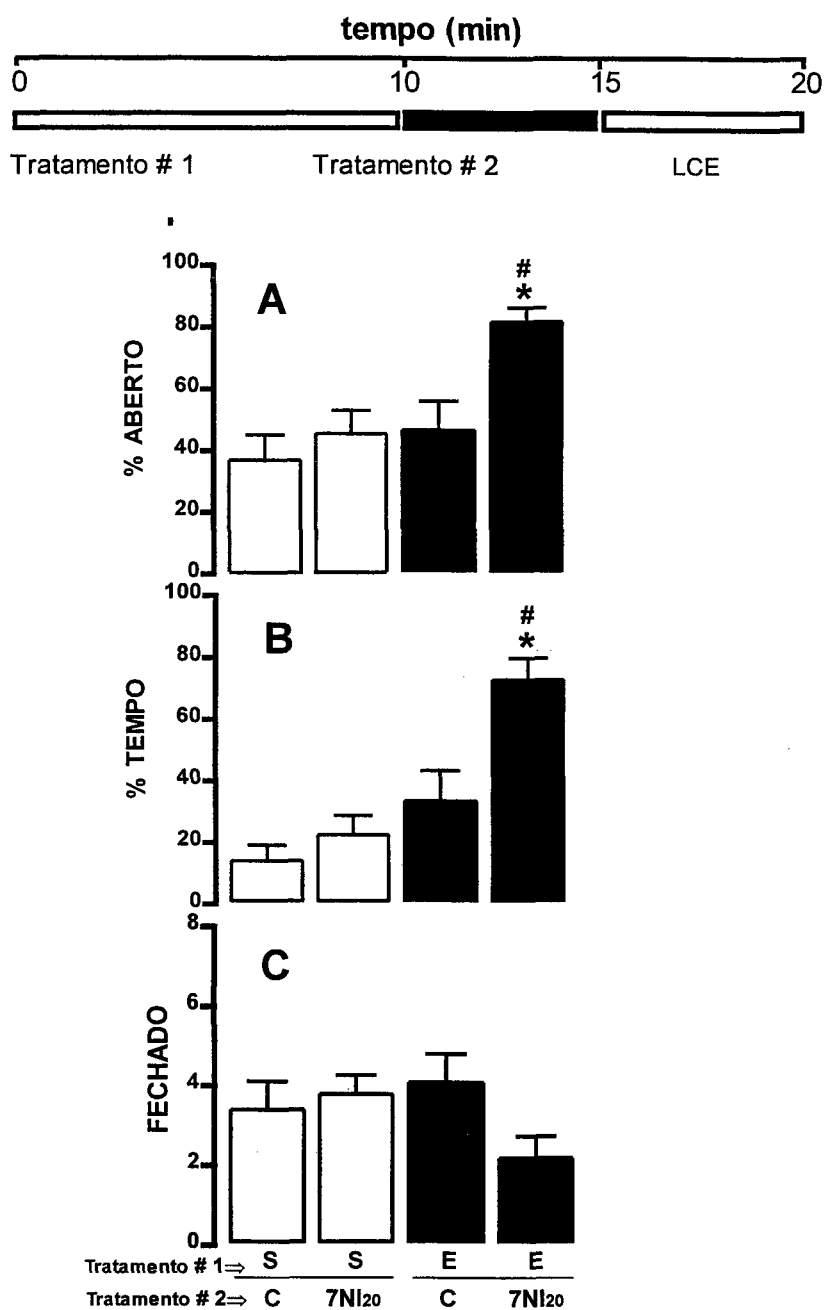


Figura 3 – *Tratamento 1*: ratos foram injetados I.P. com salina (S) ou 1,0 g/kg de etanol (E). *Tratamento 2*: 10 min após o tratamento 1, foram injetados intrahipocampalmente com veículos-controles (C) ou 20 nmol de 7-NI (7NI₂₀). Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min antes de testá-los no labirinto em cruz elevado por 5 min. O painel A representa a percentagem de entradas nos braços abertos. O painel B mostra a percentagem do tempo de exploração nos braços abertos. O painel C, o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média ± epm de 10 animais. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos animais controles, injetados com salina + 7-NI (S/7NI₂₀). # $p < 0,05$ comparado aos ratos tratados com etanol + veículo-controle (E/C).

c) Efeitos de doadores de NO no comportamento de ratos tratados com etanol.

A administração intrahipocampal de doadores de NO, SNAP e SNP, impediu o efeito ansiolítico induzido pelo etanol (1,2 g/kg, I.P) (Figura 4A-B). O SNAP e o SNP diminuíram significativamente o aumento na percentagem de entradas nos braços abertos induzido pelo etanol (1,2 g/kg) [tratamento $F_{(4,40)}= 4,39$; $p<0,01$] e a percentagem do tempo de exploração nos braços abertos [tratamento $F_{(4,40)}= 3,48$; $p<0,05$]. Quando administrados isoladamente, tanto SNAP (20 ou 40 nmol) quanto SNP (20 nmol) não afetaram a percentagem de entradas e o tempo de exploração nos braços abertos, assim como o número de entradas nos braços fechados (Figura 4A-C). A dose maior de SNP (40 nmol) quando associada ao etanol, produziu um efeito ansiogênico, visto que causou uma diminuição na percentagem de entradas nos braços abertos e na percentagem do tempo de exploração naqueles braços em relação aos animais controles (Figura 4A-B)

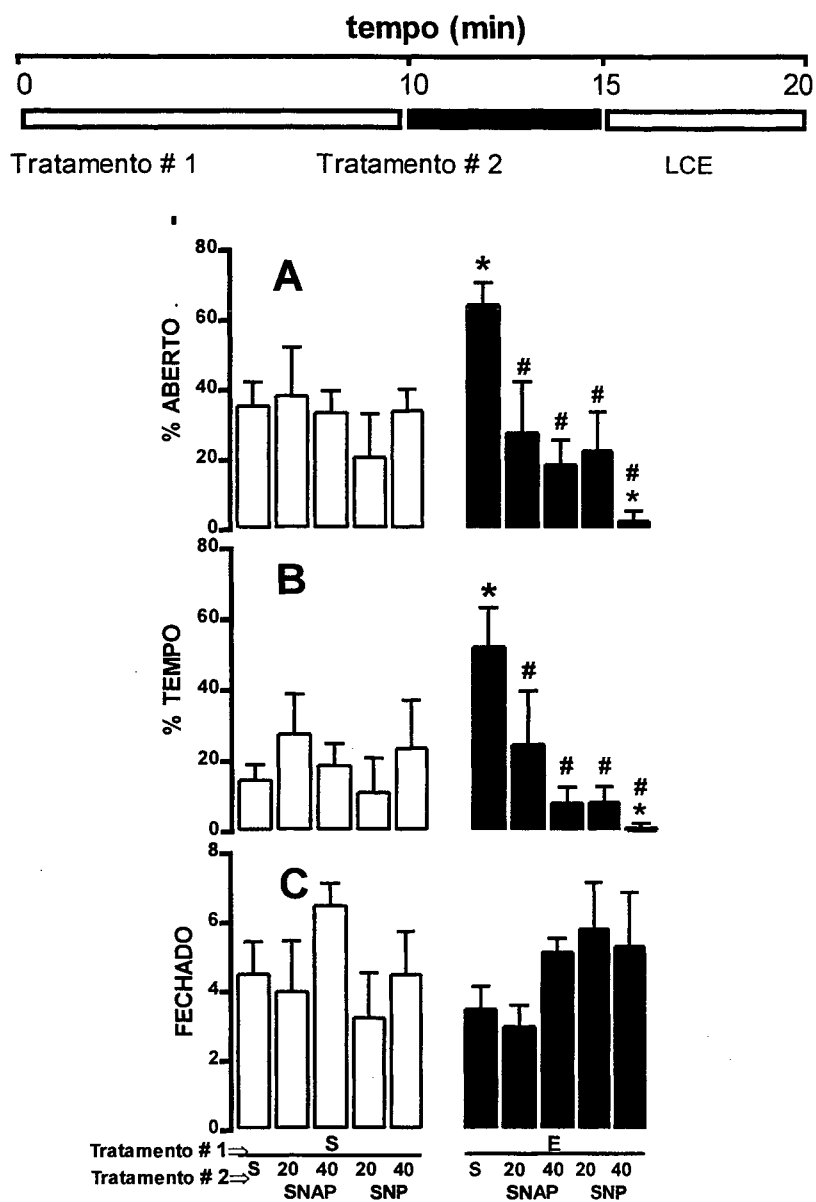


Figura 4 – *Tratamento 1*: ratos foram injetados I.P. com salina (S) ou 1,2 g/kg de etanol (E). *Tratamento 2*: 10 min após o tratamento 1, salina (S) ou SNAP (20 ou 40 nmol) ou SNP (20 ou 40 nmol) foram administrados por via intrahipocampal. Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min antes de testá-los no labirinto em cruz elevado por 5 min. Os painéis A, B e C representam a percentagem de entradas nos braços abertos, a percentagem do tempo de exploração nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados, respectivamente. Cada valor representa a média \pm epm de 4 (controles) e 6 (SNAP e SNP) animais. * $p < 0,05$ comparados aos respectivos animais controles, injetados com salina + salina (S/S) ou salina + SNP 40 nmol (S/SNP₄₀). # $p < 0,05$ comparado aos ratos tratados com etanol + salina (E/S).

d) Efeitos do 8-Bromo-GMPc no efeito ansiolítico do etanol

A administração intrahipocampal de 8-Bromo-GMPc (40 nmol) 10 min após a injeção intraperitoneal de etanol (1,2 g/kg) resultou em uma diminuição significativa no efeito ansiolítico induzido por esta dose de etanol. Observou-se que o 8-Bromo-GMPc reduziu significativamente o aumento na percentagem de entradas nos braços abertos induzido pelo etanol (1,2 g/kg) [pré-tratamento: $F_{(1,24)}= 11,32$; $p<0,01$; tratamento: $F_{(2,24)}= 8,29$; $p<0,01$] e a percentagem do tempo de exploração nos braços abertos [pré-tratamento: $F_{(1,24)}= 12,34$; $p<0,01$; tratamento: $F_{(2,24)}= 4,61$; $p<0,05$]. O 8-Bromo-GMPc *per se*, não teve efeito na percentagem de entradas nos braços abertos e nem na percentagem do tempo de exploração naqueles braços (Figura 5A-B). Quando administrado isoladamente ou em combinação com o etanol, o 8-Bromo-GMPc não afetou o número de entradas nos braços fechados (Figura 5C), sugerindo que esta droga não alterou a atividade locomotora dos animais.

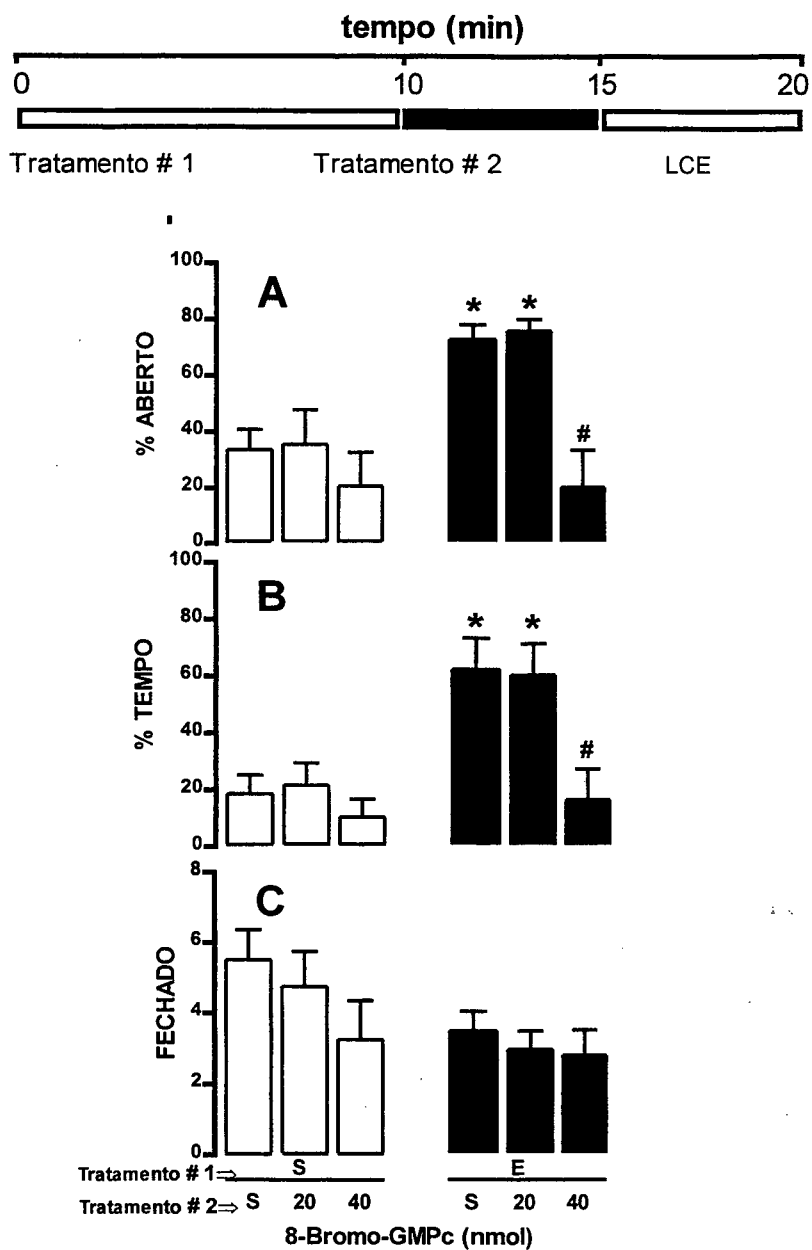


Figura 5 – *Tratamento 1*: ratos foram injetados I.P. com salina (S) ou 1,2 g/kg etanol (E). *Tratamento 2*: 10 min após o tratamento 1, salina (S) ou 8-Bromo-GMPc (20 ou 40 nmol) foram administrados por via intrahipocampal. Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min antes de testá-los no labirinto em cruz elevado por 5 min. O painel A representa a percentagem de entradas nos braços abertos. O painel B mostra a percentagem do tempo de exploração nos braços abertos. O painel C, o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média \pm epm de 4 (controles) e 6 (8-Bromo-GMPc) animais. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos animais controles, injetados com salina + salina (S/S) ou salina + 8-Bromo-GMPc 20nmol (S/8-Bromo-GMPc₂₀). # $p < 0,05$ comparados aos ratos tratados com etanol + salina (E/S).

e) Efeitos da DCS hipocampal no efeito ansiolítico do etanol

Injeção intrahipocampal de agonista do sítio da GLY nos complexos receptores NMDA reduziu a percentagem de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, em animais injetados com 1,2 g/kg de etanol (Figura 6). A ANOVA de duas vias revelou que houve uma redução significativa na *percentagem de entradas nos braços abertos*, quando foi feito o uso de DCS nas doses de 2 [DCS: pré-tratamento: $F_{(1,36)}= 9,11$; $p<0,01$; tratamento: $F_{(1,36)}= 11,95$; $p<0,01$ e interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)}= 4,70$; $p<0,05$] e 20 nmol [DCS: interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)}= 8,05$; $p<0,01$], conforme demonstrado pela figura 6 (painéis A-D). A ANOVA também revelou uma redução na *percentagem do tempo de exploração nos braços abertos* nas doses de 2 [DCS: pré-tratamento: $F_{(1,36)}= 20,48$; $p<0,01$; tratamento: $F_{(1,36)}= 40,21$; $p<0,01$ e interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)}= 19,46$; $p<0,01$] e 20 nmol [DCS: interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)}= 9,43$; $p<0,01$. GLY: pré-tratamento: $F_{(1,36)}= 7,33$; $p<0,01$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(1,36)}= 9,13$; $p<0,01$] (Figura 6, painéis B-E). As doses de DCS, *per se*, utilizadas nesses experimentos, não afetaram o comportamento dos animais. A administração intrahipocampal dessa droga sozinha ou em combinação com o etanol (1,2 g/kg) não afetou o número de entradas nos braços fechados (Figura 6, painéis C e F).

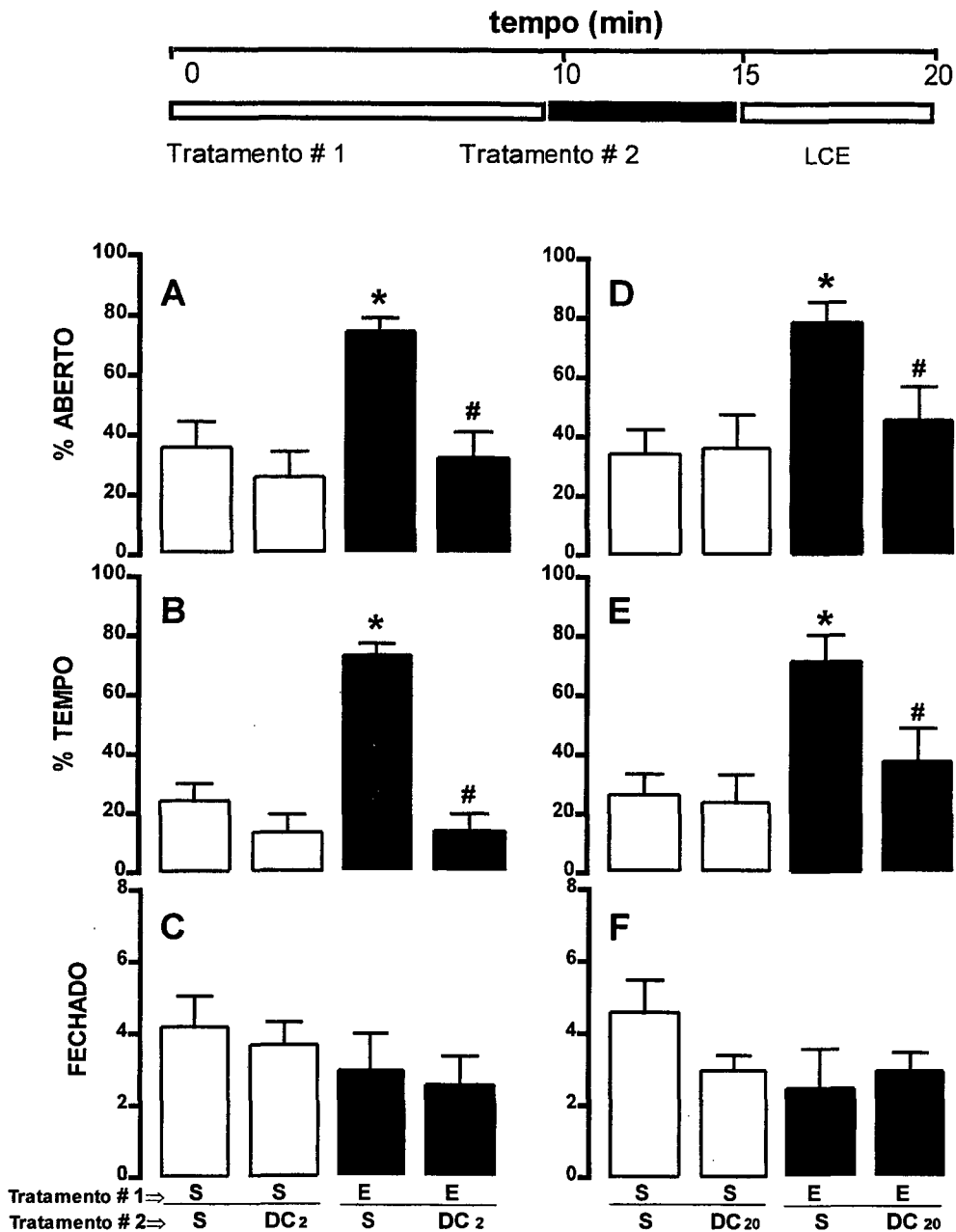


Figura 6 – *Tratamento 1*: ratos foram injetados I.P. com salina (S) ou 1,2 g/kg de etanol (E). *Tratamento 2*: 10 min após o tratamento 1, ratos foram injetados intrahipocampalmente com salina (S) ou 2 ou 20 nmol de DCS (DC₂ ou DC₂₀). Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min antes de testá-los no labirinto em cruz elevado por mais 5 min. Os painéis A e D representam a percentagem de entradas nos braços abertos. Os painéis B e E mostram a percentagem do tempo de exploração nos braços abertos. Os painéis C e F representam o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média ± epm de 10 animais. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos animais controles, injetados com salina + salina (S/S). # $p < 0,05$ comparado aos ratos tratados com etanol + salina (E/S).

f) Efeitos da DCS sobre as respostas comportamentais de ratos tratados com etanol e 7-NI

A DCS administrada concomitantemente com 7-NI, 30 min antes da injeção intraperitoneal de etanol (1,0 g/kg) impediu a indução do efeito ansiolítico do etanol. A DCS reduziu significativamente o aumento na percentagem de entradas nos braços abertos [Figura 7A - interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(3,72)}= 4,83$; $p<0,01$] e a percentagem de tempo de exploração nos braços abertos [Figura 7B - tratamento: $F_{(1,72)}= 4,85$; $p<0,05$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(3,72)}= 5,05$; $p<0,01$]. Todas as drogas *per se*, não interferiram com a percentagem de entradas e com o tempo de exploração nos braços abertos (Figuras 7A e 7B), assim como todos os tratamentos também não afetaram o número de entradas nos braços fechados (Figura 7C).

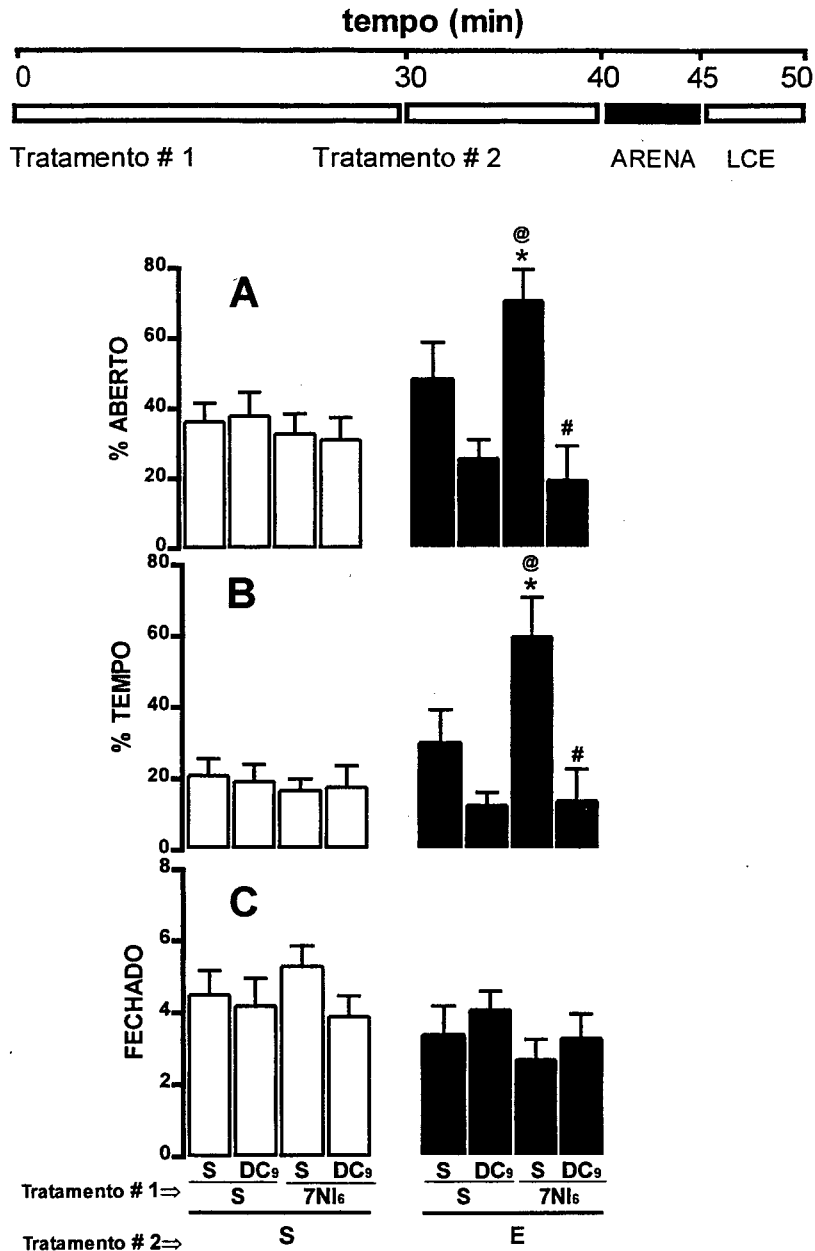


Figura 7 – *Tratamento 1*: ratos foram injetados I.P. com salina + salina (S/S), 9 mg/kg de DCS + salina (DC₉/S), salina + 6 mg/kg de 7-NI (S/7NI₆) ou 9 mg/kg de DCS + 6 mg/kg de 7-NI (DC₉/7NI₆). *Tratamento 2*: 30 min após o tratamento 1, os ratos foram injetados com salina (S) ou 1,0 g/kg de etanol (E). Esperado 10 minutos, os animais foram então colocados individualmente em uma arena por 5 min antes de testá-los no labirinto em cruz elevado por mais 5 min. O painel A representa a percentagem de entradas nos braços abertos. O painel B mostra a percentagem do tempo de exploração nos braços abertos. O painel C representa o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média ± epm de 10 animais. *p<0.05 comparado aos respectivos animais controles, injetados com salina + 7-NI + salina (S/7NI₆/S). @ p<0,05 comparado aos animais tratados com salina + salina + etanol (S/S/E). #p<0,05 comparado aos ratos tratados com salina + 7-NI + E (S/7NI₆/E).

4. DISCUSSÃO

O papel do NO hipocampal na regulação do comportamento ansiolítico induzido pelo etanol foi verificado. Escolheu-se estudar a formação hipocampal visto que foi mostrado previamente que esta estrutura medeia, em parte, comportamentos ligados a ansiedade (Menard e Treit, 1998, 1999; File *et al.*, 1998a, b; Gonzalez *et al.*, 1998a, b; Ouagazzal *et al.*, 1999) e que é afetada pela exposição aguda ao etanol (Ryabinin, 1998). Os resultados mostraram que componentes que regulam as vias nitrérgicas, alteram o efeito ansiolítico produzido pelo tratamento com etanol em ratos *in vivo*. Foi observado que esses componentes não têm um efeito quando administrados sozinhos.

A produção de NO foi bloqueada com 7-NI, um inibidor das isoformas endotelial e neuronal da NOS (Babbedge *et al.*, 1993). Dado 30 minutos antes do etanol, o qual é tempo suficiente para produzir inibição máxima da NOS (MacKenzie *et al.*, 1994), foi observado que o 7-NI aumentou o efeito ansiolítico produzido por uma dose sub-efetiva de etanol (1,0 g/kg), caracterizado pelo aumento na percentagem de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Um efeito similar do 7-NI sobre a ansiólise induzida pela droga psicoativa foi observado quando este inibidor da NOS foi administrado intrahipocampalmente. Os resultados desses experimentos com injeções intrahipocampais de 7-NI indicam que os efeitos deste componente são provavelmente devido às suas ações no SNC. Além disso, esses resultados indicam que o 7-NI aumenta a eficácia do etanol para produzir efeito ansiolítico.

Procurou-se estudar, também, os efeitos da associação de uma dose intraperitoneal de 1,2 g/kg etanol que, *per se*, produz efeito ansiolítico em ratos (Ferreira e Morato, 1996, 1997) com um inibidor da NOS. A co-administração de 7-NI potenciou os efeitos daquela

droga. Na presença de 7-NI, a administração de 1,2 g/kg de etanol produziu efeito sedativo, demonstrado pela redução no número de entradas nos braços fechados. Esses dados estão também em concordância com o postulado de que a inibição das vias nitrérgicas aumenta a eficácia daquela droga. Enfatizamos, entretanto, que os efeitos do 7-NI provavelmente não são devidos a uma mudança no metabolismo do etanol. Foi recentemente determinado que a administração intraperitoneal de 7-NI, em doses muito maiores àquelas usadas em nosso estudo, não afeta a eliminação do etanol em ratos Wistar (Vassiljev *et al.*, 1998).

Foi feita a exposição dos ratos com análogo do GMPc, o 8-Bromo-GMPc, e com doadores de NO, SNAP ou SNP, para avaliar se a estimulação das vias nitrérgicas podia impedir o efeito ansiolítico induzido pelo etanol. Verificou-se que o 8-Bromo-GMPc (40 nmol), SNAP (20 e 40 nmol) e SNP (20 nmol) reduziram o número de entradas e a duração do tempo de exploração nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. A administração intrahipocampal de 40 nmol de SNP causou uma redução, abaixo dos níveis controles, na frequência de entradas e no tempo gasto nos braços abertos. Estes resultados sugerem que a co-administração de etanol e 40 nmol de SNP produz um efeito ansiogênico. Em conjunto, os resultados de nossos estudos com inibidor e estimuladores das vias nitrérgicas sugerem que as vias dependentes do NO se opõem ao efeito ansiolítico do etanol.

O envolvimento das vias nitrérgicas nos efeitos da exposição crônica ao etanol tem sido foco de recentes pesquisas (Chandler *et al.*, 1997; Uzbay *et al.*, 1997; Zima *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1999). Entretanto, os papéis dessas vias nos efeitos agudos são menos entendidos. Em um estudo recente foi demonstrado que a administração de 7-NI (20 mg/kg, I.P.), 30 min antes do etanol (4 g/kg, i.p.), aumentou a duração do tempo de sono. Além disso, a co-administração de 7-NI (40, 80 ou 120 mg/kg, I.P.) com uma dose

subhipnótica de etanol (2 g/kg), causou um efeito hipnótico nesses animais (Vassilijev *et al.*, 1998). Os resultados desses estudos suportam nossa conclusão de que a inibição das vias dependentes de NO aumenta a eficácia do etanol para produzir efeito ansiolítico e que as vias nitrérgicas opõem-se a essas ações.

Algumas sugestões podem ser feitas para explicar o mecanismo através do qual as vias nitrérgicas opõem-se ao efeito ansiolítico do etanol. Como mencionado antes, a GC, a qual catalisa a formação de GMPc, é o principal alvo do NO (Garthwaite, 1991; Schmidt *et al.*, 1993) e o GMPc parece exercer um papel no efeito ansiolítico produzido pelo etanol em ratos como mostrado por nossos estudos com 8-Bromo-GMPc. Então, é possível que as vias dependentes de GMPc e, talvez, outras cascatas dependentes do nucleotídeo cíclico sejam importantes fatores que determinam a sensibilidade dos neurônios aos efeitos agudos do etanol. Trabalho recente demonstrou que um caminho de sinalização intracelular está envolvido nos efeitos agudos induzidos pelo etanol em *Drosophila*. Foi relatado neste trabalho que as vias do AMPc opõem-se à perda do controle postural induzido por aquela droga naquelas moscas (Moore *et al.*, 1998). Além disso, testes comportamentais e eletrofisiológicos também mostraram que tanto a adenilato ciclase quanto o AMPc são importantes na determinação da sensibilidade do etanol em camundongos. Camundongos transgênicos, que expressam maior quantidade de adenilato ciclase do tipo VII, mostraram uma sensibilidade reduzida à ataxia, perda dos reflexos adequados, e supressão dos disparos dos neurônios de Purkinje induzida pelo etanol (Yoshimura *et al.*, 1999). Tomados em conjunto com nossos resultados, os dados daqueles estudos, onde a adenilato ciclase e as vias dependentes do AMPc têm sido manipuladas, sugerem que os caminhos dependentes dos nucleotídeos cíclicos opõem-se aos efeitos agudos do etanol.

Uma importante, mas desafiante questão para pesquisa futura é determinar o mecanismo pelo qual os caminhos dependentes dos nucleotídeos cíclicos diminuem a sensibilidade para aquela droga. Este mecanismo pode envolver a ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG). Esta quinase tem sido mostrada fosforilar um número de receptores membranares tais como os receptores GABA_A (Moss e Smart, 1996) os quais exercem papéis no mecanismo *in vivo* do efeito ansiolítico do etanol (Revisados por Eckardt *et al.*, 1998 e Mihic, 1999). Portanto, é possível que a sensibilidade para os efeitos agudos do etanol sobre os canais iônicos acoplados a ligantes e outros receptores membranares dependa da magnitude da fosforilação mediada por essas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos. Mais trabalhos vão ser necessários para estabelecer o preciso papel da fosforilação dependente de PKG do GABA_A e outras membranas e proteínas intracelulares sobre o mecanismo da intoxicação aguda do etanol.

Além disso, os resultados do estudo em questão foram também evidentes em mostrar que a DCS, quando injetada simultaneamente com o 7-NI, impediu o aumento nas entradas dos braços abertos e no tempo de permanência na exploração daqueles braços do labirinto em cruz elevado em animais injetados com etanol (1,0 g/kg). A idéia de se usar DCS (9 mg/kg) na reversão do efeito ansiolítico produzido pela associação do 7NI (6 mg/kg) com o etanol (1,0 g/kg) partiu de resultados prévios, onde aquela droga foi efetiva em bloquear o efeito ansiolítico produzido pela dose de 1,2 g/kg de etanol, quando injetada intraperitonealmente (Ferreira e Morato, 1996, 1997). Outro fator importante que cabe ser mencionado é quanto à dose utilizada nos experimentos. Alguns autores mostram que agonistas do sítio da GLY são capazes de produzir efeito ansiogênico (Schmitt *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1998; Teixeira e Carobrez, 1999). Em nossos experimentos procuramos utilizar uma dose que, *per se*, não interferisse no comportamento dos animais e que

quando associado com o etanol, não interferisse no nível alcoólico sanguíneo, segundo dados anteriores obtidos a partir de nosso laboratório (Ferreira e Morato, 1996, 1997).

Os resultados descritos anteriormente, envolvendo a participação dos sítios da GLY dos receptores NMDA, parecem ser consistentes com aqueles realizados em outras áreas do cérebro envolvidas com a ansiedade como por exemplo a SCPD. Ratos microinjetados com ácido 7-cloro-quinurênico ou HA-966, antagonista seletivo e agonista parcial do sítio modulatório da GLY, respectivamente, aumentaram a percentagem de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, quando comparados com os ratos controles que receberam salina isotônica (Matheus *et al.*, 1994). Entretanto, esses parâmetros indicativos de ansiedade, foram reduzidos quando a GLY e a D-SER foram microinjetadas na SCPD (Schmitt *et al.*, 1995). Um fato interessante nesta seqüência de estudos foi que a GLY quando administrada isoladamente na porção caudal da SCPD reduziu seletivamente os parâmetros indicativos de ansiedade, com os animais apresentando um comportamento do tipo ansiogênico (Teixeira e Carobrez, 1999). A resposta ansiogênica da GLY também foi consistente com os resultados anteriores publicados por De Souza *et al.* (1998). Tomados em conjunto todos esses dados, podemos dizer que a neurotransmissão mediada pelos sítios da GLY dos receptores NMDA na SCPD, assim como nos experimentos citados previamente por outras vias, pode estar relacionada com ansiedade, e onde o álcool parece agir.

Como observado anteriormente, o 7-NI administrado intraperitoneal e hipocampalmente, favoreceu o efeito ansiolítico produzido por uma dose sub-efetiva de etanol (1,0 g/kg), o que foi caracterizado pelo aumento na percentagem de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Esses resultados obtidos em decorrência da inibição da NOS, juntamente com os doadores de NO e análogo

do GMPc, no efeito ansiolítico do etanol mostraram a participação do NO nessa resposta neurocomportamental. Nós observamos com nossos atuais dados que a DCS pode interferir nas respostas do 7-NI com o etanol.

A dificuldade em se conciliar a administração concomitante de duas drogas com o mesmo tempo de ação através de uma única cânula intracerebral, fez com que os experimentos para verificar a interação entre os dois sistemas seguissem com o auxílio da administração intraperitoneal. Esta mudança de vias não descaracteriza o objetivo do trabalho, visto que toda uma padronização em termos das doses das drogas utilizadas foram anteriormente feita (Ferreira e Morato, 1996, 1997) e que nos deram segurança para seguir a hipótese levantada. Deixamos claro, entretanto, que não acreditamos ter ocorrido nenhuma interferência farmacocinética neste caso, visto que trabalhos anteriores onde foram utilizadas doses iguais ou superiores daquelas drogas, não observaram nenhuma interferência no *clearance* ou concentração sanguínea de etanol (Ferreira e Morato, 1996, 1997; Vassiljev *et al.*, 1998). Além disso, a DCS quando administrada diretamente na região do hipocampo, por intermédio de cânula implantada naquela região, foi capaz de impedir a aumentada percentagem de entradas e o aumentado tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado produzidos por 1,2 g/kg de etanol (Figura 6). Esses resultados confirmam dados encontrados na literatura mostrando que o sítio da GLY é importante na mediação dos efeitos produzidos pelo etanol (Harris, 1999; Popp *et al.*, 1999; Snell *et al.*, 2000).

Para descartar os prováveis efeitos hipertensivos indesejáveis, produzidos por outros inibidores da NOS, como o L-NAME por exemplo (Wang, 1995), neste trabalho procuramos utilizar apenas o 7-NI, que embora inibindo tanto as isoformas endotelial e neural da NOS *in vitro*, não causa o efeito vasopressor (Babbedge *et al.*, 1993). Outro fator

importante relacionado ao uso do 7-NI foi em decorrência desta droga não ter apresentado indícios de interação com os clássicos receptores GABAérgicos, conhecidos por também serem alvos de drogas com propriedades ansiolíticas (Mülsch *et al.*, 1994). Além disso, cuidados concernentes à dose utilizada foram também levados em consideração visto que em altas doses, capazes de produzir a inibição máxima da NOS, acabam por produzir efeito ansiolítico (Faria *et al.*, 1997; Volke *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 1998; Yildiz *et al.*, 2000).

Existe alguma interação entre o NO e os receptores NMDA que possam justificar as ações ansiolíticas do etanol? Há várias hipóteses sugerindo o sítio da GLY dos complexos receptores NMDA como o principal alvo de ação para vários efeitos mediados pelo etanol e comportamentos relacionados com a ansiedade. Acreditamos que, se essa interação realmente possa estar ocorrendo, os prováveis mecanismos envolvem uma ação do etanol no sítio da GLY, bem como de eventos nos mecanismos transduccionais de sinais, os quais podem estar desencadeando e interferindo em toda a cascata que envolve as vias nitrérgicas. O antagonismo do sítio da GLY pelo etanol pode estar reduzindo a quantidade de Ca^{++} através dos canais dos receptores NMDA, dificultando a ativação da NOS através da Ca^{++} -Calmodulina. Em decorrência disto, a produção de NO pode estar sendo prejudicada pela desativação da NOS. Outra idéia é que pode estar ocorrendo uma supressão na expressão da proteínas PSD-95 acoplada aos receptores NMDA, levando a uma redução da sinalização da molécula de NOS ou a administração de 7-NI, em conjunto com uma dose sub-efetiva de etanol, induz a inativação da NOS que favorece o efeito ansiolítico em ratos testados no labirinto em cruz elevado. Finalmente, uma última explicação é o fato de que os sítios da GLY nos complexos receptores NMDA, ainda que bloqueados pelo etanol, a administração exógena desses aminoácidos ou análogos podem ativar os receptores NMDA e impedir os eventos inicialmente sugeridos (Figura 8).

Entretanto, dada a complexidade do evento e a necessidade de experimentos com drogas mais específicas que deverão ser considerados, muito ainda tem a ser analisado.

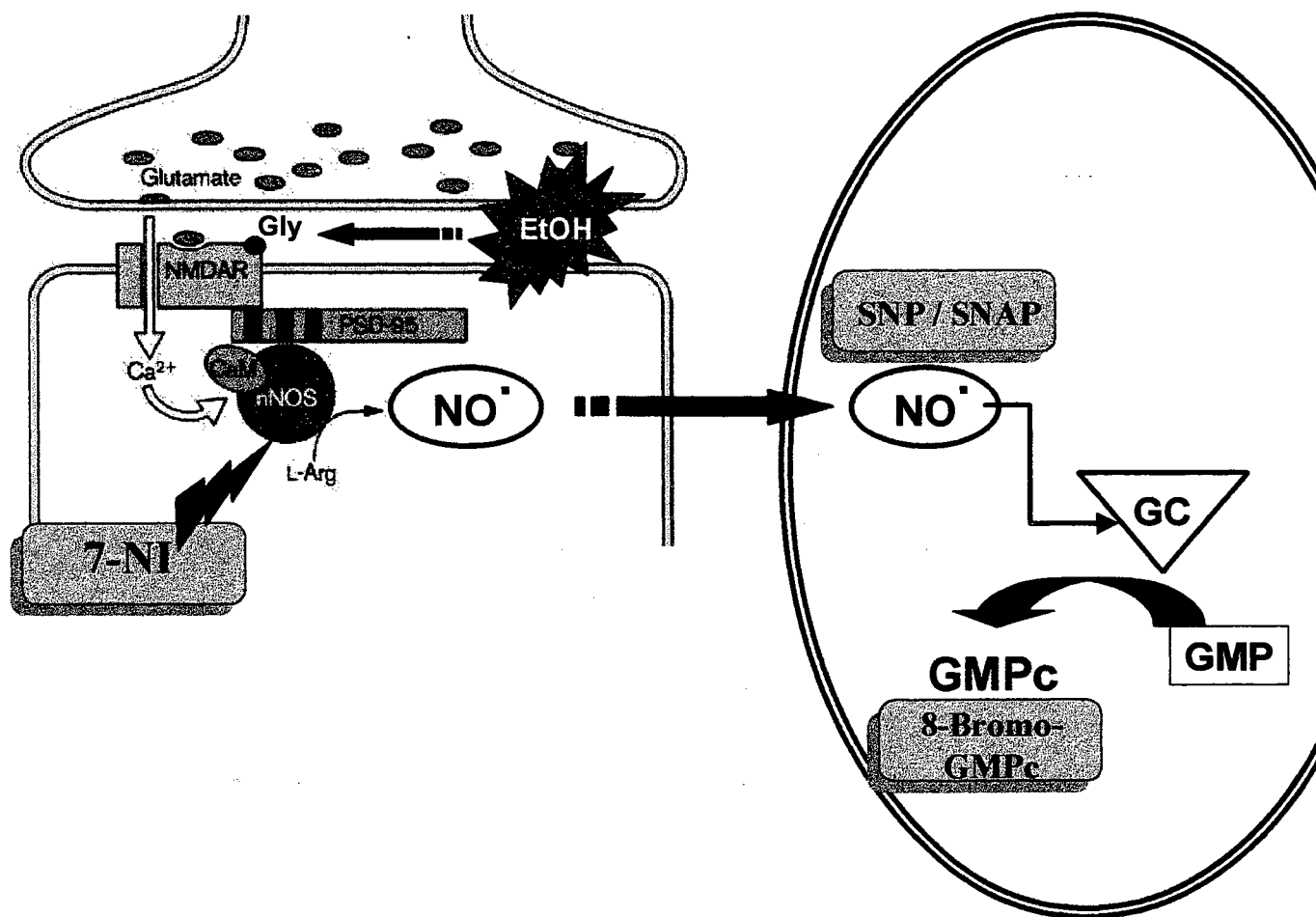


Figura 8 – Representação esquemática do provável mecanismo de ação envolvendo a interação NMDA e das vias do NO (Adaptado de Brenman e Bredt, 1997).

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

- 1) A inibição da NOS aumentou o efeito ansiolítico produzido por uma dose subefetiva de etanol (1,0 g/kg).
- 2) A coadministração de 7-NI não potenciou o efeito ansiolítico de uma dose efetiva de etanol (1,2 g/kg), mas os animais manifestaram-se comportamentalmente com um efeito sedativo.
- 3) O análogo de GMPc (8-Bromo-GMPc) e doadores de NO (SNAP e SNP) impediram o efeito ansiolítico do etanol.
- 4) A coadministração de etanol com 40 nmol de SNP produziu efeito ansiogênico nos animais tratados com 1,2 g/kg de etanol.
- 5) A influência modulatória da DCS, um agonista parcial do sítio da GLY dos receptores NMDA, é mais provavelmente mediada via uma ação central farmacodinâmica, visto que injeções intrahipocâmpais desta droga foi capaz de impedir o efeito ansiolítico do etanol.
- 6) Em conjunto, nossos resultados com inibidor e estimuladores das vias nitrérgicas indicam que estas vias opõem-se ao efeito ansiolítico do etanol . Além disso, sugere-se também que provavelmente possa existir uma interferência da DCS, agindo nos sítios da GLY, no efeito ansiolítico do etanol produzido pela inibição da NOS.

CAPÍTULO II

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE
LONGA DURAÇÃO AO ETANOL
NOS NÍVEIS PROTEICOS DAS
SUBUNIDADES DOS RECEPTORES
GLUTAMATÉRGICOS
IONOTRÓPICOS E SINTASES DO
ÓXIDO NÍTRICO HIPOCAMPAIS**

1. INTRODUÇÃO

A superfamília de canais iônicos acoplados ao glutamato medeia a maioria das transmissões excitatórias no SNC e é formada pelos receptores NMDA, AMPA e Kainato como foi detalhado na *Introdução Geral* deste trabalho. Foi mencionado também que múltiplas subunidades polipeptídicas têm sido identificadas para cada uma dessas subfamílias de receptores glutamatérgicos. Seis subunidades dos receptores NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D e NR3A), quatro subunidades dos receptores AMPA (GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4) e cinco subunidades dos receptores Kainato (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2) têm sido bem caracterizadas (Ozawa *et al.*, 1998; Dingledine *et al.*, 1999). Três exons de RNA podem ser diferencialmente clivados, os quais codificam uma seqüência de 21-38 aminoácidos localizados no domínio N-terminal (denominado cassette N1) ou no domínio C-terminal (denominados cassetes C1 e C2) da subunidade NR1 (Zukin e Bennett, 1995). A remoção do cassette C2 resulta na codificação de uma seqüência 22 conhecida como cassette C2' (Zukin e Bennett, 1995). Todas as subunidades dos receptores NMDA e variantes NR1 clivadas alternativamente podem formar canais com diversas composições de subunidades e propriedades funcionais. Os níveis de expressão dessas subunidades, regulados com precisão pelo processo de transdução de sinais e mudanças nos níveis de expressão das subunidades dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, têm mostrado serem importantes, não somente no desenvolvimento normal e na plasticidade sináptica, como também em condições fisiopatológicas.

Tem sido observado que a exposição de longa duração ao etanol pode resultar em mudanças compensatórias nos níveis de expressão das subunidades dos canais iônicos acoplados ao glutamato. Estudos com *Western blot* detectaram aumento nos níveis das

subunidades proteicas NR1 em sinaptossomas cerebrais (Chen *et al.*, 1997) e em homogenados hipocampais (Trevisan *et al.*, 1994; Devaud e Morrow, 1999) de ratos expostos cronicamente ao etanol. Outro estudo mostrou um aumento nos níveis das subunidades NR1, NR2A e NR2B em homogenados corticais e hipocampais de ratos expostos a infusões intragástricas de etanol por 6 dias (Kalluri *et al.*, 1998). Um aumento nos níveis das subunidades NR1 e NR2A foi relatado por Snell *et al.* (1996) em hipocampus de camundongos expostos à dieta líquida contendo etanol por duas semanas. Tomados em conjunto, os resultados desses estudos com animais expostos cronicamente ao etanol sugerem fortemente que a expressão das subunidades dos receptores NMDA se altera em resposta à exposição de longa duração a essa droga. Tem sido postulado que essas mudanças adaptativas na expressão das subunidades contribuem para a desregulação do balanço neuroquímico associado com a síndrome de abstinência ao álcool.

Muitas lacunas existem sobre os efeitos da exposição de longa duração ao etanol na expressão das subunidades dos receptores não-NMDA. Um estudo relatou que a exposição de 12 semanas àquela droga não mudou os níveis das subunidades GluR1 e GluR2 no hipocampo de ratos (Trevisan *et al.*, 1994). Entretanto, os efeitos na expressão de outras subunidades dos receptores não-NMDA merecem ser mais investigados. Em nosso estudo, procurou-se examinar os efeitos de uma dieta alcoólica por 16 dias na expressão dos níveis proteicos das subunidades pertencentes às famílias dos receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA e Kainato.

Os estudos foram concentrados nos níveis proteicos das subunidades daqueles receptores no hipocampo de ratos porque esta região além de ser sensível às ações do álcool, é rica em receptores glutamatérgicos e NO, está envolvida em vários eventos comportamentais relacionados ao uso e abuso do álcool e com alguns sinais e sintomas da

síndrome de abstinência àquela droga, entre eles alterações de memória, convulsões e ansiedade (Hollmann e Heinemann, 1994; Ulrichsen *et al.*, 1996; Koob *et al.*, 1998; Devaud e Morrow, 1999; Wirkner *et al.*, 1999). É importante também enfatizar que a elevada atividade dos receptores NMDA, induzida pelo tratamento crônico com etanol, pode estar ligada a uma aumentada regulação na atividade da NOSn, durante a dependência e síndrome de abstinência ao álcool. Embora esta síndrome em humanos (Thompson, 1978; Powell, 1999) e em ratos (Uzbay e Kayaalp, 1995; Darstein *et al.*, 2000) esteja bem descrita na literatura, muito tem a ser estudado no que se diz respeito aos mecanismos de ação envolvidos nesta dependência alcoólica. Entretanto, como o mecanismo através do qual a alcoolização crônica regula a atividade da NOSn não está bem definido, uma análise desta enzima também foi foco de nossas investigações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

a) Exposição crônica ao etanol

Todos os estudos experimentais utilizando animais foram autorizados pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidado com Animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Novo México (Estados Unidos) e utilizados de acordo com suas normas. Ratos machos Sprague-Dawley^R pesando aproximadamente 250 g foram mantidos no Biotério do Departamento de Neurociências da Escola de Medicina da Universidade do Novo México, para adaptação ao novo ambiente pelo prazo mínimo de uma semana antes do início da dieta que será descrita a seguir. Eles foram individualmente acondicionados em caixas de acrílico a uma temperatura de 22 °C e ciclo de 8 horas de luz / 16 horas de escuro (luzes acesas de 09:30 a 17:30 horas) e receberam dieta líquida Bioserv (Frenchtown, NJ) baseada na formulação de Lieber-DeCarli (Lieber e DeCarli, 1982). Esta dieta líquida providencia 1kcal/ml para cada rato.

Antes de começar o tratamento alcoólico, as rações de todas as caixas contendo os animais foram retiradas no primeiro dia, tão logo o ciclo de luz foi ativado. Este procedimento foi utilizado para não interferir com a quantidade de dieta ingerida voluntariamente por cada animal. Os ratos do grupo #1 receberam 80 ml de dieta não contendo álcool nos dois primeiros dias, seguida pela dieta alcoólica contendo 3% (dias 3-4), 5% (dias 5-7) e 6,7% de etanol (dias 8-16). Os ratos do grupo #2 foram considerados controles e receberam dieta sem álcool, isocalórica àquela dada ao grupo exposto ao álcool, conforme demonstrado no quadro a seguir:

Quadro 1 - Ingredientes para o preparo das dietas

| | 0% (1L) | 3% (1 L) | 5% (1 L) | 6,7% (1 L) |
|----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Água fria de torneira (ml) | 840 | 840 | 840 | 840 |
| Etanol 95% (ml) | 0 | 30 | 50 | 67 |
| Maltose-Dextrina (gr) | 90 | 46 | 22 | 0 |
| Chocolate dietético (gr) | 125 | 125 | 125 | 125 |

A dieta líquida era disponível aos ratos durante 16 horas do ciclo escuro (começando às 17:30 horas) e era removida às 09:30 horas de cada manhã. As garrafas com água eram removidas das caixas quando os animais tinham acesso a dieta líquida e as mesmas retornavam às caixas pela manhã, tão logo os tubos eram removidos para que o consumo fosse medido. As dietas eram limitadas somente ao ciclo escuro visto que os ratos são animais com hábitos noturnos e não consomem uma quantidade considerável de comida durante o ciclo de luz. Além disso, os ratos tiveram livre acesso à água durante o ciclo de luz para prevenir desidratação. Os padrões de consumo da dieta foram checados diariamente. Para confirmar que esta dieta induzia dependência alcoólica, foram avaliados os escores da síndrome de abstinência ao álcool seguindo uma versão modificada na escala descrita por Lal *et al* (1988). As crises audiogênicas também foram avaliadas tais como descritas por Frye *et al.* (1981). O quadro a seguir mostra os parâmetros e escores de avaliação dos animais testados na abstinência ao álcool.

Quadro 2 - Análise comportamental dos animais abstinentes à dieta alcoólica

| ATIVIDADE ESPONTÂNEA AVALIADA 15 SEC ANTES DO MANUSEIO | | | | |
|---|--|--|---|---|
| Atividade geral | Imobilidade = 0 | Sem locomoção = 1 | Locomoção ocasional = 2 | Locomoção contínua ou rápida = 3 |
| Espasmos, sacudidas e contorções | nenhum = 0 | Uma vez = 1 | Duas ou mais = 2 | Severos ou continuados = 3 |
| Tremores na cabeça | nenhum = 0 | Alguns movimentos fásicos da cabeça e vibração das vibrissas = 1 | Maior que o normal = 2 | Tremores severos ou contínuos = 3 |
| RESPOSTA AO MANUSEIO | | | | |
| Vocalização | Sem som = 0 | Um som de baixa intensidade = 1 | Vocalização alta = 2 | Vocalizações altas, repetitivas e contínuas no início do manuseio = 3 |
| Esquiva | Nenhuma = 0 | Esquiva rápida = 1 | Move-se para trás da gaiola e emite movimentos evasivos = 2 | Pressiona o corpo firmemente contra a parede de trás da gaiola = 3 |
| SINAIS NEUROLÓGICOS | | | | |
| Rigidez dos músculos axiais por palpação | Flácido = 0 | Tonus muscular normal = 1 | Tensão elevada = 2 | Rigidez = 3 |
| Tremor na cauda | Flácida = 0 | Tensão normal = 1 | Tremores e rigidez = 2 | Rigidez e sacudidas = 3 |
| Tremores gerais | Nenhum = 0 | Normal = 1 | Tremor = 2 | Tremores constantes = 3 |
| Tarefas motoras (colocar na borda da caixa e observar a descida) | O rato cai imediatamente dentro da caixa = 0 | Descida suave = 1 | Descida incoordenada = 2 | Gasta mais que 5 sec para descer = 3 |
| Postura de apoio sobre as patas | Corpo relaxado = 0 | Sentar normal, agachado ou apiado sobre as 4 patas = 1 | Patas afastadas = 2 | Corpo abaixado e patas posteriores estendidas = 3 |
| Convulsões | | Nenhuma = 1 | Clonus das patas anteriores e tremores de todo o corpo = 2 | Convulsões tônico-clônicas = 3 |
| Tremores ao levantar o animal pela cauda | Nenhum = 0 | Tremores das patas anteriores ao girar 180° = 1 | Tremores e extensão das patas anteriores ao girar 180° = 2 | Tremores e extensão das patas anteriores sem girar 180° = 3 |
| OUTROS | | | | |
| Ausência do comportamento de auto-limpeza | Limpo = 0 | Cor alaranjada = 1 | Uma parte suja com urina, fezes ou alimentos = 2 | Mais que uma parte suja = 3 |

CRISES AUDIOGÊNICAS: SIM OU NÃO

Os ratos foram sacrificados por decapitação no 16^o dia sem anestesia, no pico (23:00 hrs) do consumo da dieta. Outra parte dos animais foi sacrificada 6 e 48 horas após a abstinência ao álcool. As amostras de sangue foram obtidas a partir do coração, coletadas diretamente em tubos contendo EDTA para prevenir a coagulação. Os níveis alcoólicos foram medidos com um kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) baseado na conversão do etanol à acetaldeído pela ação da enzima álcool desidrogenase. Após a decapitação, os cérebros foram rapidamente removidos e os hipocampos dissecados e homogeneizados em PBS contendo um coquetel de inibidores de protease (cat # P-8340, Sigma), fazendo-se uso de um ultrassom. O conteúdo de proteínas dos homogenados foi determinado pelo ensaio de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). As amostras foram diluídas na concentração de 1 mg/ml em PBS, misturadas com tampão de amostras 2X SDS-PAGE, fervidas por 2 min e estocadas a -20 °C.

b) Western Immunoblotting

As amostras foram separadas em minigéis de poliacrilamida a 7,5% e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. O bloqueio de ligações não específicas da membrana de nitrocelulose foi feito por incubação de leite desnatado desidratado a 10%, Tween-20 0,4% e azida de sódio 0,01%. As membranas foram, então, incubadas com anticorpos IgG de coelho anti-NR1-N1, anti-NR1-C1, anti-NR1-C2, anti-NR2A, anti-NR2B e anti-NR2C (gentilmente cedidos pelo Dr. MD Browning, Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Colorado, Denver). As membranas foram também incubadas com anticorpos IgG de coelhos anti-GluR6/7, anti-KA2, e anti GluR2/3 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) e com anticorpos IgG de cabra anti-GluR5, anti-NR1 ou NOS1 (Santa Cruz Biothechnology, Santa Cruz, CA). O

anticorpo anti- IgG de cabra conjugado à peroxidase (IgG-POD) foi obtido da Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). A detecção das bandas dos anticorpos (“blots”) foi realizada usando um kit de ensaio de quimioluminescência para *Western immunoblotting* seguindo as instruções do fabricante (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Nesta técnica os géis de acrilamida 7,5% com as amostras hipocampais foram eletrotransferidas através de uma corrente elétrica de 150 mA por 1 hora, seguida pela transferência para uma membrana de nitrocelulose, cujo tamanho dos poros foi de 0,4 μm . Foram usados padrões de pesos moleculares pré-corados, para se ter certeza da completa transferência. Para esse processo, uma corrente elétrica de 100mA foi aplicada por uma hora. Os anticorpos foram usados nessas membranas após o processo de transferência. A análise densitométrica dos filmes de raio-X foi realizada usando um sistema de análise de imagem Image-Pro[®] Plus (Media Cybernetics, L.P., Silver Spring, MD). Para se ter certeza de que concentrações equivalentes de proteínas de todas as amostras foram colocadas nos géis, os níveis de tubulina foram medidos (anticorpos monoclonais anti- β -tubulina foram obtidos da Sigma, Saint Louis, MO). Em todos os casos, uma curva padrão de proteínas foi gerada a partir de um homogenado de tecido hipocampal mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta curva foi usada para calcular unidades relativas de concentrações de proteínas ($\mu\text{equivalentes}/\mu\text{g}$ proteínas) (Chandler, 1999). Para as análises de *Western Immunoblotting*, foram selecionadas as bandas apropriadas e a densidade relativa foi medida em relação aos padrões.

3. RESULTADOS

a) *Efeitos da exposição de longa duração ao etanol sobre os pesos corporais dos animais*

Os ratos foram alimentados com uma dieta líquida contendo etanol por 16 dias com o objetivo de induzir dependência física. Os ratos pertencentes ao grupo que recebeu álcool consumiram aproximadamente 80 ml/dia quando a dieta não conteve álcool ou quando preparada com etanol 3%. Entretanto, o consumo foi reduzido para cerca de 60 ml/dia quando passaram a receber uma dieta preparada com 5 ou 6,7 % de etanol. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes no peso corporal dos animais entre os grupos controles e os que receberam a dieta alcoólica (figura 9).

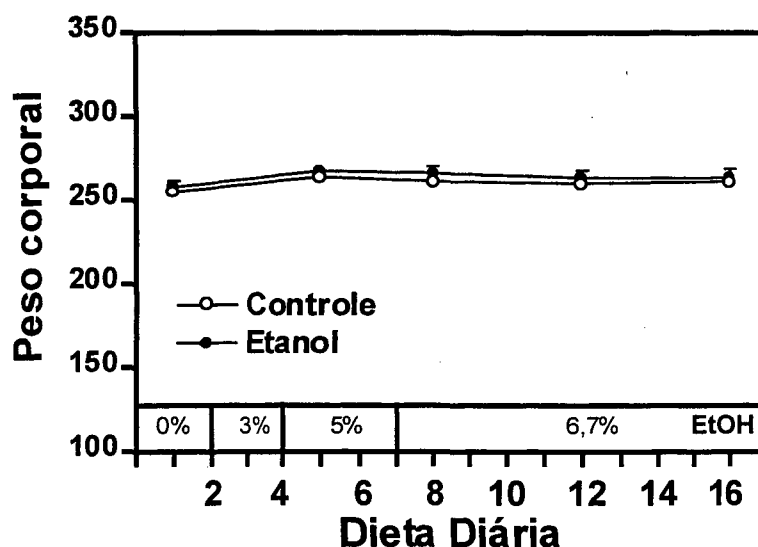


Figura 9 – Pesos dos ratos tratados cronicamente com uma dieta líquida contendo etanol em comparação com os animais controles cuja dieta não continha etanol. O peso foi medido 5 vezes ao longo de todo o tratamento: no 1º dia antes de iniciar o tratamento, no 5º dia após o término da dieta com etanol 3%, no 8º dia correspondente ao término do consumo de etanol 5%, no 12º dia correspondente à metade do tratamento com a dieta rica em etanol 6,7%, e no último dia de tratamento (16º dia). O conteúdo de etanol na dieta líquida do grupo tratado com álcool foi aumentado três vezes conforme indicado.

b) Quantificação dos níveis proteicos das subunidades dos receptores glutamatérgicos durante o tratamento crônico com etanol

A análise de *Western immunoblotting* foi realizada para quantificar os níveis proteicos das subunidades dos receptores hipocâmpais NMDA, AMPA e Kainato durante o último dia do paradigma de exposição de dieta alcoólica. Para estes estudos, os animais foram sacrificados no 16º dia, 5-6 hrs após a introdução da dieta (22:00 à 23:00 hrs). Os níveis alcoólicos sanguíneos dos animais expostos ao etanol foram $81 \pm 8 \text{mM}$ ou 370mg/dl ($n = 8$). Foram estudados inicialmente os receptores NMDA. Nenhuma diferença significativa nos níveis proteicos das subunidades NR1, NR2A, NR2B ou NR2C foi verificada (Figura 10). O mais importante é que não foram detectadas diferenças significantes das inserções C1 e C2 da subunidade NR1, ao mesmo tempo em que se observou uma diminuição significativa no conteúdo da inserção N1 (Figura 11).

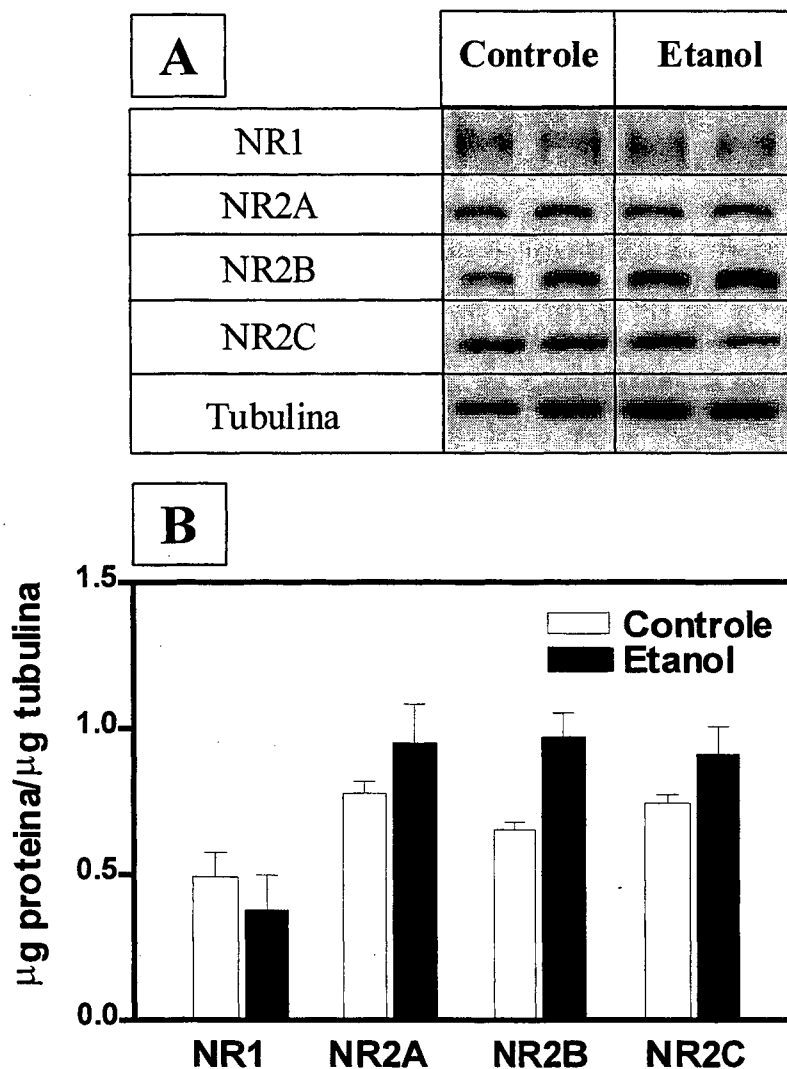


Figura 10 – (A) Quantificação dos níveis das proteínas das subunidades dos receptores NMDA (NR1, NR2A, NR2B e NR2C) no hipocampo de ratos tratados cronicamente com etanol em comparação aos animais controles que receberam uma dieta isocalórica. As amostras totais de proteínas (10 μ l por fileira) foram aplicadas em SDS-PAGE 7,5% e foram analisadas com os anticorpos descritos. Um total de 4 animais por grupo foram usados nestes experimentos. (B) Gráfico representativo dos *Western blots* mostrando não existir nenhuma diferença estatisticamente significativa nos níveis proteicos das diferentes subunidades dos receptores glutamatérgicos NMDA.

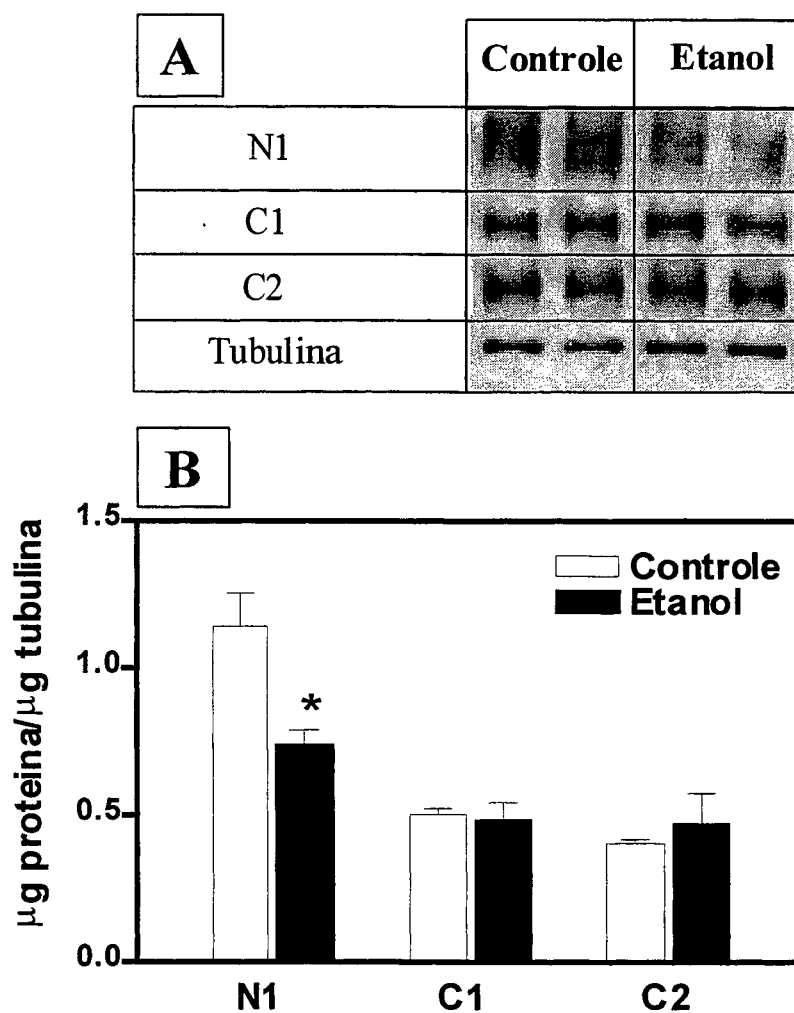


Figura 11 - (A) Quantificação dos níveis das proteínas das inserções N1, C1 e C2 da subunidade NR1 no hipocampo de ratos tratados cronicamente com etanol. As amostras totais de proteínas (10 µl por fileira) foram aplicadas em SDS-PAGE 7,5% e foram analisadas com os anticorpos descritos. Um total de 4 animais por grupo foram usados nestes experimentos. (B) Gráfico representativo dos *Western blots*. * $p < 0,05$ mostra que os animais que receberam dieta com etanol, reduziram os níveis proteicos das inserções N1 da subunidade NR1 quando comparados com os animais controles (teste t de "Student").

Os receptores não-NMDA também foram analisados. Os níveis proteicos das subunidades dos receptores AMPA foram verificados através dos anticorpos anti-GluR1 e anti-GluR2/3. Nenhuma diferença significativa dessas subunidades foi observada em homogenizados hipocâmpais a partir de ratos expostos ao etanol ou controles (Figura 12).

Os níveis proteicos das subunidades dos receptores Kainato foram determinados com os anticorpos anti-GluR5, GluR6/7 e KA2. Como ocorrido com as subunidades dos receptores AMPA, não foram detectadas alterações para as subunidades dos receptores Kainato em animais expostos ao etanol (Figura 13). As subunidades KA1 não foram investigadas por causa da indisponibilidade de anticorpos relacionados a esta subunidade.

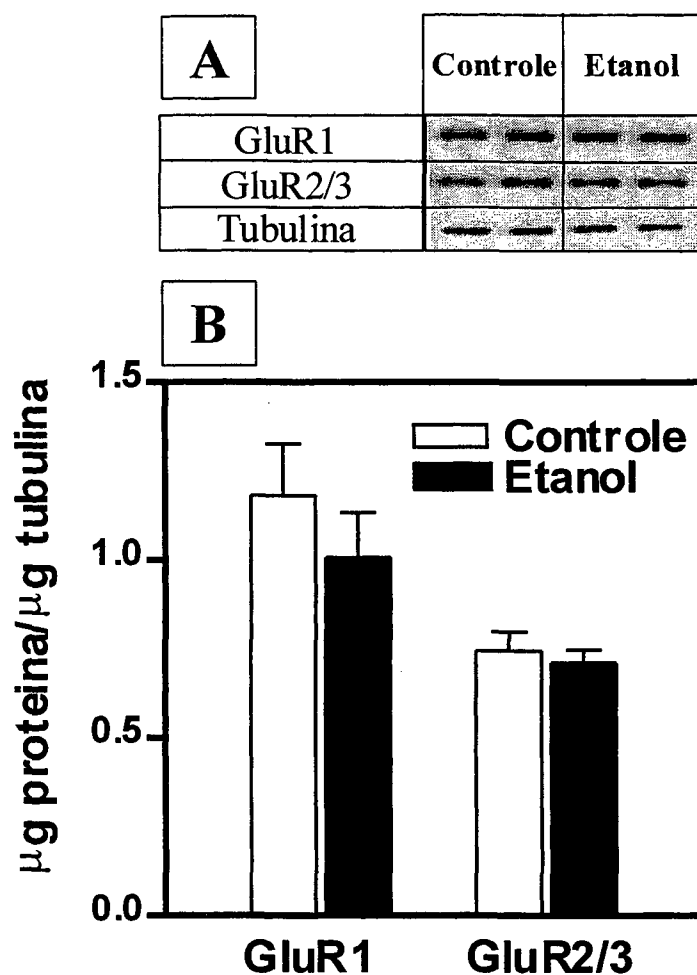


Figura 12 – (A) Quantificação dos níveis das proteínas das subunidades dos receptores AMPA (GluR1 e GluR2/3) no hipocampo de ratos tratados cronicamente com etanol. As amostras totais de proteínas (10 μ l por fileira) foram aplicadas em SDS-PAGE 7,5% e foram analisadas com os anticorpos descritos. Um total de 4 animais por grupo foram usados nestes experimentos. (B) Gráfico representativo dos *Western blots* mostrando não existir nenhuma diferença estatisticamente significativa para as diferentes subunidades dos receptores AMPA.

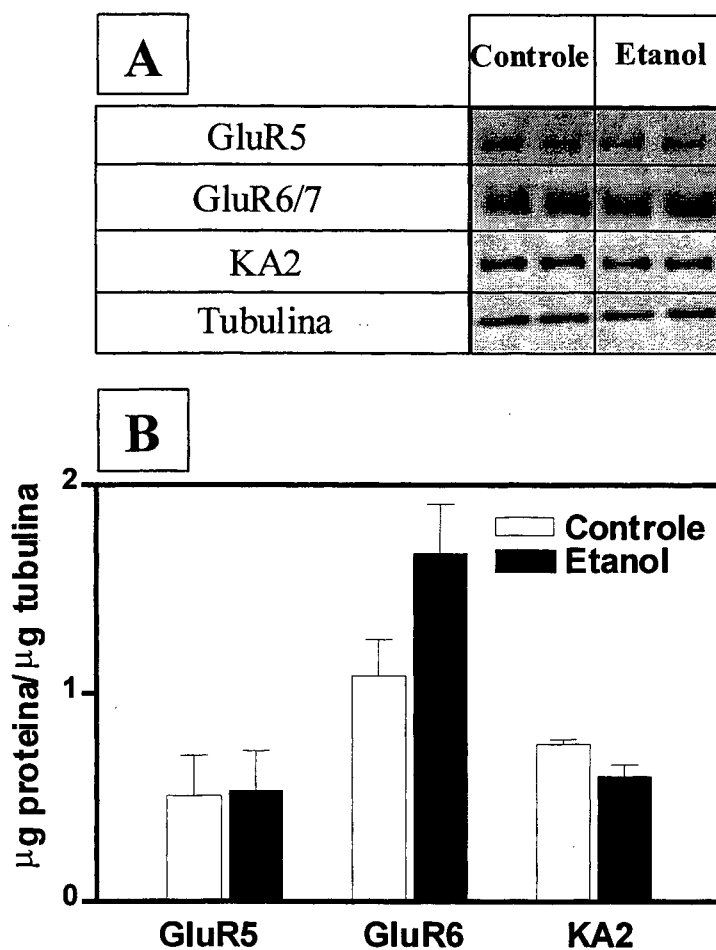


Figura 13 – (A) Quantificação dos níveis das proteínas das subunidades dos receptores Kainato, GluR5, GluR6/7 e KA2 no hipocampo de ratos tratados cronicamente com etanol. As amostras totais de proteínas (10 µl por fileira) foram aplicadas em SDS-PAGE 7,5% e foram analisadas com os anticorpos descritos. Um total de 4 animais por grupo foram usados nestes experimentos. **(B)** Gráfico representativo dos *Western blots* mostrando não existir nenhuma diferença estatisticamente significativa para as diferentes subunidades dos receptores Kainato.

c) Quantificação dos níveis proteicos das enzimas NOS durante o tratamento crônico com etanol

Foram também verificados os efeitos da exposição crônica ao etanol nos níveis proteicos das NOS. Para isto, foi usado um anticorpo IgG de coelho anti-NOS1 para estudar esta enzima no hipocampo de ratos expostos cronicamente ao etanol e nos controles. Não foram encontradas diferenças nos níveis proteicos das NOS1 nos homogenizados hipocampais dos dois grupos de ratos (Figura 14).

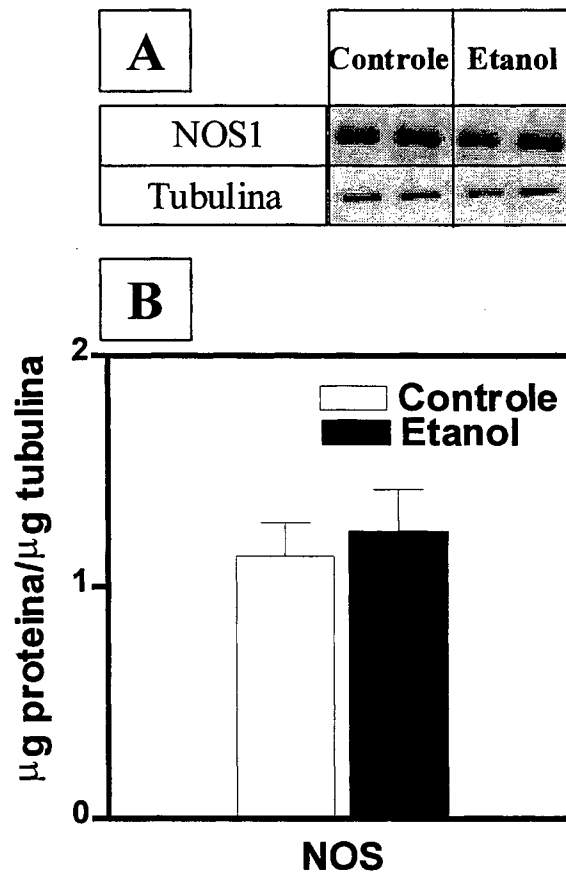


Figura 14 – (A) Gráfico representativo da expressão das NOS no hipocampo de ratos tratados cronicamente com uma dieta líquida com etanol. Um total de 4 animais por grupo foram usados nestes experimentos. (B) Gráfico representativo dos *Western blots* mostrando não existir nenhuma diferença estatisticamente significativa das enzimas NOS nos animais que receberam etanol, quando comparados aos controles.

d) Avaliação comportamental da síndrome de abstinência ao álcool

Para confirmar que esta dieta induzia dependência alcoólica, foram determinados os escores da síndrome de abstinência ao álcool usando uma versão modificada de uma escala previamente descrita (Lal *et al.*, 1988), conforme demonstrados anteriormente no quadro 2. Estas determinações foram realizadas em um grupo separado de animais que não foram usados nas análises do *Western immunoblotting*. Foram medidos 13 parâmetros que avaliavam atividades espontâneas, resposta à manipulação dos animais, sinais neurológicos e comportamentos de auto-limpeza (do inglês *grooming*). Os parâmetros foram estabelecidos exatamente como descritos por Lal *et al.* (1988), por dois observadores que não tinham conhecimento a que grupo pertencia cada animal. Não foram encontradas diferenças estatísticas em nenhum dos parâmetros analisados entre os ratos abstinentes ao álcool por duas horas após o último dia de dieta, quando comparados com os animais controles. Entretanto, seis horas após a abstinência, um aumento estatisticamente significativo foi observado em vários parâmetros, incluindo vocalizações, esquiva, rigidez dos músculos axiais verificada através de palpitações, tremores gerais, tarefas motoras prejudicadas, postura para se apoiar, tremor ao levantar o animal pela cauda e comportamento de auto-limpeza (tabela 1). A média dos escores mostrou-se significativamente elevada nos animais tratados com etanol 6 horas após a abstinência ao álcool (Figura 15), como avaliado pela ANOVA de duas vias com medidas repetidas [$F_{(1,8)} = 56,49$; $p < 0,0001$, para tempo de abstinência; $F_{(1,8)} = 51,97$; $p < 0,0001$, para a interação entre o tratamento e o tempo de abstinência]. Também foi analisada a presença de crises audiogênicas em outros grupos de animais submetidos ao mesmo tratamento. Nenhum dos cinco ratos pertencentes ao grupo controle desenvolveu crises audiogênicas. Ao contrário,

quatro dos cinco animais pertencentes ao grupo exposto ao etanol, desenvolveram as crises. Em conjunto, os resultados desses experimentos claramente indicam que o paradigma de exposição à dieta líquida com etanol resulta no desenvolvimento de dependência ao álcool.

Tabela 1 – Escores de avaliação da síndrome de abstinência ao álcool verificados 2 e 6 horas após a abstinência. Os valores representam a média±epm de 5 animais/tratamento. *p<0,05 representa diferença significativa entre os ratos que receberam as dietas líquidas com etanol comparados com os ratos dos grupos controles, 6 horas após o último dia de alimentação (teste t de “Student”).

| ESCORES DE AVALIAÇÃO DA SÍNDROME DE ABSTINÊNCIA AO ETANOL | 2 horas | | 6 horas | |
|---|-----------|-----------|-----------|------------|
| | Controle | etanol | Controle | etanol |
| Atividade geral | 0,9 ± 0,1 | 0,9 ± 0,2 | 0,5 ± 0,2 | 0,7 ± 0,1 |
| Espasmos e sacudidas | 0,1 ± 0,1 | 0,2 ± 0,2 | 0 | 0,3 ± 0,3 |
| Tremores na cabeça | 0,6 ± 0,2 | 0,7 ± 0,2 | 0,5 ± 0,2 | 1,0 ± 0,3 |
| Vocalização | 0,4 ± 0,2 | 0,2 ± 0,1 | 0,6 ± 0,3 | 2,1 ± 0,2* |
| Esquiva | 1,1 ± 0,2 | 0,4 ± 0,2 | 1,0 ± 0,2 | 1,7 ± 0,3* |
| Rigidez dos músculos axiais | 1,2 ± 0,1 | 1,0 ± 0 | 1,2 ± 0,1 | 1,7 ± 0,1* |
| Tremores na cauda | 1,0 ± 0 | 1,0 ± 0 | 1,2 ± 0,1 | 1,5 ± 0,2 |
| Tremores em geral | 1,0 ± 0 | 1,0 ± 0 | 1,0 ± 0 | 1,8 ± 0,1* |
| Tarefas motoras | 1,2 ± 0,1 | 1,2 ± 0,1 | 1,1 ± 0,1 | 2,1 ± 0,2* |
| Postura de apoio sobre as patas | 1,0 ± 0 | 1,0 ± 0 | 1,1 ± 0,1 | 1,5 ± 0,2* |
| Convulsões | 1,0 ± 0 | 1,0 ± 0 | 1,0 ± 0 | 1,1 ± 0,1 |
| Tremores ao levantar pela cauda | 0,7 ± 0,2 | 0,4 ± 0,2 | 0,6 ± 0,3 | 2,2 ± 0,2* |
| Limpeza (<i>grooming</i>) | 0,6 ± 0,2 | 1,0 ± 0,4 | 0,6 ± 0,2 | 1,8 ± 0,3* |

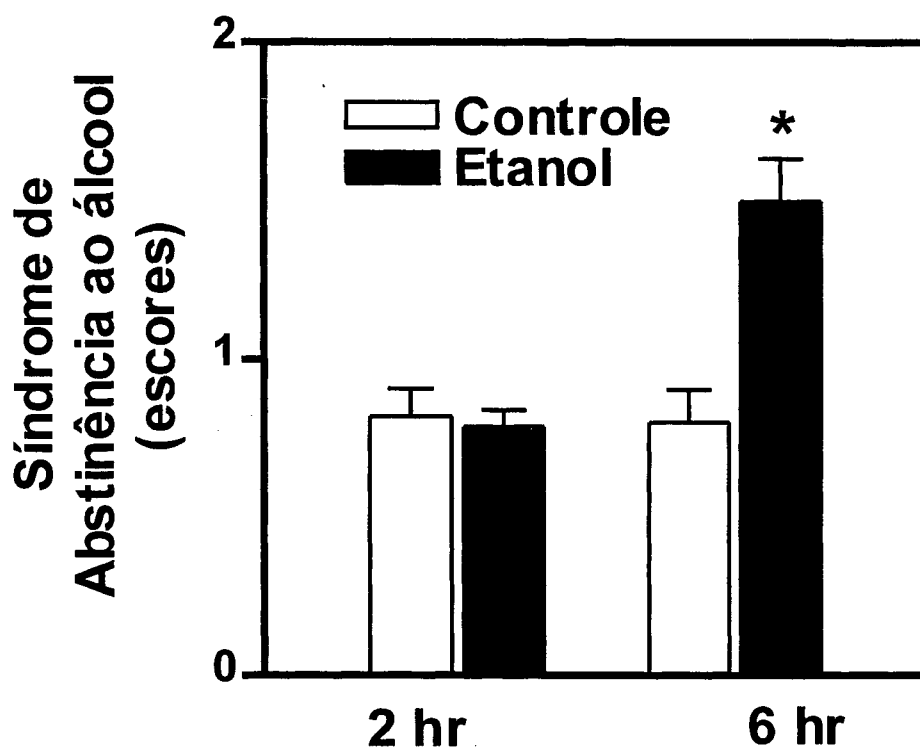


Figura 15 – Escores de avaliação da síndrome de abstinência ao álcool analisados 2 e 6 horas após o término do tratamento crônico com etanol. Quando tomados em conjunto todos os escores, os animais expostos ao tratamento de longa duração com etanol mostraram uma resposta típica de síndrome de abstinência àquela droga. Um total de 5 animais por grupo foram usados nestes experimentos. * $p < 0,0001$ representa diferença estatística em relação aos respectivos animais controles (ANOVA + LSD).

e) Quantificação dos níveis proteicos das subunidades dos receptores glutamatérgicos durante a síndrome de abstinência ao etanol

A análise de *Western blot* foi realizada para quantificar os níveis proteicos das subunidades dos receptores hipocâmpais NMDA, AMPA e Kainato durante à abstinência ao álcool. Para estes estudos, os animais foram sacrificados 6 e 48 hrs após a retirada da dieta no último dia de tratamento. Foram estudadas, inicialmente, as subunidades dos receptores NMDA. Nenhuma diferença significativa nos níveis das subunidades NR1, NR2A, NR2B ou NR2C foi verificada (Figura 16). O mais importante é que não foram detectadas diferenças significantes das inserções C1 e C2 da subunidade NR1, ao mesmo tempo em que se observou uma diminuição significativa no conteúdo da inserção N1, após 6 e 48 hrs de abstinência àquela droga (Figura 17).

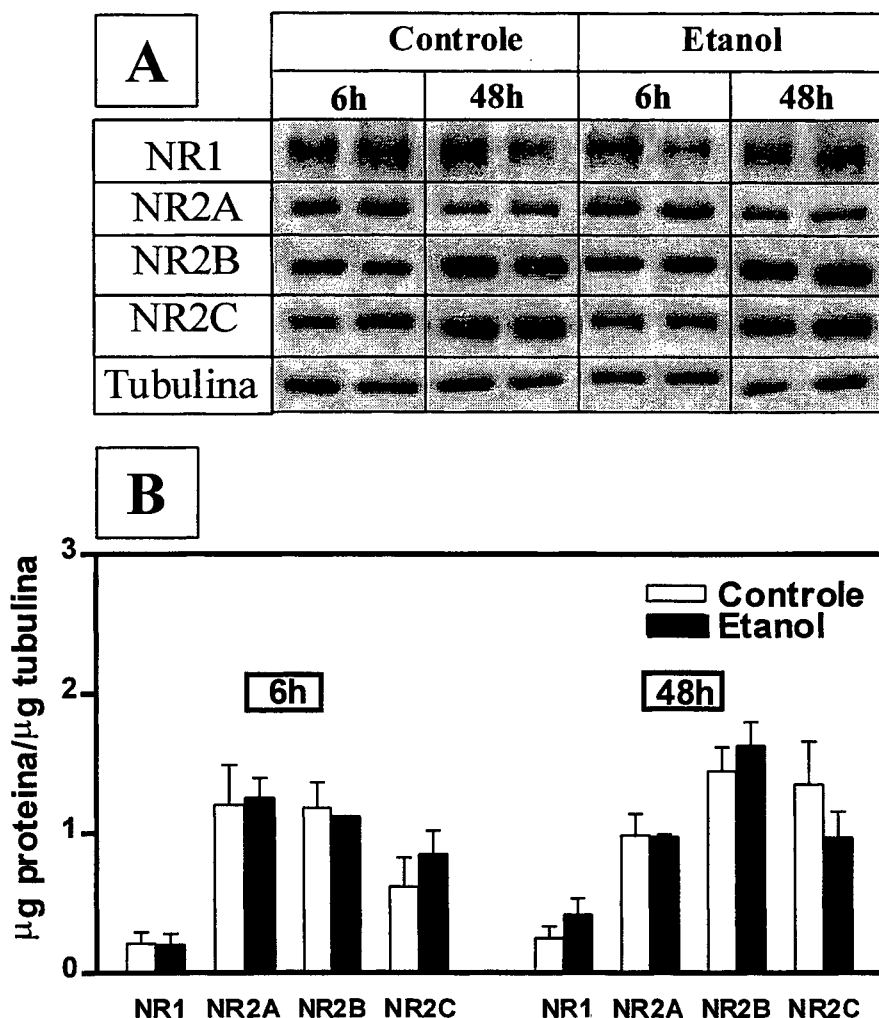


Figura 16 – (A) Quantificação dos níveis das proteínas das subunidades dos receptores NMDA (NR1, NR2A, NR2B e NR2C) no hipocampo de ratos, 6 e 48 horas após o último dia de tratamento com uma dieta líquida contendo etanol. As amostras totais de proteínas (10 µl por fileira) foram aplicadas em SDS-PAGE 7,5% e foram analisadas com os anticorpos descritos. Um total de 5 animais por grupo foram usados nestes experimentos. **(B)** Gráfico representativo dos *Western blots* mostrando não existir nenhuma diferença estatisticamente significante das diferentes subunidades dos receptores glutamatérgicos NMDA.

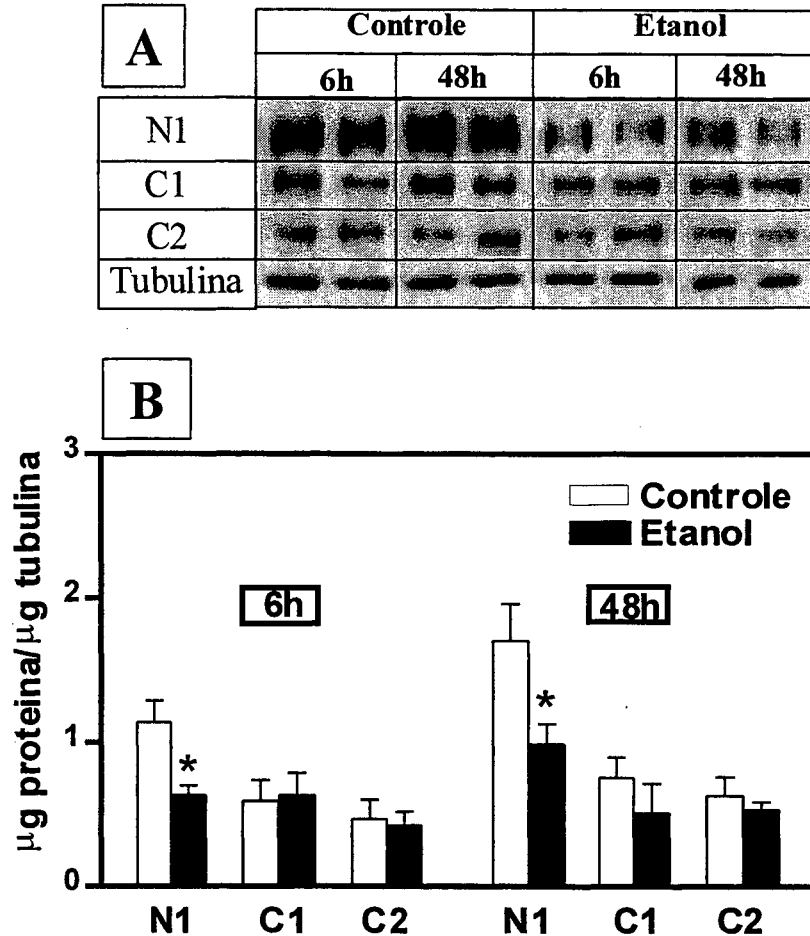


Figura 17 - (A) Quantificação dos níveis das proteínas das inserções N1, C1 e C2 da subunidade NR1 no hipocampo de ratos, 6 e 48 horas após o último dia de tratamento com uma dieta líquida com etanol. As amostras totais de proteínas (10 µl por fileira) foram aplicadas em SDS-PAGE 7,5% e foram analisadas com os anticorpos descritos. **(B)** Gráfico representativo dos *Western blots*. Um total de 5 animais por grupo foram usados nestes experimentos. * $p < 0,05$ mostra que 6 e 48 horas de abstinência ao álcool, reduziram os níveis proteicos das inserções N1 da subunidade NR1 quando comparados aos animais controles (teste t de “Student”).

Os níveis proteicos das subunidades dos receptores AMPA foram verificados após 6 e 48 hs de abstinência ao álcool, fazendo-se uso também dos anticorpos anti-GluR1 e anti-GluR2/3. Da mesma forma como ocorrido durante a presença do álcool, nenhuma diferença significativa foi observada para aquelas subunidades em homogenados hipocâmpais de ratos durante a abstinência àquela droga (Figura 18).

Ao contrário do ocorrido com os receptores NMDA e AMPA, onde não se observou alteração desses receptores, quando comparados aos animais abstinentes da dieta rica em álcool, com os controles que receberam uma dieta isocalórica ao etanol, observou-se uma redução nos níveis de proteínas das subunidades GluR5 e KA2 após 6 horas, e um aumento dos níveis das subunidades KA2 após 48h da retirada da dieta contendo álcool (Figura 19).

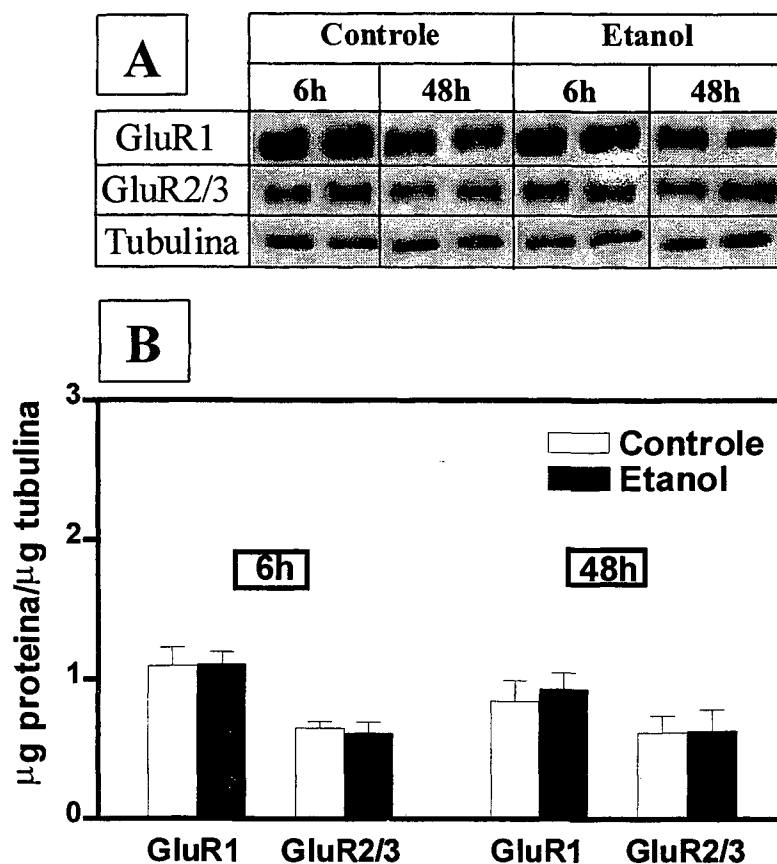


Figura 18 – (A) Quantificação dos níveis das proteínas das subunidades dos receptores AMPA (GluR1 e GluR2/3) no hipocampo de ratos 6 e 48 horas após o último dia de tratamento com uma dieta líquida com etanol. As amostras totais de proteínas (10 µl por fileira) foram aplicadas em SDS-PAGE 7,5% e foram analisadas com os anticorpos descritos. Um total de 5 animais por grupo foram usados nestes experimentos. (B) Gráfico representativo dos *Western blots* mostrando não existir diferença estatisticamente significativa das diferentes subunidades dos receptores AMPA.

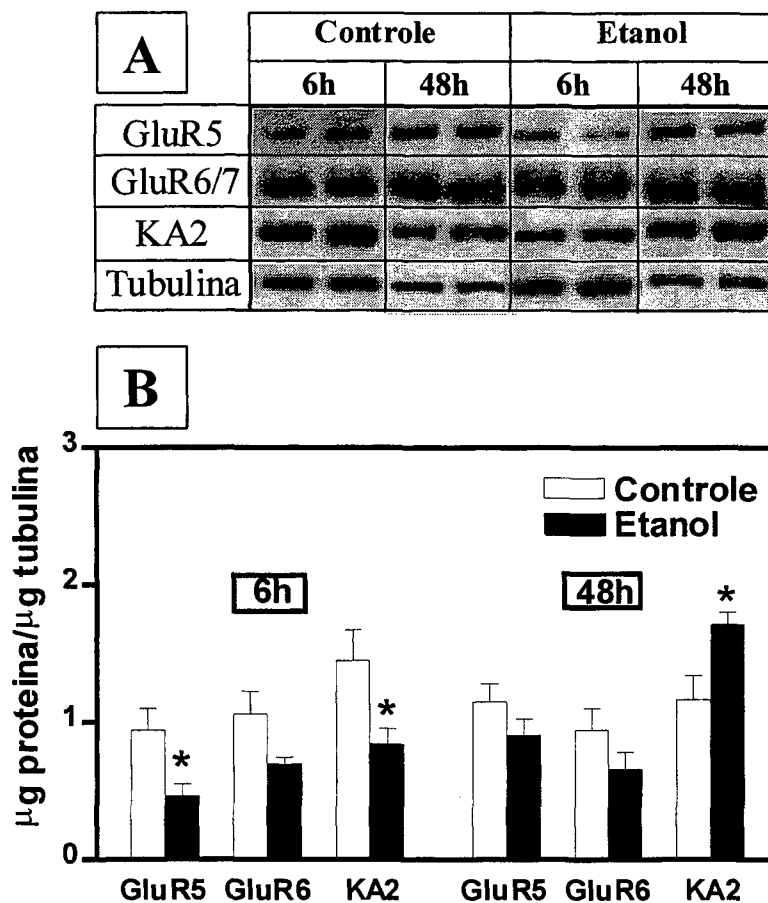


Figura 19 – (A) Quantificação dos níveis das proteínas das subunidades dos receptores Kainato (GluR5, GluR6/7 e KA2) no hipocampo de ratos 6 e 48 horas após o último dia de tratamento com uma dieta líquida com etanol. As amostras totais de proteínas (10 µl por fileira) foram aplicadas em SDS-PAGE 7,5% e foram analisadas com os anticorpos descritos. Um total de 5 animais por grupo foram usados nestes experimentos. (B) Os *Western blots* mostram que com 6 horas de abstinência ao álcool houve uma redução dos níveis proteicos das subunidades GluR5 e KA2, enquanto que com 48 horas foi verificado um aumento dos níveis da subunidade KA2, quando comparados os animais abstinentes em álcool e os controles (* $p < 0,05$ - teste t de “Student”).

f) *Quantificação dos níveis proteicos das enzimas NOS durante a síndrome de abstinência ao etanol*

Apesar de muitos trabalhos mostrarem que tratamento de longa duração com etanol altera a regulação das atividades da NOS durante a síndrome de abstinência ao álcool, em nossos estudos, a exemplo do ocorrido enquanto do tratamento com a dieta rica em etanol, não observou-se nenhuma alteração dos níveis proteicos das enzimas NOS nos homogenizados hipocâmpais dos dois grupos de ratos (Figura 20).

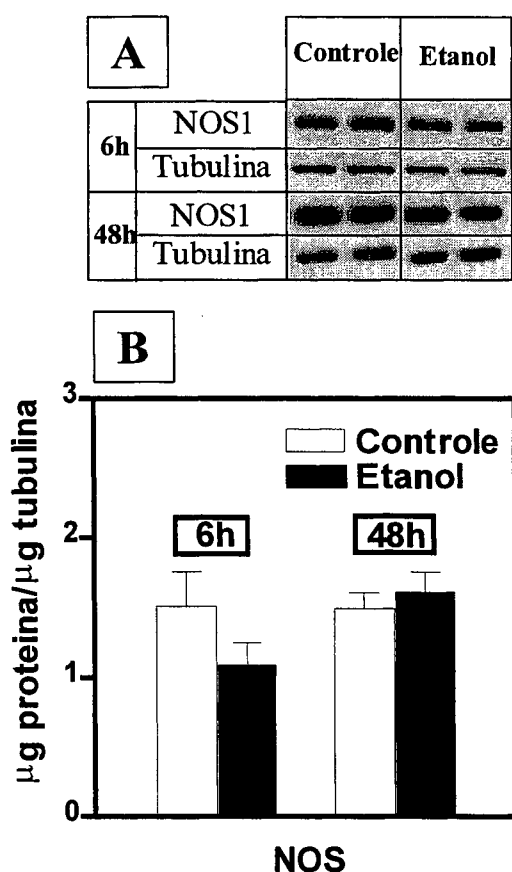


Figura 20 – (A) Gráfico representativo da expressão das NOS no hipocampo de ratos 6 e 48 horas após o término da dieta líquida com etanol. Um total de 5 animais por grupo foram usados nestes experimentos. (B) Gráfico representativo dos *Western blots* mostrando não existir diferença estatisticamente significativa das enzimas NOS nos animais abstinentes em álcool, quando comparados aos controles.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foram examinados os efeitos de uma dieta alcoólica durante 16 dias nos níveis proteicos das subunidades pertencentes às três subfamílias dos canais iônicos acoplados ao glutamato em ratos adultos. Com exceção da redução na inserção N1 das subunidades NR1, não foram encontradas diferenças na expressão das subunidades dos receptores NMDA no hipocampo de ratos quando avaliados no pico de consumo do último dia da dieta contendo etanol. Estes resultados são, de alguma forma, inesperados, visto que outros estudos têm relatado mudanças na expressão das subunidades dos receptores NMDA após paradigmas de exposição de longa duração ao etanol.

Um estudo recente feito por Devaud e Morrow (1999) demonstrou um aumento de aproximadamente 20% nos níveis das expressões das subunidades NR1 e NR2A em homogenizados hipocampais de ratos machos Sprague-Dawley^R expostos a uma dieta similar a esta usada em nosso estudo. Kalluri *et al.* (1998) demonstraram cerca de 35% de aumento nos níveis de NR1, NR2A e NR2B no hipocampo de ratos machos Sprague-Dawley^R quando intoxicados com álcool através de intubação intragástrica por 6 dias. Trevisan *et al.* (1994) detectaram um aumento de aproximadamente 65% na imunoreatividade hipocampal de NR1 em ratos machos Sprague-Dawley^R que foram expostos a dieta líquida contendo etanol por um período de tempo substancialmente longo (12 semanas). Winkler *et al.* (1999) encontraram que tanto os RNAm quanto os níveis das proteínas hipocampais das subunidades NR1 mudaram após exposição crônica ao etanol em ratos que preferem (AA) ou não preferem álcool (ANA) expostos a uma dieta líquida contendo etanol por 20 dias. Em conjunto, os resultados de todos esses estudos indicam

que os efeitos da exposição de longa duração do álcool a níveis das subunidades dos receptores NMDA parecem ser altamente dependentes do tipo de paradigma usado para exposição ao etanol por diferentes investigadores.

Em nosso estudo, há de se ressaltar, entretanto, que após a retirada da dieta, os animais expostos cronicamente ao etanol, obtiveram em uma escala de análise da síndrome de abstinência ao álcool com 13 parâmetros, os maiores escores quando comparados aos ratos controles. Além disso, 80% dos animais expostos ao álcool desenvolveram crises audiogênicas 6 horas após a abstinência, enquanto que nenhuma alteração pôde ser observada nos animais controles, indicando que a dieta resultou no desenvolvimento de dependência alcoólica. Desta forma, nossos resultados demonstram claramente que mudanças na expressão das subunidades dos receptores NMDA nem sempre ocorrem em animais dependentes de álcool. Estes resultados encontrados devem ser considerados ao se interpretar os resultados de estudos funcionais após exposição de longa duração e síndrome de abstinência ao álcool. Tem sido bem postulado nesses estudos que um aumento nas funções dos receptores NMDA pode ser devido a mudanças nos níveis da expressão das subunidades. Os resultados, aqui mostrados, sugerem que essas mudanças nas funções dos receptores NMDA podem ser mediadas por outros mecanismos, tais como, modificações pós-translacionais.

Os efeitos de exposição de longa duração ao etanol sobre a expressão de isoformas alternativamente clivadas da subunidade NR1 têm sido foco de recentes estudos. Hardy *et al.* (1999) relataram que a proporção de RNAm contendo NR1 diminuiu no córtex cerebral de ratos machos Wistar expostos a vapor de etanol e também 48 hrs após a retirada do álcool. Winkler *et al.* (1999) encontraram que os níveis de RNAm das subunidades NR1 com inserções C1(NR1-3) e de subunidades NR1 sem inserções C1 e

C2 (NR1-4) aumentaram após 20 dias de exposição ao etanol em ratos que tem preferência por álcool (AA) tanto no hipocampo quanto no *nucleus accumbens*. Um estudo mais recente com hibridização *in situ* com ratos machos Wistar detectou uma diminuição nos níveis da expressão dos RNAm das subunidades NR1 contendo inserção C2 (NR1-2) no hipocampo após 8 dias da administração de álcool por intubação intragástrica e aumento nos níveis das subunidades ausentes de inserções C1 e C2 (NR1-4) após a retirada do álcool (Darstein *et al.*, 2000). Ao contrário, em nosso estudo foi observado que a exposição de longa duração ao etanol em ratos machos Sprague-Dawley^R não interferiu nos níveis proteicos das subunidades hipocampais NR1 contendo inserções C1 ou C2, entretanto uma redução dos níveis proteicos da inserção N1 pôde ser claramente identificada. Esta redução foi observada 6 e 48h após a abstinência ao álcool. Como mencionado acima, estes resultados claramente indicam que alterações nos níveis das isoformas de NR1, clivadas alternativamente, nem sempre ocorre em animais dependentes de álcool. Esta diminuição nos níveis proteicos das subunidades NR1 contendo o cassete N1 pode ter implicações funcionais. Uma diminuição nos níveis de expressão deste cassete resulta em uma redução na afinidade do glutamato pelos seus receptores, ausência de potenciação pela espermina e aumentada potenciação pelo zinco (Zukin e Bennett, 1995).

Foi também examinada as subunidades dos receptores não-NMDA durante a exposição de longa duração ao etanol e durante a abstinência. Não foram detectadas diferenças nos níveis proteicos das subunidades GluR1 e GluR2/3. Esses resultados estão em concordância com aqueles de Trevisan *et al* (1994) que relataram que exposição de 12 semanas ao álcool não altera os níveis das subunidades GluR1 ou GluR2 no hipocampo de ratos machos Sprague-Dawley^R. Também foram avaliadas as subunidades dos

receptores Kainato, GluR5, GluR6/7 e KA2 e encontramos que os níveis das subunidades GluR5 e KA2 foram reduzidas 6 horas após a abstinência ao álcool. Estas subunidades exercem importantes papéis no hipocampo. Os receptores Kainato contendo subunidades GluR5 controlam o tônus da transmissão sináptica glutamatérgica na região CA1 do hipocampo. Uma redução na expressão da subunidade GluR5 pode levar a uma hiperexcitabilidade (Vignes *et al.*, 1998). Uma mudança na expressão de KA2 pode mudar a eficácia de agonistas (Valenzuela e Cardoso, 1999). Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo sobre os efeitos da exposição de longa duração ao etanol sobre os níveis proteicos das subunidades dos receptores Kainato e pode ser importante para corroborar nossos estudos com ratos que são expostos ao álcool usando diferentes paradigmas além do usado neste estudo.

É importante comparar os resultados de nosso estudo com aqueles de investigações envolvendo os efeitos da exposição de longa duração ao etanol em culturas de neurônios. Ticku e colaboradores relataram que a exposição de neurônios corticais em cultura com 50 mM de etanol por 5 dias resultou em um aumento na expressão dos RNAm das subunidades NR1, NR2B e expressão das subunidades proteicas (Follesa e Ticku, 1996; Hu *et al.*, 1996; Kumari e Ticku, 1998). Chandler *et al.* (1997) relataram que a exposição de neurônios corticais em cultura com 100 mM de etanol por 4 dias não produziu mudanças nos níveis de expressão das subunidades NR1, NR2A e NR2B. Em um estudo subsequente, o mesmo grupo de investigadores (Chandler *et al.*, 1999), realizou experimentos com neurônios corticais em cultura expostos a 100 mM de etanol por 4 dias. Foi observado um aumento nos níveis das subunidades NR1, NR2A, NR2B, GluR1 e GluR2/3 mas não na subunidade GluR6/7.

Além dos achados acima, Hoffman *et al.* (1996) relataram um aumento de 20% nos níveis da subunidade NR1 e uma diminuição de 30% nos níveis da subunidade NR2A em neurônios granulares cerebelares em cultura expostas a 100 mM de etanol por 2-4 dias. Mais recentemente, Cebere *et al.* (1999) relataram que culturas de neurônios granulares cerebelares expostas a 50-100 mM de etanol durante 3 dias, não alterou a expressão de variantes NR1 clivados e subunidades NR2A-C. Como no caso dos estudos com animais mencionados acima, esses resultados indicam claramente que os efeitos de exposição de longa duração ao etanol em culturas de neurônios sobre a expressão das subunidades dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos são também variáveis e altamente dependente das condições experimentais usadas por diferentes investigadores. Até onde conhecemos, os efeitos da exposição de longa duração ao etanol sobre a expressão das subunidades dos receptores glutamatérgicos em culturas de neurônios hipocámpais não foram ainda examinados e pode ser interessante determinar se os efeitos dessa exposição de longa duração ao etanol em animais resulta em achados similares àqueles obtidos em nossos estudos com animais.

Em conclusão, foi encontrado que ratos expostos durante 16 dias ao etanol desenvolvem dependência ao álcool, entretanto isto não fica obrigatoriamente associado com mudanças nos níveis proteicos da enzima NOS e/ou das subunidades pertencentes às maiores famílias dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, exceto no cassete N1 da subunidade NR1, durante o tratamento e após 6 e 48h da retirada do álcool. As subunidades GluR5 e KA2 também foram alteradas 6 horas após a retirada daquela droga e com 48h foi observado um aumento dos níveis da subunidade KA2, supostamente em decorrência de uma compensação à reduzida produção desta subunidade que ocorreu com 6 horas, um mecanismo adaptativo que pode ocorrer no SNC com 48h de abstinência ao

álcool em ratos. Os resultados de nosso estudo sugerem que mudanças nos receptores glutamatérgicos ionotrópicos não podem estar envolvidas, pelo menos em alguns casos, com as conseqüências neurocomportamentais da exposição crônica ao etanol e com a síndrome de abstinência àquela droga.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

- 1) Nós não observamos diferença nos níveis proteicos das subunidades dos receptores NMDA, AMPA, Kainato e da enzima NOS no hipocampo de ratos no pico de consumo do etanol no último dia de tratamento dos animais com uma dieta alcoólica.
- 2) Os níveis proteicos da inserção N1 da subunidade NR1 foram diminuídos no hipocampo de ratos expostos à dieta alcoólica, quando comparados aos animais controles.
- 3) Os animais abstinentes de álcool manifestaram alterações comportamentais, com 80% dos animais expostos ao álcool apresentando crises audiogênicas 6 horas após a retirada do álcool, típicas da síndrome de abstinência ao álcool.
- 4) A exemplo do que ocorreu na presença do álcool, não foi observada também alteração nos níveis proteicos das subunidades dos receptores NMDA, AMPA e da enzima NOS no hipocampo de ratos durante a abstinência ao álcool.
- 5) Os níveis proteicos da inserção N1 da subunidade NR1 foram reduzidos no hipocampo de ratos 6 e 48 horas após a retirada do álcool.
- 6) Em relação aos receptores Kainato, os níveis proteicos das subunidades GluR5 e KA2 foram reduzidos 6 horas após a retirada do álcool. Com 48 horas de abstinência, verificou-se um aumento dos níveis proteicos da subunidade KA2.

**DISCUSSÃO E
CONCLUSÕES
FINAIS**

IV. DISCUSSÃO GERAL

No que diz respeito a *primeira hipótese* deste estudo, nossos resultados demonstram que o NO regula a sensibilidade dos efeitos agudos do etanol em ratos, visto que o 7-NI, inibidor da NOS, aumentou o efeito ansiolítico produzido por uma dose sub-efetiva de etanol. Levando-se em consideração esses achados, é de se supor que uma diminuição na regulação das vias nitrérgicas pode diminuir os riscos de uma pessoa ser um dependente em álcool. Ao contrário, aumentando-se a regulação daquelas vias, os riscos à dependência são supostamente maiores. Nossos dados reforçam aqueles de Schuckit (1994), mostrando que as pessoas mais sensíveis ao álcool têm menor probabilidade a desenvolverem distúrbio do alcoolismo do que aquelas mais resistentes. Portanto, sugere-se que interferindo-se nas vias nitrérgicas, há uma possibilidade de se impedir o alcoolismo.

Nossos estudos sugerem também, que provavelmente há uma conexão entre as vias nitrérgicas e os receptores NMDA na modulação do efeito ansiolítico do álcool. Nós encontramos que a D-cicloserina, um agonista parcial dos sítios da GLY nos complexos receptores NMDA, foi capaz de bloquear o efeito ansiolítico produzido pela associação do 7-NI com o etanol. Esses dados são consistentes com outros dados eletrofisiológicos mostrando que os componentes das vias nitrérgicas atenuam os efeitos inibitórios do etanol sobre as correntes eliciadas por NMDA (Costa *et al.*, submetido à publicação). Nossos resultados, apesar de merecerem mais investigações, talvez sejam um ponto de partida para descobertas de novos mecanismos de ação aguda do etanol sobre os receptores NMDA.

Em relação à *segunda hipótese*, a exposição de longa duração ao etanol, ao contrário dos outros estudos que mostram mudanças compensatórias nos níveis proteicos

das subunidades dos canais iônicos acoplados ao glutamato, não se observou alterações dos níveis das subunidades dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA, com exceção daquelas relacionadas com uma diminuição dos níveis do cassete N1 das subunidades NR1. Cabe mencionar também que nenhuma alteração pôde ser observada para a maioria das subunidades dos receptores AMPA e Kainato e para a enzima NOS. Podemos sugerir que nem sempre o cérebro tenta restaurar o equilíbrio homeostático compensando os efeitos depressores do álcool por mudanças nos níveis proteicos das subunidades dos receptores glutamatérgicos.

O desenvolvimento de farmacoterapia efetiva para o tratamento do alcoolismo é da maior prioridade na pesquisa envolvendo o álcool. Isto só depende do continuado empenho dos neurocientistas para elucidar como o álcool atua no cérebro para produzir um distúrbio tão complexo como o do alcoolismo. Cabe entender como esses fenômenos podem ser interrompidos ou controlados. As pesquisas clínicas testando a eficácia dos medicamentos através de uma triagem clínica cuidadosamente controlada aparecem como fatores importantes neste contexto. Acreditamos que nesta nova década, os maiores avanços serão dados nas descobertas de medicamentos eficazes contra esse grande problema de saúde mundial. Com isto é de se esperar que o grande custo sócio-econômico e problemas relacionados ao alcoolismo possam ser revertidos.

V. CONCLUSÕES FINAIS

- 1) Nossos resultados sugerem que as vias nitrérgicas regulam os efeitos agudos do etanol e isto pode ter um papel no desenvolvimento da dependência ao álcool.
- 2) Provavelmente há uma interação entre as vias nitrérgicas e os receptores NMDA que possa justificar o efeito ansiolítico do etanol, mas dada a complexidade do evento muito ainda tem a ser estudado em relação a este assunto.
- 3) A exposição de longa exposição ao etanol resulta em dependência ao álcool, mas não fica obrigatoriamente associada com mudanças nos níveis proteicos das subunidades pertencentes as três maiores famílias dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e/ou da enzima NOS.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams ML, Meyer ER, Sewing BN, Cicero TJ. Effects of nitric oxide-related agents on alcohol narcosis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 18: 969-975, 1994.
- Allan AM, Harris A. Neurochemical studies of genetic differences in alcohol action. In: Crabbe JC, Harris RA (eds.), *The Genetic Basis of Alcohol and Drug Actions*. New York: Plenum Press, pp. 105-152, 1991.
- Alling C. The biological mechanisms underlying alcohol dependence. *Ugeskr Laeger*, 161: 6912-6917, 1999.
- Anders DL, Blevins T, Smothers CT, Woodward JJ. Reduced ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by deletion of the NR1 C0 domain or overexpression of alpha-actinin-2 proteins. *J. Biol. Chem.*, 19: 275: 15019-24, 2000.
- Babbedge RC, Bland-Ward PA, Hart SL, Moore PK. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 225-228, 1993.
- Barbosa ADE, Morato GS. Effect of epipregnanolone and pregnenolone sulfate on chronic tolerance to ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, submetido à publicação.
- Barreto PS, Lemos T, Morato GS. NMDA-receptor antagonists block the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Addict. Biol.*, 3: 55-64, 1998.
- Behe P, Stern P, Wyllie DJA, Nassa RM, Schoepfer R, Colquhoun D. Determination of NMDA subunit copy number in recombinant NMDA receptors. *Proc. R. Soc. London: Biol.* 262: 205-213, 1995.
- Bhave SV, Snell LD, Tabakoff B, Hoffman PL. Ethanol sensitivity of NMDA receptor function in developing cerebellar granule neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 369: 247-59, 1999.
- Blatt SL, Takahashi RN. Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 457-461, 1999.
- Bortolotto Z, Clarke VRJ, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, Ho KH, Miu P, Brinton BT, Fantaske R, Ogden A, Gates M, Ornstein PL, Lodge D, Bleakman D, Collingridge GL. Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature*, 402: 297-301, 1999.
- Bredt D, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 682-685, 1990a.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, 7: 615-624, 1991.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. *Nature*, 347: 768-770, 1990b.
- Brenman JE, Bredt DS. Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7: 374-378, 1997.
- Calapai G, Mazzaglia G, Sautebin L, Costantino G, Marciano MC, Cuzzocrea S, Di Rosa Caputi AP. Inhibition of nitric oxide formation reduces voluntary ethanol consumption in the rat. *Psychopharmacology*, 125: 398-401, 1996.
- Carreño CFT, Ferreira VMM, Morato GS. Ethanol-induced hypothermia in rats is antagonized by dexamethasone. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30: 69-72, 1997.

- Carvalho V, Pinsky I, De Souza e Silva R, Carlini-Cotrim B. Drug and alcohol use and family characteristics: a study among Brazilian high-school students. *Addiction*, 90: 65-72, 1995.
- Caton PW, Tousman SA, Quock RM. Involvement of nitric oxide in nitrous oxide anxiolysis in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 48: 689-692, 1994.
- Cebere A, Cebere G, Liljequist S. Enhancement of NMDA-induced functional responses without concomitant NMDA receptor changes following chronic ethanol exposure in cerebellar granule cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 360: 623-632, 1999.
- CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. I Levantamento Domiciliar Nacional sobre o uso de drogas psicotrópicas. Estudo envolvendo 24 maiores cidades do estado de São Paulo – 1999. Boletim CEBRID, n. 40, 2000.
- Chandler LJ, Norwood D, Sutton G. Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23: 363-70, 1999.
- Chandler LJ, Sutton G, Norwood D, Sumners C, Crews FT. Chronic ethanol increases N-methyl-D-aspartate-stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.*, 51: 733-740, 1997.
- Charlton ME, Sweetnam PM, Fitzgerald LW, Terwilliger RZ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic ethanol administration regulates the expression of GABAA receptor alpha 1 and alpha 5 subunits in the ventral tegmental area and hippocampus. *J. Neurochem.* 68: 121-127, 1997.
- Chen X, Michaelis ML, Michaelis EK. Effects of chronic ethanol treatment on the expression of calcium transport carriers and NMDA/glutamate receptor proteins in brain synaptic membranes. *J. Neurochem.*, 69:1559-69, 1997.
- Chittajallu R, Braithwaite SP, Clarke VR, Henley JM. Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *TIPS*, 20: 26-35, 1999.
- Choi YB, Tzen L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat. Neurosci.*, 3:15-21, 2000.
- Chu B, Anantharam V, Treistman SN. Ethanol inhibition of recombinant heteromeric NMDA channels in the presence and absence of modulators. *J. Neurochem.*, 65: 140-148, 1995.
- Cícero TJ. A critique of animal analogues of alcoholism. In: *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*, vol. 2, Majchrowicz E and Noble EP (Eds). Plenum Press, New York, 533-560, 1979.
- Collingridge GL, Bliss TVP. Memories of NMDA receptors and LTP. *TINS*, 18: 54-56, 1995.
- Collingridge GL, Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *TIPS*, 11: 290-296, 1990.
- Collins RL, Marlatt GA. Psychological correlates and explanations of alcohol use and abuse. In Tabakoff B, Sutker PB, Randall CL (eds): *Medical and Social Aspects of Alcohol Abuse*. New York, Plenum Press, pp. 273-308, 1983.
- Corbett R, Dunn RW. Effects of 5,7 dichlorokynurenic acid on conflict, social interaction and plus maze behaviors. *Neuropharmacology*, 32: 461-466, 1993.
- Cordeiro R, Lima Filho EC, Almeida IM. Blood pressure among tannery workers. *Rev. Saúde Pública*, 32: 467-476, 1998.

- Costa ET, Ferreira VMM, Valenzuela CF. Evidence that nitric oxide regulates the acute effects of ethanol on NMDA receptors. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, submetido à publicação.
- Costa ET, Soto EE, Cardoso RA, Olivera DS, Valenzuela CF. Acute effects of ethanol on kainate receptors in cultured hippocampal neurons. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 24: 220-225, 2000.
- Cotrim HP, Leite L, Lyra LG. Forms of hepatic disease in alcoholic patients in Salvador, BA. *Arq. Gastroenterol.*, 25: 4-7, 1988.
- Cruz JM. Victimization by urban violence: incidence and associated factors in cities in Latin America and Spain. *Rev. Panam. Salud Publica*, 5: 259-267, 1999.
- Cunha RM, Mott CB, Guarita DR, Pedroso MR, Jukemura J, Bacchela T, Cunha JE, Machado MC, Laudanna AA. Complications of chronic pancreatitis in São Paulo. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 52: 306-315, 1997.
- Dahchour A, De Witte P. Taurine blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate of ethanol-dependent rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 65: 345-50, 2000.
- Dani R, Mott CB, Guarita DR, Nogueira CE. Epidemiology and etiology of chronic pancreatitis in Brazil: a tale of two cities. *Pancreas*, 5: 474-478, 1990.
- Danysz W, Dyr W, Jankowska E, Glazewski S, Kostowski W. The involvement of NMDA receptors in acute and chronic effects of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 16: 499-504, 1992.
- Darstein MB, Landwehrmeyer GB, Feuerstein TJ. Changes in NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain following withdrawal from forced long-term ethanol intake. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 361: 206-213, 2000.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayucu PV, Cheung W, Chen H-SV, Lipton SA, Nakanishi N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature*, 393: 377-381, 1998.
- Davis-Cox MI, Fletcher TL, Turner JN, Szarowski D, Shain W. Three-day exposure to low-dose ethanol alters guanine nucleotide binding protein expression in the developing rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 276: 758-764, 1996.
- Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *TIPS*, 16: 33-36, 1995.
- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7797-7801, 1991.
- Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.*, 14: 5147-5159, 1994.
- Dawson VL. Nitric oxide: role in neurotoxicity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 22: 305-308, 1995.
- De Oliveira CL, Del Bel EA, Guimarães FS. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 56: 55-59, 1997.
- De Sarro G, Di Paola ED, De Sarro A, Vidal MJ. L-arginine potentiates excitatory amino acid-induced seizures elicited in the deep prepiriform cortex. *Eur. J. Pharmacol.*, 230:151-158, 1993.
- De Souza MM, Schenberg LC, de Padua Carobrez A. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. *Behav. Brain Res.*, 90: 157-65, 1998.

- Deutsch JA, Eisner A. Ethanol self-administration in the rat induced by forced drinking of ethanol. *Behav. Biol.*, 20: 81-90, 1977.
- Devaud LL, Morrow AL. Gender-selective effects of ethanol dependence on NMDA receptor subunit expression in cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.*, 369: 331-334, 1999.
- Di Chiara G, Acquas E, Tanda G. Ethanol as a neurochemical surrogate of conventional reinforcers: The dopamine-opioid link. *Alcohol*, 13: 13-17, 1996.
- Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th. ed.: DSM-IV. Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 1994.
- Diamond I, Gordon AS. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol. Reviews*, 77: 1-20, 1997.
- Diamond I, Messing RO. Neurologic effects of alcoholism. *West J. Med.*, 161: 279-287, 1994.
- Dietz J, Pardo SH, Furtado CD, Harzheim E, Furtado AD. Risk factors related to esophageal cancer in Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 44: 269-272, 1998.
- Dildy-Mayfield JE, Harris RA. Ethanol inhibits kainate responses of glutamate receptors expressed in *Xenopus oocytes*: role of calcium and protein kinase C. *J. Neurosci.*, 15: 3162-3171, 1995.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.*, 51: 7-61, 1999.
- Dunn RW, Reed TA, Copeland PD, Frye CA. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacology*, 37: 899-904, 1998.
- East SJ, Garthwaite J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci. Lett.*, 123: 17-19, 1991.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li T-K, Tabakoff B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22: 998-1037, 1998.
- Faintuch JJ. Cardiovascular impact of alcoholism. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 50: 76-79, 1995.
- Faria MS, Muscara MN, Moreno Junior H, Teixeira SA, Dias HB, De Oliveira B, Graeff FG, De Nucci G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur. J. Pharmacol.*, 26: 323: 37-43, 1997.
- Fedele E, Raiteri M. In vivo studies of the cerebral glutamate receptor/NO/cGMP pathway. *Prog. Neurobiol.*, 58: 89-120, 1999.
- Ferreira VMM, Morato GS. D-cycloserine blocks the effects of ethanol and HA-966 in rats tested in the elevated plus-maze. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21: 1638-1642, 1997.
- Ferreira VMM, Morato GS. Influence of age and pre-treatment with D-cycloserine on the behavior of ethanol-treated rats tested in the elevated plus-maze apparatus. *Addict. Biol.*, 1: 395-404, 1996.
- Field L, Dilts RV, Ravichandran R, Lenhert PG, Carnahan GE. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-DL-penicillamine, X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. *J. Chem. Soc. Comm.* 249-250, 1978.

- File SE, Andrews N, al-Farhan M, Wu PY. The role of 5-HT in the anxiogenic effects of acute ethanol withdrawal and in the long-lasting cognitive deficits. *Alcohol Alcohol Suppl.*, 2: 495-499, 1993.
- File SE, Andrews N, al-Farhan M. Anxiogenic responses of rats on withdrawal from chronic ethanol treatment: effects of tianeptine. *Alcohol Alcohol*, 28: 281-286, 1993.
- File SE, Gonzalez LE, Andrews N. Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic1 receptors. *Behav. Neurosci.*, 112: 352-359, 1998a.
- File SE, Kenny PJ, Ouagazzal AM. Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. *Behav. Neurosci.*, 112: 1423-1429, 1998b.
- Finn DA, Gallaher EJ, Crabbe JC. Differential change in neuroactive steroid sensitivity during ethanol withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292: 394-405, 2000.
- Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol-mediated up-regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture. *J. Biol. Chem.*, 271: 13297-13299, 1996.
- Forster LM, Tannhauser M, Barros HM. Drug use among street children in southern Brazil. *Drug Alcohol Depend.*, 43: 57-62, 1996.
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwartz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension*, 23: 1121-1131, 1994.
- Freund G, Anderson KJ. Glutamate receptors in the cingulate cortex, hippocampus, and cerebellar vermis of alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23:1-6, 1999.
- Frye GD, Chapin RE, Vogel RA, Mailman RB, Kilts CD, Mueller RA, Breese GR. Effects of acute and chronic 1,3-butanediol treatment on central nervous system function: a comparison with ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 216(2):306-314, 1981.
- Gardner EL, Lowinson JH. Drug craving and positive/negative hedonic brain substrates activated by addicting drugs. *Semin. Neurosci.*, 5: 359-368, 1993.
- Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *TINS*, 14: 60-67, 1991.
- Gatch MB, Wallis CJ, Lal H. Effects of NMDA antagonists on ethanol-withdrawal induced "anxiety" in the elevated plus maze. *Alcohol*, 19: 207-211, 1999.
- Gevaerd MS, Sultowski ET, Takahashi RN. Combined effects of diethylpropion and alcohol on locomotor activity of mice: participation of the dopaminergic and opioid systems. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 1545-1550, 1999.
- Gevaerd MS, Takahashi RN. Involvement of dopamine receptors on locomotor stimulation and sensitization elicited by the interaction of ethanol and mazindol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 63: 395-399, 1999.
- Gianini RJ, Litvoc J, Eluf Neto J. Physical aggression and social class. *Rev. Saúde Pública*, 33: 180-186, 1999.
- Goldstein DB, Chin JH. Interaction of ethanol with biological membranes. *Fed. Proc.*, 40: 2073-2076, 1981.
- Goldstein DB. Pharmacology of alcohol. New York, NY, Oxford University Press, 1983.
- Gonzalez LE, File SE, Overstreet DH. Selectively bred lines of rats differ in social interaction and hippocampal 5-HT1A receptor function: a link between anxiety and depression? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 59: 787-792, 1998a.

- Gonzalez LE, Ouagazzal AM, File SE. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. *Eur. J. Neurosci.*, 10: 3673-3680, 1998b.
- Gray JA. *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford: Oxford University Press, 1987.
- Grinfeld H, Goldenberg S, Segre CAM, Chadi G. Effects of ethanol on offspring of C57BL/6J mice alcoholized during gestation. *Acta Cirurg. Bras.*, 14: 1-17, 1999b.
- Grinfeld H, Goldenberg S, Segre CAM, Chadi G. Fetal alcohol syndrome in São Paulo, Brazil. *Paediat. Perin. Epid.*, 13: 496-497, 1999a.
- Guimarães FS, de Aguiar JC, Del Bel EA, Ballejo G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport*, 5: 1929-1932, 1994.
- Gulya K, Grant KA, Valverius P, Hoffman PL, Tabakoff B. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res.*, 547: 129-134, 1991.
- Hall W, Zador D. The alcohol withdrawal syndrome. *Lancet*, 349: 1897-1900, 1997.
- Hamada GS, Bos AJ, Kasuga H, Hirayama T. Comparative epidemiology of oral cancer in Brazil and India. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 16: 63-72, 1991.
- Handley S. Future prospects for the pharmacological treatment of anxiety. *CSN Drugs*, 2: 397-414, 1994.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 327: 1-5, 1984.
- Hardy PA, Chen W, Wilce PA. Chronic ethanol exposure and withdrawal influence NMDA receptor subunit and splice variant mRNA expression in the rat cerebral cortex. *Brain Res.*, 819: 33-39, 1999.
- Harris RA. Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23: 1563-1570, 1999.
- Hirata ES, Almeida OP, Funari RR, Klein EL. Alcoholism in a geriatric outpatient clinic of São Paulo – Brazil. *Int. Psychogeriatr.*, 9: 95-103, 1997.
- Hochgraf PB, Zilberman ML, de Andrade A. Women alcoholics – social, demographic and clinical characteristics in a Brazilian sample. *Alcohol Alcohol*, 30: 427-432, 1995.
- Hoffman PL, Bhave SV, Kumar KN, Iorio KR, Snell LD, Tabakoff B, Michaelis EK. The 71 kDa glutamate-binding protein is increased in cerebellar granule cells after chronic ethanol treatment. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 39: 167-76, 1996.
- Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.*, 17: 31-108, 1994.
- Hu XJ, Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol treatment produces a selective upregulation of the NMDA receptor subunit gene expression in mammalian cultured cortical neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 36: 211-218, 1996.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9265-9269, 1987.
- Ikeda M, Komiyama T, Sato I, Himi T, Murota S. Neuronal nitric oxide synthase is resistant to ethanol. *Life Sci.*, 64: 1623-1630, 1999.
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.*, 268: 2836-2843, 1993.

- Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* (Lond.), 325: 529-531, 1987.
- Kalluri HS, Mehta AK, Ticku MK. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. *Mol. Brain Res.*, 58: 221-4, 1998.
- Keinänen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* (Wash. DC), 249: 556-560, 1990.
- Khan MT, Furchgott RF. Additional evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: *Pharmacology*, ed. by MJ Rand and C Raper, pp 341-344, Elsevier, Amsterdam, 1987.
- Khanna JM, Morato GS, Chau A, Shah G. Influence of nitric oxide synthase inhibition on the development of rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, 37: 599-604, 1995.
- Khanna JM, Morato GS, Shah G, Chau A, Kalant H. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, 32: 43-47, 1993.
- Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of N-methyl-D-aspartic acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* (Wash. DC), 241: 835-837, 1988.
- Koltchine V, Anatharam V, Wilson A, Bayley H, Treistman SN. Homomeric assemblies of NMDAR1 splice variants are sensitive to ethanol. *Neurosci. Lett.*, 152: 13-16, 1993.
- Koob GF, Markou A, Weiss F, Schulthesis G. Opponent process and drug dependence: Neurobiological mechanisms. *Semin. Neurosc.*, 5: 351-358, 1993.
- Koob GF, Rassnick S, Heinrichs S, Weiss F. Alcohol, the reward system and dependence. In: Jansson B, Jörnvall H, Rydberg U, Terenius L, Vallee BL, eds. *Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse*. Basel, Switzerland: Birkhäuser-Verlag, 103-114, 1994.
- Koob GF, Roberts AJ, Schulteis G, Parsons LH, Heyser CJ, Hyytiä P, Merlo-Pich E, Weiss F. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22: 3-9, 1998.
- Kotlinska J, Liljequist S. A characterization of anxiolytic-like actions induced by the novel NMDA/glycine site antagonist, L-701,324. *Psychopharmacology* (Berl). 135: 175-81, 1998.
- Kumari M, Ticku MK. Ethanol and regulation of the NMDA receptor subunits in fetal cortical neurons. *J Neurochem.*, 70: 1467-73, 1998.
- Kumari M, Ticku MK. Regulation of NMDA receptors by ethanol. *Prog. Drug Res.*, 54: 152-89, 2000.
- Lal H, Harris CM, Benjamin D, Springfield AC, Bhadra S, Emmett-Oglesby MW. Characterization of a pentylenetetrazol-like interoceptive stimulus produced by ethanol withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 247: 508-518, 1988.
- Lancaster FE. Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection?--a review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16:539-41, 1992.
- Laranjeira R. Liquorspeak and the developing world. *Addiction*, 91: 1870-1871, 1996.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron*, 18: 493-503, 1997.
- Lieber CS, DeCarli LM. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 6: 523-531, 1982.
- Lindblad B, Olsson R. Unusually high levels of blood alcohol? *JAMA*, 236: 1600-1602, 1976.

- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364: 626-632, 1993.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berlin)*, 92: 180-185, 1987.
- Litten RZ, Allen J, Fertig J. Pharmacotherapies for alcohol problems: a review of research with focus on developments since 1991. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 20: 859-876, 1996.
- Lopes CS, Lewis G, Mann A. Psychiatric and alcohol disorders as risk factors for drug abuse. A case-control study among adults in Rio de Janeiro, Brazil. *Soc. Psych. Psychiatr. Epidemiol.*, 31: 355-363, 1996.
- Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA activated ion currents in hippocampal neurones. *Science*, 243: 1721-1724, 1989.
- Lovinger DM, White G, Weight FF. NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J. Neurosci.*, 10: 1372-1379, 1990.
- Lovinger DM. High ethanol sensitivity of recombinant AMPA-type glutamate receptors expressed in mammalian cells. *Neurosci. Lett.*, 159: 83-87, 1993.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- Lu SM, Yeh HH. Ethanol modulates AMPA-induced current responses of primary somatosensory cortical neurons. *Neurochem. Int.*, 35: 175-183, 1999.
- MacKenzie GM, Rose S, Bland-Ward PA, Moore PK, Jenner P, Marsden CD. Time course of inhibition of brain nitric oxide synthase by 7-nitro indazole. *Neuroreport*, 5: 1993-1996, 1994.
- Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78: 927-930, 1994.
- Martin D, Tayyeb MI, Swartzwelder HS. Ethanol inhibition of AMPA and kainate receptor-mediated depolarizations of hippocampal area CA1. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 19: 1312-6, 1995.
- Masood K, Wu C, Brauneis U, Weight FF. Differential ethanol sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Mol. Pharmacol.*, 45: 324-329, 1994.
- Matheus MG, Nogueira RL, Carobrez AP, Graeff FG, Guimarães FS. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology*, 113: 565-569, 1994.
- Matsumoto T, Pollock JS, Nakane M, Forstermann U. Developmental changes of cytosolic and particulate nitric oxide synthase in rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 73: 199-203, 1993.
- Mayer ML, Westbrook GL. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 28: 197-276, 1987.
- McBain CJ, Mayer ML. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol. Rev.*, 74: 723-60, 1994.
- McBride WJ; Li TK. Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. *Critic. Rev. Neurobiol.*, 12: 339-369, 1998.
- McGinnis JM, Foege WH. Actual causes of death in the United States. *JAMA*, 270: 2207-2212, 1993.
- Meguro H, Mori H, Araki K, Kushiya E, Kutsuwada T, Yamazaki M, Kumanishi T, Arakawa M, Sakimura K, Mishina M. Functional characterization of a heteromeric

- NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* (London), 357: 70-74, 1992.
- Menard J, Treit D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23: 591-613, 1999.
- Menard J, Treit D. The septum and the hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. *Behav. Pharmacol.*, 9: 93-101, 1998.
- Michaelis EK, Freed WJ, Galton N, Foye J, Michaelis ML, Phillips I, Kleinman JE. Glutamate receptors changes in brain synaptic membranes from human alcoholics. *Neurochem. Res.*, 15: 1055-1063, 1990.
- Mihic SJ. Acute Effects of ethanol on GABA_A and glycine receptor function. *Neurochem. Int.*, 35: 115-123, 1999.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.*, 38: 1709-1715, 1989.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43: 109-142, 1991.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Development and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12: 529-540, 1994.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256: 1217-1221, 1992.
- Moore MS, DeZazzo J, Luk AY, Tully T, Singh CM, Heberlein U. Ethanol intoxication in *Drosophila*: genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway. *Cell*, 93: 997-1007, 1998.
- Morato GS, Khanna JM. N-methyl-D-aspartate receptors, nitric oxide, and ethanol tolerance. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29: 1415-1426, 1996.
- Moreira LB, Fuchs FD, Moraes RS, Bredemeier M, Cardozo S, Fuchs SC, Victora CG. Alcoholic beverage consumption and associated factors in Porto Alegre, a southern Brazilian city: a population-based survey. *J. Stud Alcohol.*, 57: 253-259, 1996.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-37, 1991.
- Morse RM, Flavin DK. Definition of alcoholism. *JAMA*, 268: 1012-1014, 1992.
- Moss SJ, Smart TG. Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation. *Int. Rev. Neurobiol.*, 39: 1-52, 1996.
- Mott CB, Guarita DR, Coelho ME, Monteiro-da-Cunha JE, Machado MC, Bettarello A. Etiology of chronic pancreatitis in São Paulo: a study of 407 cases. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 44: 214-220, 1989.
- Moy SS, Knapp DJ, Criswell HE, Breese GR. Flumazenil blockade of anxiety following ethanol withdrawal in rats. *Psychopharmacology* (Berl), 131: 354-60, 1997.
- Mülsch A, Busse R, Mordvintcev PI, Vanin AF, Nielsen EO, Scheel-Krüger J, Olesen SP. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. *Neuroreport*, 5: 2325-2328, 1994.
- Muza GM, Bettioli H, Muccillo G, Barbieri MA. The consumption of psychoactive substances by adolescents in schools in Ribeirão Preto, SP (Brazil). I – Prevalence of consumption by sex, age and substance. *Rev. Saúde Pública*, 31: 21-29, 1997a.

- Muza GM, Bettiol H, Muccillo G, Barbieri MA. The consumption of psychoactive substances by adolescents in schools in Ribeirão Preto, SP (Brazil). II – Distribution of consumption by social levels. *Rev. Saúde Pública*, 31: 163-170, 1997b.
- Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implication for brain function. *Science*, 258:597-603, 1992.
- Nathan C, Xie Q-W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78: 915-918, 1994.
- Nunez E, Lopez-Corcuera B, Martinez-Maza R, Aragon C. Differential effects of ethanol on glycine uptake mediated by the recombinant GLYT1 and GLYT2 glycine transporters. *Br. J. Pharmacol.*, 129: 802-10, 2000.
- Nutt D. Alcohol and the brain. *Br. J. Psych.*, 175: 114-119, 1999.
- O'Brien CP. Drug addiction and drug abuse. In: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 9th edn. New York: McGraw-Hill, 1996.
- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Test of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 11285-11289, 1991.
- Orpinas P. Who is violent?: factors associated with aggressive behaviors in Latin America and Spain. *Rev. Panam. Salud Publica*, 5: 232-244, 1999.
- Ouagazzal AM, Kenny PJ, File SE. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology*, 144: 54-60, 1999.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 54: 581-618, 1998.
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333: 664-666, 1988.
- Palmer RMJ; Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond)*, 327: 524-526, 1987.
- Pandey SC. Neuronal signaling systems and ethanol dependence. *Mol. Neurobiol.*, 17: 1-15, 1998.
- Pantazis NJ, West JR, Dai D. The nitric oxide-cyclic GMP pathway plays an essential role in both promoting cell survival of cerebellar granule cells in culture and protecting the cells against ethanol neurotoxicity. *J. Neurochem.*, 70: 1826-1838, 1998.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, 1997.
- Pechansky F. Patterns of alcohol use among adolescents living in Porto Alegre, Brazil. *J. Psychoactive Drugs*, 30: 45-51, 1998.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 14: 149-167, 1985.
- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ. Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Com. Neurol.*, 349: 85-110, 1994.
- Pohorecky LA. Biphasic action of ethanol. *Biobeh. Rev.*, 1: 231-240, 1977.
- Pohorecky LA. Stress and alcohol interaction: an update of human research. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 15: 438-459, 1991.
- Popp RL, Lickteig RL, Lovinger DM. Factors that enhance ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar granule cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289:1564-74, 1999.

- Porto JD, Torres FA, Aguilar AA, Rosa H. Clinical and epidemiological study of calcifying chronic pancreatitis in Goiânia, GO, Brazil. *Arq. Gastroenterol.*, 36: 27-31, 1999.
- Powell AH. Alcohol withdrawal in critical care. *Dimens Crit Care Nurs.*, 18: 24-8, 1999.
- Quock RM, Nguyen E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci.*, 51: PL 255-260, 1992.
- Rezvani AH, Grady DR, Peek AE, Pucilowski O. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates alcohol consumption in two strains of alcohol-preferring rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 50: 265-270, 1995.
- Rice DP. The economic cost of alcohol abuse and alcohol dependence: 1990. *Alcohol Health Res. World*, 17: 10-11, 1993.
- Rodgers RJ, Cao B-J, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30:289-304, 1997.
- Rottenberg H. Membrane solubility of ethanol in chronic alcoholism: The effect of ethanol feeding and its withdrawal on the protection by alcohol of rat red blood cells from hypnotic hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 855: 211-222, 1986.
- Ryabinin AE. Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 139: 34-43, 1998.
- Samson HH. Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 10: 436-442, 1986.
- Sattler R, Xiong Z, Lu W-Y, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 284: 1845-1848, 1999.
- Schlecht NF, Franco EL, Pintos J, Negassa A, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP. Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Am. J. Epidemiol.*, 150: 1129-1137, 1999.
- Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1178: 153-175, 1993.
- Schmitt ML, Coelho W, Lopes-de-Souza AS, Guimaraes FS, Carobrez AP. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Neurosci. Lett.*, 189: 93-96, 1995.
- Schuckit MA. Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism. *Am. J. Psychiatry*, 151: 184-189, 1994.
- Schuman EM, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. *Ann. Rev. Neurosci.*, 17: 153-183, 1994.
- Seeburg PH, Burnashev N, Kohr G, Kuner T, Sprengel R, Monyer H. The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 50: 19-34, 1995.
- Shalala DE (Ed.) Eighth Special Report to the US Congress on Alcohol and Health. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, 1993.
- Silva VA, Laranjeira RR, Dolnikoff M, Grinfeld H, Masur J. Alcohol consumption during pregnancy and newborn outcome: a study in Brazil. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 3: 169-172, 1981.
- Singhal PC, Patel P, Nahar N, Franki N, Kapasi A, Reddy K, Shah N, Nwakoby IE, Mehrotra B. Ethanol-induced neutrophil apoptosis is mediated through nitric oxide. *J Leukoc. Biol.*, 66: 930-6, 1999.

- Snell LD, Claffey DJ, Ruth JA, Valenzuela CF, Cardoso R, Wang Z, Levinson SR, Sather WA, Williamson AV, Ingersoll NC, Ovchinnikova L, Bhavé SV, Hoffman PL, Tabakoff B. Novel structure having antagonist actions at both the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor and neuronal voltage-sensitive sodium channels: biochemical, electrophysiological, and behavioral characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292: 215-27, 2000.
- Snell LD, Nunley KR, Lickteig RL, Browning MD, Tabakoff B, Hoffman PL. Regional and subunit specific changes in NMDA receptor mRNA and immunoreactivity in mouse brain following chronic ethanol ingestion. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 40: 71-78, 1996.
- Snell LD; Tabakoff B; Hoffman PL. 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.*, 602: 91-98, 1993.
- Southam E, Garthwaite J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology*, 32: 1267-1277, 1993.
- Souza DPO, Martins DTO. An epidemiological profile of drug abuse among elementary and high school students in the Cuiaba public school system, Brazil, 1995. *Cad. Saude Publica*, 14: 391-400, 1998.
- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA. Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDA-L) in the rodent brain. *J. Neurosci.*, 15: 6509-6520, 1995.
- Tabakoff B, Hoffman PL. Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron*, 16: 909-12, 1996.
- Tabakoff B, Hoffman PL. Alcohol: Neurobiology. In: Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB, Langrod JG (eds.). *Substance Abuse: A Comprehensive Textbook* (2nd ed.). Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 152-185, 1992.
- Takagi N, Logan R, Teves L, Wallace MC, Gurd JW. Altered interaction between PSD-95 and the NMDA receptor following transient global ischemia. *J Neurochem.*, 74:169-178, 2000.
- Teixeira KV, Carobrez AP. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behav. Neurosci.*, 113: 196-203, 1999.
- Thompson WL. Management of alcohol withdrawal syndromes. *Arch. Intern. Med.*, 138: 278-283, 1978.
- Trevisan L, Fitzgerald LW, Brose N, Gasic GP, Heinemann SF, Duman RS, Nestler EJ. Chronic ingestion of ethanol up-regulates NMDAR1 receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus. *J. Neurochem.*, 62: 1635-1638, 1994.
- Tsai G, Coyle JT. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu. Rev. Med.*, 49: 173-184, 1998.
- Ulrichsen J, Bech B, Ebert B, Diemer NH, Allerup P, Hemmingsen R. Glutamate and benzodiazepine receptor autoradiography in rat brain after repetition of alcohol dependence. *Psychopharmacology*, 126: 31-41, 1996.
- Urso T, Gavalier JS, Van Thiel DH. Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. *Life Sci.*, 28: 1053-1056, 1981.
- Uzbay IT, Erden BF, Tapanyigit EE, Kayaalp SO. Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats. *Life Sci.*, 61: 2197-2209, 1997.
- Uzbay IT, Kayaalp SO. A modified liquid diet of chronic ethanol administration: validation by ethanol withdrawal syndrome in rats. *Pharmacol. Res.*, 31: 37-42, 1995.

- Valenzuela CF, Bhave S, Hoffman P, Harris RA. Acute effects of ethanol on pharmacologically isolated kainate receptors in cerebellar granule neurons: comparison with NMDA and AMPA receptors. *J. Neurochem.*, 71: 1777-1780, 1998b.
- Valenzuela CF, Cardoso RA, Lickteig RL, Browning MD, Nixon KM. Acute effects of ethanol on recombinant kainate receptors: lack of role of protein phosphorylation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 1998a.
- Valenzuela CF, Cardoso RA. Acute effects of ethanol on kainate receptors with different subunit compositions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288: 1199-1206, 1999.
- Valenzuela CF. Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol Health Res. World*, 21: 144-148, 1997.
- Vassiljev V, Kalda A, Pokk P, Vali M, Zharkovsky A. The effects of the nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazol on ethanol pharmacokinetics in rats after acute and chronic ethanol administration. *Alcohol Alcohol*, 33: 609-615, 1998.
- Venkov CD, Myers PR, Tanner MA, Su M, Vaughan DE. Ethanol increases endothelial nitric oxide production through modulation of nitric oxide synthase expression. *Thromb. Haemost.*, 81: 638-42, 1999.
- Vianna LA, Monteiro MG. Usefulness of the CAGE questionnaire for the detection of alcohol-related problems among the causes of death in women from Diadema (SP) in the years 1985-1986. *AMB Rev. Assoc. Med. Bras.*, 37: 139-142, 1991.
- Vignes M, Clarke VRJ, Parry MJ, Bleakman D, Lodge D, Ornstein PL, Collingridge GL. The GluR5 subtype of kainate receptor regulates excitatory synaptic transmission in areas CA1 and CA3 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 37: 1269-1277, 1998.
- Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46: 755-784, 1992.
- Vincent SR, Williams JA, Reiner PB, el-Husseini A el-D. Monitoring neuronal NO release in vivo in cerebellum, thalamus and hippocampus. *Prog. Brain Res.*, 118: 27-35, 1998.
- Volke V, Soosaar A, Kõks S, Bourin M, Männistö PT, Vasar E. 7-nitroindazol, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacology*, 131: 399-405, 1997.
- Vyklicky LJr., Benveniste M, Mayer ML. Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurons. *J. Physiol. (Lond)*, 428: 313-331, 1990.
- Walker DW, Hunter BE, Abraham WC. Neuroanatomical and functional deficits subsequent to chronic ethanol administration in animals. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 5: 267-282, 1981.
- Wang YX, Lim SL, Pang CC. Increase by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) of resistance to venous return in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 114: 1454-8, 1995.
- Watkins JC, Evans RH. Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21: 165-204, 1981.
- Weiner JL, Duwiddie TV, Valenzuela CF. Ethanol inhibition of synaptically evoked kainate responses in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Mol. Pharmacol.*, 56: 85-90, 1999.
- Wilke N, Sganga M, Barhite S, Miles MF. Effects of alcohol on gene expression in neural cells. In: Jansson B, Jörnvall H, Rydberg U., Terenius L, Vallee BL (Eds): *Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse*. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p 49-59, 1994.

- Williams K, Chao J, Kashiwagi K, Masuko T, Igarashi K. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by glycine: role of an aspartate residue in the M3-M4 loop of the NR1 subunit. *Mol. Pharmacol.*, 50: 701-8, 1996.
- Winkler A, Mahal B, Kiiianmaa K, Zieglansberger W, Spanagel R. Effects of chronic alcohol consumption on the expression of different NR1 splice variants in the brain of AA and ANA lines of rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 72: 166-175, 1999.
- Wirkner K, Poelchen W, Koles L, Muhlberg K, Scheibler P, Allgaier C, Illes P. Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels. *Neurochem. Int.*, 35: 153-162, 1999.
- Woodward JJ. Overview of the effects of alcohol on the cerebral nervous system. *Neurochem. Intern.*, 35: 93-94, 1999.
- Wroblewski JT, Danysz W. Modulation of glutamate receptors: Molecular mechanisms and functional implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29: 441-474, 1989.
- Xia J, Simonyi A, Sun GY. Chronic ethanol and iron administration on iron content, neuronal nitric oxide synthase, and superoxide dismutase in rat cerebellum. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23: 702-707, 1999.
- Yildiz F, Ulak G, Erden BF, Gacar N. Anxiolytic-like effects of 7-nitroindazole in the rat plus-maze test. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 65: 199-202, 2000.
- Yoshimura M, Wu PH, Kirstein SL, Freund RK, Palmer MR, Hoffman PL, Tabakoff B. Effects of ethanol on transgenic mice that overexpress type 7 adenylyl cyclase in brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23(5, Supp): 92A, 1999.
- Yun SH, Huh K, Jung MW. Selective enhancement of non-NMDA receptor-mediated responses following induction of long-term potentiation in entorhinal cortex. *Synapse*, 35: 1-7, 2000.
- Zaleski MJB, Nunes-Filho JR, Lemos T, Morato GS. GABA_B receptors play a role in the development of tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology*, submetido à publicação.
- Zhuo M, Small SA, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long term synaptic enhancement in hippocampus. *Science*, 260: 1946-1950, 1993.
- Zima T, Druga R, Stipek S. The influence of chronic moderate ethanol administration on NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase) activity in rat brain. *Alcohol Alcohol*, 33: 341-346, 1998.
- Zukin RS, Bennett MVL. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.*, 18: 306-313, 1995.