



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Adriana Dias Elpo Barbosa

**Influência dos neuroesteróides sobre a tolerância
ao etanol em camundongos**

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

Florianópolis 1999.

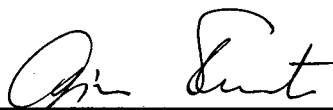
**“INFLUÊNCIA DOS NEUROESTERÓIDES SOBRE A
TOLERÂNCIA AO ETANOL EM CAMUNDONGOS”**

POR

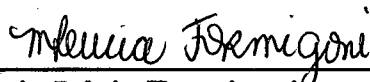
ADRIANA DIAS ELPO BARBOSA

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final pela Banca Examinadora em
sessão de defesa pública em 26 de Março
de 1999.**

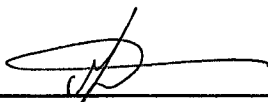
Banca Examinadora:



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



**Maria Lúcia Formigoni
(UNIFESP/SP -Membro Titular)**



**Tadeu Lemos
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



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

Florianópolis, 26 de Março de 1999.

*" A personalidade é coisa assaz misteriosa.
Nem sempre podemos analisar o homem pelo que
faz: às vezes observa a lei e, no entanto, não
possui valor, outras, infringe-as, e no entanto
é grande. "*

(Oscar Wilde)

Dedicatória Especial

*Ao meu marido Cicero Alessandro
Teixeira Barbosa, por dar sentido a todos os
momentos da minha vida.*

*"Uma alegria compartilhada se transforma
em dupla alegria; uma pena compartilhada,
em meia pena"*

(Provérbio Sueco)

Dedicatória

*A minha orientadora Dra. Gina
Struffaldi Morato. "O que o mestre é
vale mais do que os ensinamentos do
mestre"*

(Karl Menninger)

Agradecimentos

À professora Dra. Gina Struffaldi Morato, pela orientação, apoio e incentivo durante o mestrado.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia da UFSC, em especial ao Prof. Dr. Tadeu Lemos e Prof. Dr. Antônio Pádua Carobrez, pela atenção e contribuição, no decorrer desta formação profissional.

Aos colegas de laboratório, em especial à Patrícia, Marcos e Elisabeth, pela amizade e apoio, especialmente nos momentos em que mais precisei.

A todos os colegas da pós-graduação: Alessandra, Eduardo, Elke, Rafaela e Nelson pela amizade, carinho e apoio, que foram fundamentais em todos os momentos.

A todos os funcionários do departamento pela convivência agradável.

Aos meus pais e meus irmãos pelo amor, carinho e compreensão.

SUMÁRIO

<i>SUMÁRIO</i>	vi
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	ix
<i>LISTA DE FIGURAS E TABELA</i>	xi
<i>RESUMO</i>	xiii
INTRODUÇÃO	1
ETANOL E TOLERÂNCIA.....	1
METABOLISMO DO ETANOL.....	7
MECANISMOS DE AÇÃO DO ETANOL.....	8
AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS.....	10
AMINOACIDOS INIBITÓRIOS.....	15
NEUROESTERÓIDES.....	20
BIOSSÍNTESE.....	20
MECANISMOS DE AÇÃO DOS NEUROESTERÓIDES.....	23
NEUROESTERÓIDES, APRENDIZAGEM E MEMÓRIA.....	27
OBJETIVOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS	31
EQUIPAMENTOS.....	31
ANIMAIS.....	31
DROGAS.....	32
PROCEDIMENTO GERAL.....	32
DOSAGEM ALCOÓLICA.....	34
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35

EXPERIMENTOS E RESULTADOS	36
Experimento 1: <i>Indução de tolerância rápida ao etanol com o emprego de uma única dose</i>	37
Experimento 2: <i>Efeito da D-cicloserina sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod</i>	39
Experimento 3: <i>Efeito do sulfato de pregnenolona sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod</i>	42
Experimento 4: <i>Efeito do sulfato de dehidroepiandrosterona sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod</i>	46
Experimento 5: <i>Efeito da epipregnanolona sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod</i>	50
Experimento 6: <i>Efeito da administração prévia do (+)MK-801 sobre a facilitação da tolerância rápida ao etanol pelo sulfato de pregnenolona</i>	54
Experimento 7: <i>Efeito da administração prévia do (+)MK-801 sobre a facilitação da tolerância rápida ao etanol pelo sulfato de dehidroepiandrosterona</i>	57
Experimento 8: <i>Efeito do muscimol sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod</i>	60

Experimento 9: <i>Efeito da administração prévia do sulfato de pregnenolona sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo muscimol</i>	64
Experimento 10: <i>Efeito da administração prévia do sulfato de dehidroepiandrosterona sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo muscimol</i>	67
Experimento 11: <i>Efeito da administração da epipregnanolona sobre a indução de tolerância crônica ao etanol através do tratamento crônico</i>	70
Experimento 12: <i>Efeito da administração do sulfato de pregnenolona sobre a indução de tolerância crônica ao etanol através do tratamento crônico</i>	73
Experimento 13: <i>Dosagem do Álcool</i>	75
DISCUSSÃO	78
CONCLUSÕES	92
ABSTRACT	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Ácido 3-aminopropano sulfônico
ADH	Álcool desidrogenase
ACPD	Ácido trans-1-amino-ciclopentano-1-3-dicarboxílico
ALDH	Aldeído desidrogenase
AP4	1-2-amino-4-fosfonobutirato
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isopropionato
ANOVA	Análise de variância
CACA	Ácido cis-4-aminocrotônico
DC	D-cicloserina
DMCM	Metil 6,7-dimetoxi-4-etil- β -carbonila-3-carboxilado
DHEAS	Sulfato de dehidroepiandrosterona
EPI	Epipregnanolona
e.p.m.	Erro padrão da média
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
3β-HSD	3 β -hidroxiesteróide desidrogenase
3α-HOR	3 α -hidroesteróides oxidoreductase
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
LTP	Potenciação de longa duração

MEOS	Sistema microssômico de oxidação do etanol
MK-801	Dizolcilpina
MUSC	Muscimol
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato
PS	Sulfato de pregnenolona
r.p.m.	Rotação por minuto
SNC	Sistema nervoso central
TBPS	Butibiciclofosforotionato
THIP	Isoguvacina, 4,5,6,7, tetrahidroisoxasol [5,4-c] piridin-3-ol
TR	Tolerância rápida

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Modelo esquemático do receptor NMDA, com alguns dos seus sítios de ligação.....	13
Figura 2: Modelo esquemático do receptor GABA-A, com alguns dos seus sítios de ligação.....	18
Figura 3: Biossíntese e metabolismo de neuroesteróides no cérebro de rato.....	21
Figura 4: Desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida por diferentes doses únicas de etanol em camundongos, testados no rota-rod.....	38
Figura 5: Efeito de diferentes doses de etanol sobre a tolerância rápida, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.....	39
Figura 6: Efeito da D-cicloserina no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.....	41
Figura 7: Efeito das diferentes doses de D-cicloserina sobre a tolerância rápida induzida por etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.....	42
Figura 8: Efeito do sulfato de pregnenolona no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.....	45
Figura 9: Efeito das diferentes doses de sulfato de pregnenolona sobre a tolerância rápida por em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.....	46
Figura 10: Efeito do sulfato de dehidroepiandrosterona no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.....	49
Figura 11: Efeito das diferentes doses de sulfato de dehidroepiandrosterona sobre a tolerância rápida por em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.....	50
Figura 12: Efeito da epipregnanolona no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.....	53

Figura 13: Efeito das diferentes doses da epipregnanolona sobre a tolerância rápida por em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.....	54
Figura 14: Efeito da administração prévia do MK-801 sobre a facilitação do sulfato de pregnenolona na tolerância rápida ao etanol.....	57
Figura 15: Efeito da administração prévia do MK-801 sobre a facilitação do sulfato de dehidroepiandrosterona na tolerância rápida ao etanol.....	60
Figura 16: Efeito do muscimol no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.....	63
Figura 17: Efeito das diferentes doses de muscimol sobre a tolerância rápida induzida por etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.....	64
Figura 18: Efeito da administração prévia do sulfato de pregnenolona sobre a interferência do muscimol na tolerância rápida ao etanol.....	67
Figura 19: Efeito da administração prévia do sulfato de dehidroepiandrosterona sobre a interferência do muscimol na tolerância rápida ao etanol.....	70
Figura 20: Efeito da epipregnanolona no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol.....	72
Figura 21: Efeito do sulfato de pregnenolona no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol.....	75
Tabela 1: Efeito da concentração de etanol no sangue de camundongos no teste do rota-rod. Quatro grupos de animais foram pré-tratados com salina, sulfato de pregnenolona, sulfato de dehidroepiandrosterona e (+)MK-801 (i.p.) 30 min antes da administração de etanol (1,9 g/kg i.p.).....	77
Tabela 2: Efeito da concentração de etanol no sangue de camundongos no teste do rota-rod. Três grupos de animais foram pré-tratados com salina, epipregnanolona e muscimol (i.p.) 30 min antes da administração de etanol (2,25 g/kg i.p.).....	77

RESUMO

Tem sido sugerido que a tolerância ao etanol é um dos fatores associados com a dependência a esta droga. A tolerância rápida, é vista em resposta a uma segunda dose de etanol administrada cerca de 8 a 24 horas após a primeira dose ter sido metabolizada. O desenvolvimento da tolerância rápida, bem como da tolerância crônica ao etanol, pode ser influenciado pelos processos de aprendizagem e memória. Por outro lado, muitos estudos têm demonstrado que o etanol pode estimular a transmissão GABAérgica e bloquear a transmissão glutamatérgica, no sistema nervoso central.

Considerando a importância da aprendizagem nos mecanismos de tolerância, e que os neuroesteróides modulam os sistemas NMDA e GABA-A, no presente trabalho, investigou-se a influência dos neuroesteróides no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Primeiramente foi caracterizado o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora ao etanol, em camundongos suíços machos submetidos ao teste do rota-rod. Os animais foram testados no rota-rod aos 30, 60 e 90 minutos após as injeções de etanol. Várias doses de etanol foram utilizadas (1,9 a 3,0 g/kg), sendo que as doses de 1,9 de etanol, que não promoveu tolerância rápida e de 2,25 g/kg, que promoveu tolerância rápida, foram escolhidas para os demais experimentos.

Os experimentos com neuroesteróides mostraram que o pré-tratamento com sulfato de pregnenolona (0,03 a 0,15 mg/kg) e sulfato de dehidroepiandrosterona (0,05 a 0,20 mg/kg) facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (1,9 g/kg) de forma dependente da dose. Já o pré-tratamento com epipregnanolona (0,05 a 0,15 mg/kg), um modulador positivo do receptor GABA-A, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (2,25 g/kg) de forma dependente da dose. O (+)MK-801 (0,06 mg/kg), um antagonista de receptores NMDA, quando administrado previamente ao sulfato de pregnenolona, impediu a facilitação da tolerância rápida ao etanol (1,9 g/kg), mas não foi capaz de impedir a facilitação da tolerância rápida

promovida pelo sulfato de dehidroepiandrosterona. O pré-tratamento com sulfato de pregnenolona e sulfato de dehidroepiandrosterona administrado antes do muscimol (0,60 mg/kg), impediu o bloqueio da tolerância rápida ao etanol (2,25 g/kg).

Estudos têm sugerido que a tolerância rápida pode ser usada como um modelo preditivo da tolerância crônica, devido à similaridade observada em ratos nos modelos de tolerância rápida e crônica. No presente estudo também foi observado o efeito de neuroesteróides no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol (2,5 g/kg) em camundongos submetidos a um teste de coordenação motora, no rota-rod. Os resultados mostraram que o tratamento prévio com epipregnanolona (0,15 mg/kg), durante quatro dias, foi capaz de bloquear o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol, no Dia 5. Já o sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) administrado pelo mesmo período, facilitou significativamente o desenvolvimento de tolerância.

Os resultados do presente estudo demonstram que os neuroesteróides, sulfato de pregnenolona, sulfato de dehidroepiandrosterona e epipregnanolona, influenciam o desenvolvimento da tolerância aos efeitos do etanol, em camundongos, possivelmente por mecanismos relacionados ao sistema NMDA e ao sistema GABA-A. Nossos resultados reforçam a hipótese de que a tolerância rápida pode sofrer influência do aprendizado, uma vez que há evidências do envolvimento desses sistemas na aprendizagem. Nossos resultados também sugerem que a tolerância rápida pode ser usada como um modelo preditivo da tolerância crônica, embora não esteja comprovado que a tolerância rápida e a crônica sejam produzidas pelo(s) mesmo(s) processo(s).

INTRODUÇÃO

ETANOL E TOLERÂNCIA

O álcool ou etanol é considerado como uma das principais drogas de abuso, razão pela qual tem emergido como um dos mais relevantes problemas em saúde pública e social (Williams *et al.*, 1992). Esta droga produz inúmeros efeitos no sistema nervoso central (SNC), incluindo intoxicação, dependência física e danos cerebrais (Tabakoff e Hoffman, 1989). Além disso, pode também manifestar vários efeitos agudos no organismo, como por exemplo, depressão no SNC, perda dos reflexos e incoordenação motora, alterações na temperatura corporal e estimulação da atividade locomotora (Crabbe *et al.*, 1979; Morato e Barreto, 1996; Barreto *et al.*, 1998).

Muitos estudos têm sido feitos para elucidar estes fenômenos fisiológicos e comportamentais causados pelo álcool. Durante muitos anos, as pesquisas a respeito do álcool têm dedicado uma grande parte de sua atenção para o fenômeno da tolerância adquirida, a qual é definida como um processo adaptativo do organismo, onde os efeitos de uma droga diminuem

após um período em que ela é administrada repetidamente (Lê, 1990). Uma razão para este contínuo interesse, é a hipótese de que a tolerância ao etanol é um dos fatores associados com a dependência a esta droga (Kalant *et al.*, 1971; Kalant, 1998; Tabakoff *et al.*, 1986; Morse e Flavin, 1992), contribuindo assim para manutenção e agravamento da dependência da mesma (Erwin *et al.*, 1980; Lê e Kiianmaa, 1988).

O escalonamento de doses, decorrente do desenvolvimento da tolerância, pode aumentar a probabilidade de ocorrência de danos orgânicos. Neste sentido, é bastante reconhecido o potencial tóxico do etanol para diversos órgãos ou sistemas. Entre as disfunções que seu uso crônico pode vir a causar, incluem-se alterações hepatocelulares, cardíacas, endócrinas, reprodutivas, do sistema gastro-intestinal, além de prejuízos nos processos de memória e aprendizagem (Kreeb, 1987; Mello, 1987; Raimond, 1996).

De acordo com os mecanismos envolvidos na tolerância, esta tem sido separada em duas amplas categorias: funcional e disposicional. A tolerância funcional, resulta de uma redução na sensibilidade do tecido alvo, de modo que a mesma concentração da droga não mais produz o mesmo efeito. A tolerância disposicional resulta de alterações na farmacocinética de uma droga, de modo que a mesma dose resulta em menor quantidade da droga no sítio de ação. Frequentemente, ambos os fatores, disposicional e funcional,

contribuem para o grau de tolerância total na maioria dos casos (Kalant e Khanna, 1990; Neil, 1990; Tabakoff e Hoffman, 1996).

Em relação ao etanol, o desenvolvimento da tolerância parece não ser resultante de alterações na absorção, distribuição ou eliminação, sendo que o mais freqüentemente encontrado é uma aceleração do seu metabolismo chamado de tolerância metabólica. Esta está associada a um grupo de enzimas específicas que metabolizam o álcool e são ativadas após a ingestão crônica. A ativação das enzimas aumenta a degradação do álcool e reduz a duração de seus efeitos no corpo.

Do ponto de vista temporal, três tipos de tolerância podem ser identificados: a mais amplamente estudada é a *tolerância crônica*, que ocorre gradualmente, após dias, semanas ou meses de exposição (Kalant e Khanna, 1990; Kalant, 1998; Chandler *et al.*, 1998) e ambos os componentes disposicional e funcional estão geralmente incluídos neste tipo de tolerância. Há estudos que mostram o desenvolvimento da tolerância cruzada entre o álcool e outras drogas hipnótico sedativas, como barbitúricos e benzodiazepínicos (Khanna *et al.*, 1991a, 1992a). A *tolerância aguda* é vista durante o curso de uma simples exposição à droga (Kalant e Khanna, 1990; Kalant, 1998; Chandler *et al.*, 1998) e foi descrita originalmente para o álcool por Mellanby (1919). Neste tipo, a sensação de intoxicação

experimentada após o consumo do álcool é alterada (Vogel-Sprott, 1979), e a natureza farmacodinâmica deste tipo de tolerância foi demonstrada por LeBlanc *et al* (1975). A *tolerância rápida* (TR), é vista em resposta a uma segunda dose de etanol administrada cerca de 8 a 24 h após a primeira dose ter sido metabolizada (Crabbe *et al.*, 1979; Leblanc *et al.*, 1976a.; Bitrán e Kalant, 1991; Khanna *et al.*, 1996). Esta forma de tolerância parece envolver principalmente mecanismos funcionais, e sua existência implica que alguma mudança produzida pela primeira experiência à droga permaneceu, mesmo após a droga ter desaparecido do organismo.

Devido à similaridade observada em ratos nos modelos de tolerância rápida e tolerância crônica, tem sido sugerido que a tolerância rápida pode ser usada como um modelo preditivo da tolerância crônica e da tolerância crônica cruzada (Khanna *et al.*, 1991a, 1992a; Chan *et al.*, 1985). Khanna *et al* (1992a), mostraram que em relação aos efeitos de hipotermia e incoordenação motora, o pré-tratamento com etanol resultou em tolerância cruzada para vários álcoois (n-propanol, n-butanol e t-butanol), benzodiazepínicos (clordiazepóxido, diazepam e flunitrazepam) e também para o barbital e fenobarbital, mas não resultou em tolerância rápida cruzada para o pentobarbital, secobarbital e tiopental. Estes resultados são consistentes com os resultados obtidos nos estudos da tolerância crônica e

tolerância crônica cruzada. Assim, os experimentos com este tipo de tolerância, podem produzir as mesmas informações obtidas com a tolerância crônica que requer muito mais tempo e recursos.

Recentemente, tem sido fortemente evidenciada a hipótese de que a aprendizagem atua num importante papel no desenvolvimento da tolerância aos efeitos do etanol (Kalant, 1985). Na verdade, o desenvolvimento da tolerância é facilitado pela aprendizagem associativa (condicionamento clássico ou Pavloviano) (Lê *et al.*, 1979; Siegel, 1983) e aprendizagem operante (Leblanc *et al.*, 1973; Lê *et al.*, 1989; Lê e Kalant, 1992) sob a influência do etanol. Foi demonstrado que o desenvolvimento da tolerância ao etanol pode ser acelerado quando os animais praticam o teste enquanto intoxicado (Bitrán e Kalant, 1991; Chen, 1968; Leblanc *et al.*, 1973; Lê e Kalant, 1992). Grupos de ratos recebendo injeções diárias de etanol *antes* do teste de performance desenvolvem tolerância mais rapidamente do que os grupos que receberam etanol *após* o teste. Portanto, a prática de um teste sob a influência do etanol é um importante fator no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol. Muitos estudos demonstraram que a aquisição da tolerância rápida bem como da tolerância crônica aos efeitos do etanol apresentam muitas propriedades semelhantes com os processos de

aprendizagem e memória (ex.: Bitrán e Kalant, 1991; Morato e Khanna, 1996).

O desenvolvimento da tolerância aos efeitos do álcool pode ser acelerado quando as repetidas administrações ocorrem no mesmo ambiente. Este efeito tem sido chamado de tolerância dependente do ambiente. Assim, ratos que regularmente recebem álcool em um ambiente e placebo em ambiente diferente, demonstram tolerância aos efeitos produzidos pelo álcool somente no ambiente específico em que o álcool foi administrado (Mansfield e Cunningham, 1980; Melchior e Tabakoff, 1985). No entanto, a exposição a grandes quantidades de álcool pode conduzir ao desenvolvimento da tolerância funcional independente da influência do ambiente (Melchior e Tabakoff, 1981).

Além disso, há evidências de que os fatores genéticos, psicológicos e sociais podem interagir entre si, aumentando ou diminuindo a vulnerabilidade à dependência ao álcool. Portanto, o risco da dependência ao álcool é determinado por uma completa interação dos fatores genéticos e ambientais (Cloninger, 1987).

METABOLISMO DO ETANOL

Os aspectos do metabolismo do álcool têm sido estudados extensivamente desde o ano de 1950. Há evidências de que o metabolismo é aumentado após a ingestão crônica de álcool, por um grupo de enzimas específicas, resultando na diminuição da duração dos seus efeitos.

Após a ingestão do etanol, este é rapidamente absorvido pelo estômago e uma fração substancial é removida do sangue por metabolismo de primeira passagem. O álcool é quase que totalmente metabolizado no fígado, pela ação da enzima álcool desidrogenase presente no citoplasma. Esta enzima oxida o etanol e, simultaneamente, reduz o NAD^+ em NADH , levando a acumulação de acetaldeído e NADH no fígado. A taxa de metabolização depende mais da disponibilidade de NAD^+ do que da saturação enzimática (Tabakoff *et al.*, 1996). O acetaldeído é igualmente oxidado pela aldeído desidrogenase (ALDH), transformando-se em ácido acético, que por sua vez é ativado a acetil-coenzima A, ingressando assim no ciclo metabólico dos ácidos tricarbóxicos (de Krebs) e convertendo-se, finalmente, em água e dióxido de carbono (Lieber, 1994).

No entanto, outras enzimas podem estar envolvidas no metabolismo hepático do álcool, incluindo o sistema microssômico de oxidação do etanol

(MEOS) e a catalase. Em 1965, foi relatado que o álcool poderia ser oxidado pelo MEOS, presente no retículo endoplasmático rugoso. Este sistema contém a enzima microsossomal citocromo P-4502E1 (CYP2E1), a qual é induzida após ingestão crônica de etanol, e além disso, requer como cofatores o NADPH (nicotinamida-adenosina-dinucleotideo-fosfato) e oxigênio molecular (Tabakoff *et al.*, 1996; Carr *et al.*, 1996). O papel da catalase no metabolismo do álcool tem sido considerado de menor significância fisiológica, devido a limitada produção de peróxido de hidrogênio no fígado (Salmela *et al.*, 1996). Contudo, alguns estudos indicam um significativo papel da catalase no metabolismo do etanol (Gill *et al.*, 1992; Aragon *et al.*, 1992). Esta enzima encontra-se nos peroxissomos e sua atividade parece aumentar após a ingestão de grandes quantidades de álcool.

MECANISMOS DE AÇÃO DO ETANOL

O abuso de álcool produz conseqüências neurobiológicas sérias. Por isso muitos estudos têm se dedicado ao melhor entendimento dos mecanismos de ações do etanol. Há evidências de que o álcool exerça seus

efeitos no sistema nervoso central através das membranas lipídicas, tornando-a mais fluida e, portanto alterando a permeabilidade das membranas neuronais (Tabakoff e Hoffman, 1983; Goldstein, 1979; Hunt e Majchrowicz, 1985). Além disso, o etanol pode alterar a função de canais de cálcio dependentes de voltagem, por inibição destes canais, alterando a excitabilidade da membrana (Hoffman *et al.*, 1989; Leslie *et al.*, 1990).

Ademais, o consumo de álcool influencia os processos de transmissão no sistema nervoso central, ativando ou inibindo, a liberação de vários neurotransmissores, tais como a acetilcolina (Erikson e Graham, 1973), a serotonina (Tabakoff *et al.*, 1977), a dopamina (Kiiianmaa e Tabakoff, 1993) e noradrenalina (Shefiner e Tabakoff, 1985). A interação entre o etanol e o sistema de transmissores monoaminérgicos é complexa. Os mecanismos dopaminérgicos e noradrenérgicos, juntamente com o sistema opióide endógeno, parecem estar envolvidos nos efeitos das vias de recompensa, atuando no reforço positivo, enquanto o sistema serotoninérgico atua no reforço negativo. Estudos sobre o sistema colinérgico central têm proporcionado um melhor entendimento dos efeitos prejudiciais do etanol na aprendizagem e memória, tendo sido relatado uma redução na atividade deste sistema em pacientes dependentes de álcool (Nevo e Hamon, 1995).

Nos últimos anos, muitos estudos têm demonstrado que o etanol age sobre a função de certas proteínas de ligação de membranas, como por exemplo, os receptores do glutamato (excitatório) e do ácido γ -aminobutírico (inibitório) (Tabakoff e Hoffman, 1991; Nevo e Hamon, 1995; Crews *et al.*, 1996). No presente estudo, será dado maior relevância ao papel dos sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos.

AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS

O glutamato é um dos vários aminoácidos endógenos presentes no sistema nervoso central (SNC), os quais, acredita-se, atuam como neurotransmissores excitatórios e por isso são chamados de aminoácidos excitatórios. O glutamato é o mais abundante e o mais estudado aminoácido excitatório endógeno, sendo o principal neurotransmissor liberado por neurônios piramidais no córtex cerebral e em várias áreas do hipocampo (Cotman *et al.*, 1987; Collingridge e Lester, 1989). Por isso, não é surpresa que este neurotransmissor exerça uma importante função na memória e na aprendizagem.

Os aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato e o aspartato, são alvos de crescente interesse por parte de cientistas empenhados em investigar seu possível envolvimento na patogênese de várias desordens neurológicas e psiquiátricas, algumas das quais estão associadas à perda de memória e da capacidade de aprendizagem (McEntee e Crook, 1993).

O glutamato e seus correlatos agem em receptores farmacologicamente distintos, caracterizados de acordo com sua afinidade relativa a agonistas e antagonistas exógenos seletivos. São reconhecidos cinco tipos de sítios para os aminoácidos excitatórios, são eles: o N-metil-D-aspartato (NMDA); α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isopropionato (AMPA); cainato; 1-2-amino-4-fosfonobutirato (AP4); ácido trans-1-amino-ciclopentano-1-3-dicarboxílico (ACPD) (Hollmann e Heinemann, 1994; McEntee e Crook, 1993; Watkins *et al.*, 1990).

Os receptores glutamatérgicos estão divididos em duas grandes famílias, de acordo com o mecanismo de transdução: os receptores metabotrópicos e os receptores ionotrópicos (Jargensen *et al.*, 1995). Os receptores metabotrópicos estão acoplados a efetores intracelulares através de proteína G, assim como os receptores muscarínicos e o receptor GABA-B. Os receptores ionotrópicos pertencem à família dos receptores acoplados a canais iônicos. Os subtipos destes receptores são: NMDA, AMPA e o

cainato. Enquanto os receptores AMPA e cainato medeiam as neurotransmissões sinápticas excitatórias rápidas, as transmissões mediadas pelo receptor NMDA são do tipo lentas (Collingridge e Lester, 1989).

O receptor NMDA é o mais conhecido de todos os receptores glutamatérgicos (Monaghan e Cotman, 1986) e está acoplado a um canal iônico de membrana que é permeável ao Na^+ , K^+ e ao Ca^{++} . Este canal se constitui numa formação heteromérica, dividindo-se em duas classes de subunidades deste receptor, a subunidade NMDAR1 (amplamente distribuída no SNC) e a NMDAR2 (restritamente distribuída, que é subdividida em: NMDAR2_A, NMDAR2_B, NMDAR2_C e NMDAR2_D). Estas formações determinam as características fisiológicas e farmacológicas dos receptores. Estudos mostram que a subunidade NMDAR2_B está relacionada à propriedade do etanol em inibir o receptor NMDA (Yang *et al.*, 1996; Faingold *et al.*, 1998).

O complexo receptor NMDA (Figura 1) possui pelo menos, seis sítios distintos de ligação para ligantes endógenos que influenciam na probabilidade de abertura do canal: um sítio de reconhecimento para o glutamato; um sítio modulatório para glicina insensível à estriquinina (Monaghan *et al.*, 1989; Thomson, 1989); dois sítios distintos para cátions divalentes (magnésio e zinco) (Mayer e Westbrook, 1987); um sítio

regulatório das poliaminas, que favorece a ativação do receptor (Johnson e Ascher, 1987) e outro para os antagonistas do receptor NMDA, como a fenciclidina, cetamina ou o MK-801 (Morato e Khanna, 1996). Estudos mostram uma região sensível ao pH, que pode resultar em uma interação com o íon hidrogênio (Lipton e Rosenberg, 1994) e um sítio sensível ao óxido nítrico (Recasens, 1995).

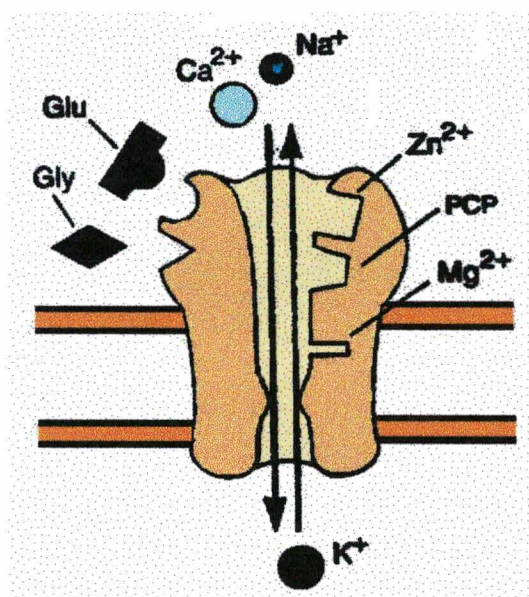


Figura 1. Modelo esquemático do receptor NMDA, com alguns dos seus sítios de ligação. Este receptor possui sítios para o glutamato ou o NMDA; um sítio para glicina; dois sítios para cátions divalentes, sendo um de magnésio (Mg^{+2}) e outro de zinco (Zn^{+2}); um sítio regulatório das poliaminas e um sítio para antagonistas não competitivos do receptor NMDA (MK-801 e cetamina) (adaptada de Kandel, 1994).

Há evidências de que a potenciação de longa duração (LTP), considerada como a base neuronal da memória, geralmente avaliada em

fatias do hipocampo de rato (Collingridge *et al.*, 1992), está diretamente ligada ao sistema glutamatérgico (Bliss e Collingridge, 1993). O envolvimento do receptor NMDA (que promove o aumento da concentração de cálcio pós-sináptica, necessária a LTP) nos processos de aprendizagem e memória, tem sido demonstrado pelo fato de que antagonistas deste receptor bloqueiam a LTP e prejudicam o aprendizado e a memória (Collingridge *et al.*, 1992; Estall *et al.*, 1993; Izquierdo, 1991; 1995). Estudos *in vitro* mostram que o etanol inibe o influxo de cálcio mediado pelo receptor NMDA (inibindo a transmissão glutamatérgica), atuando como um antagonista deste receptor (Lovinger *et al.*, 1989; Hoffman e Tabakoff, 1994; Schummers *et al.*, 1997). É sugerido que este antagonismo seja responsável pela diminuição da LTP no hipocampo (Lovinger *et al.*, 1989; Schummers *et al.*, 1997).

Recentemente, existem informações a respeito do envolvimento do receptor NMDA nas ações do etanol e a participação deste sistema no desenvolvimento da tolerância ao etanol (Szabó *et al.*, 1994; Barreto *et al.*, 1998). Estudos demonstram que a administração de antagonistas não-competitivos do receptor NMDA, como a dizocilpina (MK-801) e cetamina, podem bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos de hipotermia e incoordenação motora do etanol (Khanna *et al.*, 1991b; 1992b;

1993a), bem como a tolerância crônica (Khanna *et al.*, 1992c; 1994; Wu *et al.*, 1993). Há evidências de que a tolerância medida nestes estudos envolveria a aprendizagem (Bitrán e Kalant, 1991). Entretanto, a cetamina não afetou o desenvolvimento da tolerância aguda ao etanol no teste do “tilt-plane” (Khanna *et al.*, 1992c). Por outro lado, a D-cicloserina, um agonista do sítio da glicina, no receptor NMDA, que facilita a aprendizagem e a memória (Monaghan *et al.*, 1989), quando administrada previamente ao etanol, facilita o desenvolvimento da tolerância rápida (Khanna *et al.*, 1993b; 1995).

AMINOÁCIDOS INIBITÓRIOS

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é considerado como um transmissor do sistema nervoso central e está amplamente distribuído no cérebro de mamíferos, atuando em sítios pós-sinápticos (McBurney and Barker, 1978) e pré-sinápticos (Nistri and Constanti, 1979) aumentando a permeabilidade da membrana aos íons cloreto. As evidências de que o GABA é o principal neurotransmissor inibitório no cérebro (Ito, 1976) levaram investigadores a explorar um possível papel do GABA nas ações do etanol.

Existem três subtipos de receptores GABA: os receptores GABA-A, que estão diretamente relacionados a um canal de cloreto e são inibidos pelo alcalóide bicuculina (Johnston, 1996), possuindo sítios de ligação para moduladores como benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides e etanol. Os receptores GABA-B, que estimulam a produção de segundos mensageiros via proteína G, modulando canais de cálcio e potássio, sendo insensíveis à bicuculina (um antagonista clássico GABA-A) e, tendo como agonista seletivo o (-)baclofeno e como antagonista seletivo o saclofeno (Kerr e Ong, 1995). Há talvez muitos subtipos de receptores GABA-B, dois dos quais foram recentemente clonados (Kaupmann *et al.*, 1997). Estes receptores parecem ter similaridades estruturais com os receptores metabotrópicos do glutamato. Os receptores GABA-C, estão ligados a canais de cloreto, sendo insensíveis tanto à bicuculina quanto ao saclofeno, e tendo como agonista seletivo o CACA (ácido cis-4-aminocrotônico) (Johnston, 1994). Tais receptores medeiam a inibição lateral de respostas à luz na retina de vertebrados e também podem inibir a transmissão realizada nos terminais das células bipolares (Feigenspan *et al.*, 1993).

O complexo do receptor ionóforo GABA-A é uma glicoproteína heteropentamérica de aproximadamente 275 kDa composta de cinco subunidades α , β , γ , δ , ρ , e há 14 subunidades conhecidas que incluem as

subunidades: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ρ (Jhonston, 1996a; Davies *et al.*, 1997). Os receptores GABA-A reúnem-se predominantemente pela combinação das subunidades 2α e 2β (Davies *et al.*, 1997). A combinação das diferentes subunidades varia de acordo com as diferentes funções do receptor em diferentes regiões do cérebro. Cada subunidade contém possivelmente quatro domínios transmembranares helicoidais, de caráter hidrofóbico, que formam no seu interior um canal iônico com especificidade aos íons cloreto. Estudos mostram que as subunidade 2β e 2γ podem estar relacionadas à ação do etanol no receptor GABA-A (Faingold *et al.*, 1998). Mihic *et al* (1997) têm sugerido que o sítio de ligação do etanol reside no segundo domínio transmembranar dos receptores GABA-A.

O receptor GABA-A (Figura 2) possui um sítio de ligação para o GABA que, uma vez ligado, promove a abertura do canal e conseqüentemente o influxo de íons cloreto. O canal de cloreto é parte integrante do complexo, sendo a ligação do GABA a um sítio específico no receptor, a responsável pela abertura desse canal. Uma variedade de agonistas também podem se ligar aos receptores GABA-A produzindo respostas semelhantes. Entre esses estão: o muscimol, THIP (isoguvacina, 4,5,6,7, tetrahidroisoxazol [5,4-c] piridin-3-ol), APS (ácido 3-aminopropano sulfônico), ácido imidazoleacético e o ácido β -hidróxi- α -amino-n-butírico. O

antagonista clássico dos receptores GABA-A é o convulsivante bicuculina. Entre os bloqueadores do canal de cloreto do receptor GABA-A, estão os convulsivantes TBPS (butibiciclofosforotionato) e a picrotoxina (Sieghart, 1992). O receptor GABA-A possui também sítios para ligação de moduladores, como as benzodiazepinas, barbitúricos e anestésicos esteróides que modulam a resposta à ligação do GABA e sua influência sobre a abertura dos canais de cloreto. As benzodiazepinas aumentam a ação do GABA por aumentar a frequência de abertura do canal (Rogers *et al.*, 1994), enquanto que os barbitúricos aumentam o tempo de abertura do canal (Mathers e Barker, 1980; Study e Barber, 1981; Jackson *et al.*, 1982; Macdonald *et al.*, 1989).

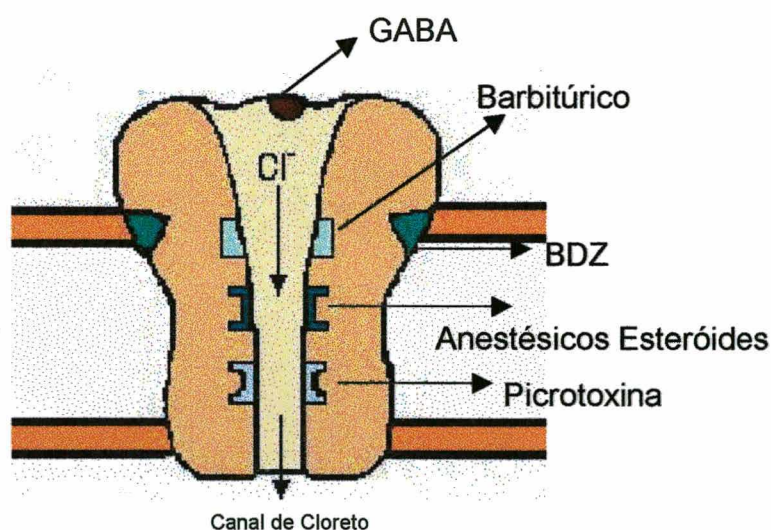


Figura 2. Modelo esquemático do complexo receptor GABA-A, com alguns dos seus sítios de ligação. Dentre estes, possui um sítio para o GABA; um sítio para picrotoxina; sítios para ligação de moduladores, como as benzodiazepinas, barbitúricos e anestésicos esteróides (adaptada de Kandel, 1994).

Estudos demonstram que a atividade GABAérgica tem papel fundamental na indução da LTP (Wigstrom e Gustafsson, 1985; Collingridge *et al.*, 1992), uma vez que a hiperpolarização causada pela liberação de GABA intensifica o bloqueio do receptor NMDA, por sítios regulatórios de íons Mg^{++} presentes no canal do complexo NMDA, reduzindo a liberação de glutamato. A LTP é sensível à inibição neuronal, mediada pelo GABA (Collingridge *et al.*, 1990), por agonistas do receptor GABA-A, como o diazepam (Sarter *et al.*, 1995) e o midazolam (Evans e Viola-McCabe, 1996). Entretanto, a LTP e a memória podem ser facilitadas por antagonistas GABA-A (Izquierdo e Medina, 1995) e por agonistas inversos do sítio de reconhecimento dos benzodiazepínicos, como o DMCM (metil 6,7-dimetoxi-4-etil- β -carbonila-3-carboxilado) (Seabrook *et al.*, 1998).

Há evidências de que o etanol potencializa as ações do GABA no receptor GABA-A (Tabakoff e Hoffmam, 1996), aumentando o influxo de íons cloreto mediado por este receptor após administração aguda, mas após exposição prolongada ao etanol, ambos etanol e GABA têm seus efeitos reduzidos no receptor, portanto, tanto a inibição quanto o influxo de cloreto são reduzidos (Grobin *et al.*, 1998). O efeito do etanol sobre este receptor pode contribuir para sua ação ansiolítica, sedativa (Allan e Harris, 1987; Allan *et al.*, 1991; Eckardt *et al.*, 1998) e para o prejuízo da aprendizagem e

memória (White *et al.*, 1997; Vandergriff *et al.*, 1995; Givens, 1995). Alguns estudos têm mostrado que o uso crônico de álcool, benzodiazepínicos e barbitúricos pode resultar em tolerância e tolerância cruzada entre estas drogas (Ticku, 1989; Khanna *et al.*, 1992a).

NEUROESTERÓIDES

BIOSSÍNTESE

O termo *neuroesteróide* tem sido aplicado a certos esteróides que podem ser sintetizados *de novo* e acumulados no sistema nervoso central independente de fontes periféricas (Baulieu, 1991). Normalmente são encontrados em baixas concentrações (nanomolares), no entanto, o stress e outras condições podem aumentar sua liberação (Paul e Purdy, 1992; Corpéchet *et al.*, 1983).

O precursor de todos os esteróides suprenais é o colesterol. A primeira etapa na síntese de neuroesteróides (Figura 3) é a conversão do colesterol em pregnenolona, por clivagem oxidativa da cadeia lateral. Essa oxidação é realizada por uma enzima mitocondrial, o complexo enzimático do citocromo P-450 (P-450_{scc}), encontrada predominantemente nas células

gliais (astrócitos tipo I e oligodendrócitos) (Robel e Baulieu, 1994; Michael *et al.*, 1996; Robel *et al.*, 1995). Tem sido demonstrado que a formação da pregnenolona nas células gliais é regulada pela estimulação de receptores benzodiazepínicos mitocondriais (MBRs), que facilitam o influxo de colesterol através da membrana mitocondrial (Costa *et al.*, 1994; McCauley *et al.*, 1995). Portanto, a esteroidogênese nervosa central parece estar relacionada à farmacologia benzodiazepínica.

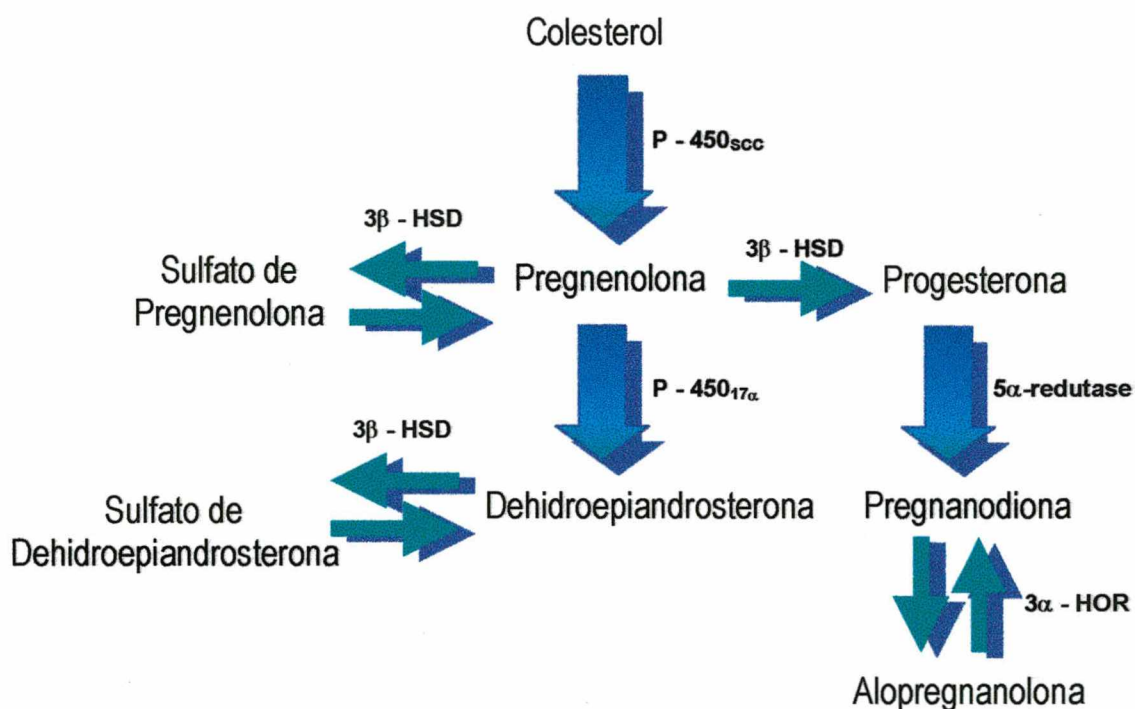


Figura 3. Biossíntese e metabolismo de neuroesteróides no cérebro de rato (adaptado de Robel e Baulieu, 1994).

Após formada a pregnenolona, vários caminhos podem ser ativados para formar neuroesteróides que atuam sobre sítios de reconhecimentos de esteróides localizados nas regiões transmembranares dos receptores. Esta pode ser convertida em progesterona pela ação da enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), sendo o trilostano (4 α -5-epoxi-17 β -hidroxi-3-oxo-5 α -androstano-2 α -carbonitrila, TRIL) um potente inibidor desta enzima (Potts *et al.*, 1978), prevenindo assim, a conversão da pregnenolona em progesterona. Existem três isoformas da enzima 3 β -HSD em ratos: as tipo I e II são expressas em tecidos adiposos, adrenais e gonadais, enquanto a tipo III é específica para o fígado. A progesterona por sua vez, é reduzida em vários metabólitos, como por exemplo, pregnanodiona e alopregnanolona, catalizada pelas enzimas 5 α -redutase e 3 α -hidroxiesteróide oxidoreductase (3 α -HOR), respectivamente.

A pregnenolona também pode ser convertida em dehidroepiandrosterona no cérebro de rato, provavelmente pela ação da enzima P-450_{17 α} (17 α -esteróide-hidroxilase), embora a origem deste neuroesteróide no cérebro permaneça inexplicada. Tanto a pregnenolona quanto a dehidroepiandrosterona são encontrados em parte como sulfato ésteres, provavelmente pela ação da enzima 3 β -HSD. A principal forma de conjugação de pregnenolona e dehidroepiandrosterona são seus L ésteres, e a

acetiltransferase responsável por esta formação é encontrada na fração microsomal (Vourc'h *et al.*, 1992).

MECANISMOS DE AÇÃO DOS NEUROESTERÓIDES

Os hormônios esteróides são lipossolúveis e passam facilmente através da membrana plasmática para dentro das células-alvo, combinando-se com proteínas receptoras intracelulares específicas. Estes complexos agem no núcleo induzindo a expressão de certos genes. Além disso, certos esteróides rapidamente alteram a excitabilidade neuronal através de receptores ligados a canais iônicos, como os receptores GABA-A e NMDA (Compagnone *et al.*, 1995; McEwen, 1991).

A principal investigação dos efeitos dos neuroesteróides concentra-se em sua interação com o complexo receptor GABA-A. Estes conduzem ações neuromodulatórias, ligando-se provavelmente em mais de um sítio sobre o receptor GABA-A, sendo este sítio de ação distinto dos benzodiazepínicos e dos barbitúricos (Morrow *et al.*, 1990; Paul e Purdy, 1992). Alguns estudos, têm demonstrado que os efeitos dos neuroesteróides são dependentes da

composição das subunidades (α e 2γ) do receptores GABA-A (Shingai *et al.*, 1991; Zaman *et al.*, 1992).

Dependendo do neuroesteróide, a ação do GABA pode ser potencializada ou antagonizada. Os esteróides gonadais e adrenais como progesterona e deoxicorticosterona, respectivamente, e seus metabólitos, por exemplo, alopregnanolona e tetrahydrodeoxicorticosterona, são moduladores alostéricos positivos deste receptor (Majewska *et al.*, 1986; Schumacher e McEwen, 1989). Estes neuroesteróides estimulam e potencializam a ligação do GABA e benzodiazepinas a membranas neuronais, aumentando o transporte de cloreto induzido pelo GABA, por prolongarem a duração da abertura do canal (Majewska, 1986). Majewska *et al* (1992), mostraram que o neuroesteróide alopregnanolona facilitou a ação do GABA em concentrações nanomolares e a abertura do canal de cloreto em concentrações micromolares. Estas ações podem explicar seus efeitos anestésico, hipnótico e ansiolítico.

Os antagonistas GABA incluem o sulfato de pregnenolona e sulfato de dehidroepiandrosterona, que atuam de maneira não competitiva diminuindo a atividade dos receptores GABA-A estimulados pelo GABA, agonistas GABA e benzodiazepinas. Majewska *et al* (1988), demonstraram que o sulfato de pregnenolona, em concentrações cerca de $10\mu\text{M}$, produziu um

antagonismo não competitivo das correntes induzidas pelo GABA em cultura de neurônios de vários tipos de tecidos. Entretanto, este neuroesteróide diminui a frequência de abertura do canal sem afetar o tempo de abertura do canal (Mienville e Vicini, 1989). Estes efeitos mostram que a inibição pelo sulfato de pregnenolona não se deve ao bloqueio da abertura do canal, mas antes, por ligar-se a um sítio alostérico que controla a abertura do canal induzida pelo GABA.

Os receptores NMDA (Wu *et al.*, 1991; Bowlby, 1993) e os receptores da glicina (Wu *et al.*, 1990) são sensíveis à modulação pelos neuroesteróides. Estudos demonstram que o sulfato de pregnenolona especificamente aumenta as correntes induzidas pelo NMDA, em neurônios da medula espinhal, enquanto inibe os receptores GABA e glicina (Maione *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1990). Em culturas de neurônios do hipocampo de rato, o sulfato de pregnenolona aumentou a concentração de cálcio intracelular mediado pelo receptor NMDA (Irwin *et al.*, 1992). Este neuroesteróide aumentou a probabilidade de abertura da atividade do canal, por aumentar a frequência e o tempo de abertura do canal. Não foram observados efeitos sobre as correntes induzidas pelo cainato, evidenciando alguma seletividade na ação dos neuroesteróides. Recentemente, trabalhos têm demonstrado que os neuroesteróides moduladores positivos e negativos atuam em diferentes

sítios no receptor NMDA, sendo estes sítios distintos dos sítios da espermina, redox, glicina, MK-801, Mg^{2+} e do ácido araquidônico (Park-Chung *et al.*, 1997). Além disso, estudos sugerem que a subunidade NMDAR2_A controla a eficácia de neuroesteróides que são moduladores positivos (Yaghoubi *et al.*, 1998).

Outro alvo para os neuroesteróides é o receptor nicotínico da acetilcolina. A progesterona inibe a resposta deste receptor de maneira voltagem sensível, mais provavelmente por ligar-se a um sítio alostérico (Valera *et al.*, 1992). Mais recentemente, tem sido demonstrado que o sulfato de dehidroepiandrosterona atua como um agonista em receptores sigma centrais, facilitando a neurotransmissão glutamatérgica mediada pelo NMDA (Maurice *et al.*, 1997; Begeron *et al.*, 1996; Monnet *et al.*, 1995). Além disso, os neuroesteróides podem promover a inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem (French-Mullen e Spence, 1991).

NEUROESTERÓIDES, APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

Os neuroesteróides pregnenolona, dehidroepiandrosterona e seus sulfatos ésteres, estão presentes no sistema nervoso central de várias espécies

de mamíferos (Corpéchet *et al.*, 1983). Recentemente, tem sido sugerido que a pregnenolona e seus conjugados podem ser sintetizados *de novo* dentro do sistema nervoso central (Hu *et al.*, 1987). Portanto, a atenção tem sido focada sobre os possíveis papéis fisiológicos dos neuroesteróides.

Vários estudos têm sugerido que os neuroesteróides podem facilitar a aprendizagem e memória. Flood *et al.* (1992), demonstraram que o sulfato de pregnenolona melhorou a memória de camundongos treinados em um labirinto em T, quando administrado intracerebroventricularmente (i.c.v.). O mecanismo de ação envolvido no aumento dos processos de memória promovido por este neuroesteróide não é totalmente compreendido. No entanto, os receptores NMDA estão envolvidos nos processos de memória e aprendizagem (Izquierdo, 1991), sendo essenciais na indução de diferentes formas de plasticidade sináptica, como o fenômeno da LTP. Devido aos efeitos modulatórios positivos sobre os receptores NMDA em estudos *in vitro* (Wu *et al.*, 1991; Bowlby, 1993), as propriedades convulsivantes em camundongos (Maione *et al.*, 1992) e a diminuição do prejuízo da aprendizagem e memória induzido por antagonistas do receptor NMDA (Mathis *et al.*, 1994; 1996), tem sido sugerido que o sulfato de pregnenolona module os processos de aprendizagem e memória através de sua ação sobre os receptores NMDA (Mathis *et al.*, 1996).

Alguns estudos, mostram que o sulfato de dehidroepiandrosterona, um antagonista do receptor GABA-A melhorou a memória quando administrado em camundongos (Roberts *et al.*, 1987; Flood *et al.*, 1992). Mayo *et al* (1993), relataram que o sulfato de pregnenolona quando injetado dentro dos núcleos basais magnocelulares, aumentou a performance de memória em ratos. Recentemente, tem sido sugerido que os neuroesteróides que melhoram a memória, podem prevenir o prejuízo desta produzido pelo etanol (Melchior e Ritzmann, 1996).

Considerando a importância da aprendizagem e memória nos mecanismos de tolerância, e que os neuroesteróides modulam os sistemas NMDA e GABA-A, o presente estudo foi delineado para investigar a influência do sulfato de pregnenolona, sulfato de dehidroepiandrosterona e epipregnanolona sobre o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora produzido por etanol em camundongos, e verificar se as tolerâncias rápida e crônica são influenciadas de modo semelhante pelos neuroesteróides.

OBJETIVOS

O presente estudo tem por **objetivo geral**:

1. Investigar a influência dos neuroesteróides na aquisição da tolerância rápida e crônica ao etanol em camundongos testados no rota-rod.

Para atingir os objetivos gerais, os seguintes **objetivos específicos** foram considerados:

1. Investigar a influência dos neuroesteróides, sulfato de pregnenolona (um modulador positivo do receptor NMDA e negativo do receptor GABA-A), sulfato de dehidroepiandrosterona (um modulador negativo do receptor GABA-A) e epipregnanolona (um modulador positivo do receptor GABA-A), no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.
2. Verificar o efeito da administração de um antagonista não-competitivo do receptor NMDA (MK-801) e de um agonista do receptor GABA-A (muscimol), no efeito de neuroesteróides sobre a tolerância rápida ao etanol.

3. Verificar o efeito de neuroesteróides sobre o desenvolvimento da tolerância crônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

EQUIPAMENTOS

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

ANIMAIS

Foram utilizados camundongos suíços, machos, criados no biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, com 2 meses de idade e peso entre 28 - 34 g, mantidos em ambiente com temperatura de 23 ± 1 °C, com ciclo de luz, claro/escuro, de 12 h (luz ligada às 6 hs), tendo água e comida *ad libitum*.

DROGAS

As seguintes drogas foram utilizadas: etanol absoluto p.a. Merck (grau de pureza 99,8%), diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%) a 14% (p/v), em todos os experimentos; sulfato de pregnenolona, sulfato de dehidroepiandrosterona, (+) MK-801, muscimol e D-cicloserina (Research Biochemicals International; EUA) e preparadas nas concentrações apropriadas, em solução fisiológica; epipregnanolona (Sigma Chemical Company; EUA), dissolvida, em concentrações apropriadas em 1% de Tween 80 e solução fisiológica. A solução fisiológica (salina) foi preparada com NaCl (Merck) em água destilada, na concentração de 0,9%.

PROCEDIMENTO GERAL

TREINAMENTO DOS CAMUNDONGOS

O treinamento consistiu em três treinos diários durante cinco dias, no aparelho de rota-rod. O equipamento permitiu o treino de quatro animais por vez, sendo o intervalo de tempo entre um treinamento e outro, de

aproximadamente dois minutos. O animal era colocado no aparelho, sob aceleração contínua (1rpm/s) e a queda do animal do eixo giratório era registrada. Ao caírem, recebiam um choque de 0,3 mA nas patas (2s). Após o período dos treinos, os animais foram selecionados, de acordo com uma linha de base estável de, no mínimo, 20 rpm/s, para a realização dos testes. Os animais selecionados apresentaram valores basais de 20 a 40 rpm/s e a porcentagem de aproveitamento dos animais foi de aproximadamente 90%.

TESTE NO APARELHO DE ROTA-ROD

Nos testes, primeiramente, foi feito o registro da medida basal, que constitui em avaliar em que velocidade (r.p.m.) o animal já treinado, caía do eixo giratório. Os animais receberam intraperitonealmente, injeção de solução fisiológica ou etanol e foram colocados no rota-rod em intervalos de 30, 60 e 90 minutos após a injeção, para observação de seu desempenho. A velocidade de queda de cada animal, obtida aos 30, 60 e 90 min após a injeção, foi comparada com o respectivo valor basal, para a verificação da incoordenação motora. Dentre os valores obtidos, para cada animal, registrou-se a pior “performance”. Após 24 horas, todos os animais foram retestados, sob efeito

de etanol. O prejuízo motor máximo, induzidos nos animais, foi calculado de acordo com a fórmula (Barreto *et al.*, 1998):

$$\text{Incoordenação motora máxima} = \frac{\text{escore da linha de base} - \text{escore do teste}}{\text{escore da linha de base}} \times 100$$

DOSAGEM ALCOÓLICA

A dosagem alcoólica foi determinada por método enzimático, baseado na conversão do álcool para aldeído pela ação da desidrogenase. As amostras de sangue, de animais não aproveitados nos testes, foram colhidas por punção intracardíaca (0,7 - 1 ml), com a utilização de uma agulha intradérmica, em seringa de 1 ml. O sangue foi então transferido para o tubo de ensaio contendo o anticoagulante EDTA, e armazenado em um refrigerador. No momento das dosagens, as amostras foram centrifugadas a 600 r.p.m., durante 10 minutos. Em seguida, foi retirado cerca de 0,3 – 0,5 ml do sobrenadante, adicionando-se uma solução composta de NAD; ADH; tampão de citrato de sódio, além do corante monotetrazolium. Após um período de repouso de 24

horas a densidade ótica das amostras foi medida através de um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm, determinando-se então a concentração de álcool nas amostras (mg/dl).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados foram empregados os testes adequados para cada experimento realizado. No experimento 1 aplicou-se o teste “t” de Student. Para os experimentos 2; 3; 4; 5; 8; 11 e 12 foi usada a ANOVA de duas vias, tendo como variáveis independentes o pré-tratamento e o tratamento. Nos experimentos 11 e 12 utilizou-se também a ANOVA para medidas repetidas. Já nos experimentos 6; 7; 9 e 10 foi utilizada a ANOVA de três vias, tendo como variáveis independentes, o primeiro pré-tratamento, o segundo pré-tratamento e o tratamento. O teste “post hoc” empregado foi o teste de Tukey. A variável dependente foi a incoordenação motora máxima. Para as dosagens alcoólicas, foi realizada a ANOVA de uma via. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado como nível de significância em todos os experimentos.

EXPERIMENTOS E RESULTADOS

Foram realizados 12 experimentos. Nos dois primeiros, foi padronizado o método de indução da tolerância com uma única dose de álcool no Dia 1, e a facilitação da tolerância rápida por D-cicloserina, para definir as doses de álcool mais adequadas aos experimentos posteriores. A seguir, foram investigados os efeitos dos neuroesteróides moduladores negativos e positivos do receptor GABA-A e positivo do receptor NMDA, no desenvolvimento da tolerância rápida. No sexto e sétimo experimentos, investigou-se se o antagonista do receptor NMDA, MK-801, interferia com os efeitos do sulfato de pregnenolona e dehidroepiandrosterona sobre a tolerância rápida. O oitavo experimento verificou o efeito do muscimol, um agonista GABA-A no desenvolvimento da tolerância rápida. A seguir verificou-se a participação do sistema GABA-A nesse processo estudando-se o efeito da interação entre neuroesteróides e o muscimol sobre a tolerância rápida. E nos dois últimos experimentos investigou-se a participação da epipregnanolona e sulfato de pregnenolona na tolerância crônica.

Experimento 1: Indução de tolerância rápida ao etanol com o emprego de uma única dose.

Este experimento teve por objetivo verificar se, a tolerância rápida a uma dose de etanol se desenvolveria com a aplicação de etanol em uma única administração, no primeiro dia. Para isto, no Dia 2, camundongos previamente treinados e selecionados, foram divididos em dez (10) grupos com 10 animais em cada um. No Dia 1, cinco grupos receberam etanol (1,9; 2,0; 2,25; 2,5 e 3,0 g/kg) e cinco grupos receberam salina sendo testados no aparelho do rota-rod de acordo com o procedimento geral. Em seguida os animais retornaram para suas gaiolas-moradia. No Dia 2 os animais receberam etanol nas mesmas doses empregadas no Dia 1 (1,9; 2,0; 2,25; 2,5 e 3,0 g/kg). O teste foi realizado do mesmo modo que no primeiro dia, e o prejuízo máximo causado pelas doses de etanol foi calculado.

Resultados

Os resultados, destes experimentos, apresentados na figura 4 e 5, indicam que os camundongos tratados com etanol no Dia 1, manifestaram um prejuízo motor significativo em relação aos grupos tratados com salina, e que este prejuízo motor foi dependente da dose. Após 24 horas, verificou-se

que os grupos tratados com etanol, nas doses 1,9; 2,5 ou 3,0 g/kg, não apresentaram tolerância, enquanto que nos grupos que receberam etanol nas doses de 2,0 g/kg [$t_{(1,18)} = 2,895$; $p < 0,0096$] e 2,25 g/kg [$t_{(1,18)} = 4,577$; $p < 0,0002$], pode-se observar o desenvolvimento da tolerância rápida. A dose de 2,25 g/kg de etanol produziu tolerância mais evidente do que a dose de 2,0 g/kg e, por este fato, foram escolhidas as doses 1,9 e 2,25 g/kg para a realização dos experimentos seguintes.

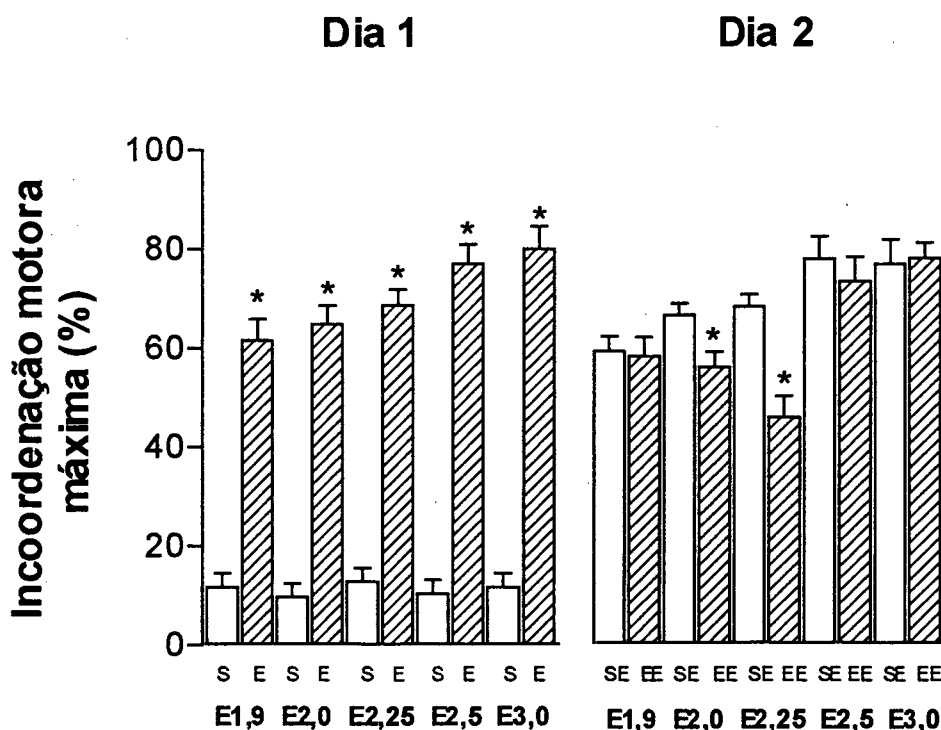


Figura 4 - Desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida por diferentes doses únicas de etanol (1,9; 2,0; 2,25; 2,5 ou 3,0 g/kg) em camundongos, testados no rota-rod. No Dia 1, o grupo controle recebeu salina (S) e os demais grupos receberam etanol (E) (1,9; 2,0; 2,25; 2,5 e 3,0 g/kg). Os animais foram testados 30 minutos após a injeção de salina ou etanol. Após 24 horas (dia 2), todos os grupos controle e experimental foram tratados com etanol e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$ (teste "t" de Student, comparado ao respectivo controle).

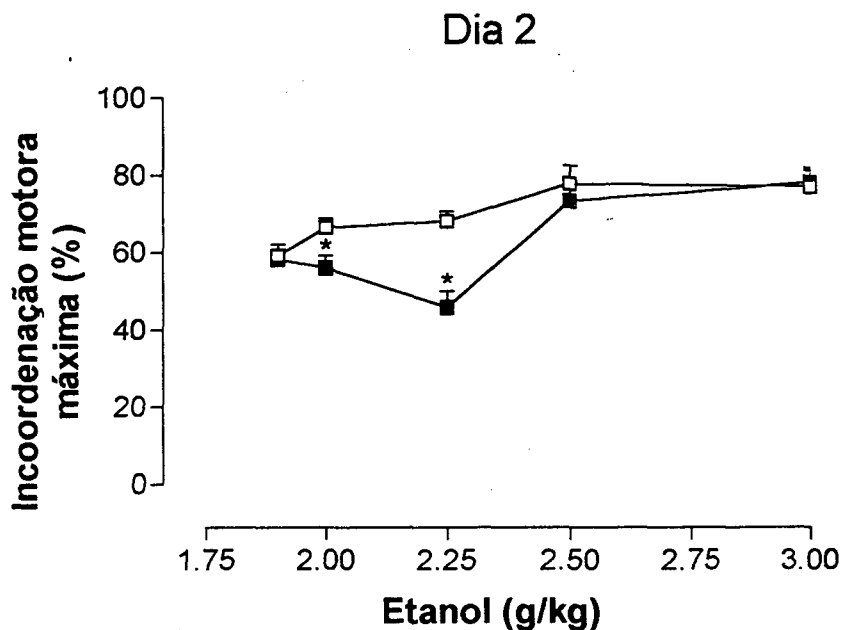


Figura 5 - Efeito das diferentes doses de etanol sobre a tolerância rápida, em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (□) representa o desempenho do grupo controle SE (S + E) e o símbolo (■) representa o grupo experimental EE (E + E) no Dia 2 do teste. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 2: Efeito da D-cicloserina sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod.

Este experimento foi realizado com o objetivo de investigar se neste modelo, o agonista parcial do receptor NMDA, a D-cicloserina, estimularia o desenvolvimento da tolerância rápida como já observado em ratos (Khanna *et al.*, 1993; 1995). Animais previamente treinados e selecionados, foram

divididos em dois grupos: A e B. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam salina e D-cicloserina. As doses de D-cicloserina foram de 10,0 (grupo A) ou 15,0 (grupo B) mg/kg, respectivamente. Após 30 minutos, cada um dos subgrupos foi redividido em dois, recebendo, cada um 1,9 g/kg de etanol ou salina. A seguir, foram submetidos à avaliação no rota-rod, e findo o teste, os animais retornaram às gaiolas. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol na mesma dose anterior, sendo novamente testados no aparelho do rota-rod.

Resultados

Os resultados do presente experimento estão representados nas figuras 6 e 7. A administração da D-cicloserina interferiu no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada no teste do rota-rod (Figura 6). No Dia 1, a ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol para os grupos A: $F_{(1,36)} = 373,07$; $p < 0,0001$; B: $F_{(1,36)} = 255,41$; $p < 0,0001$. No Dia 2 do experimento, não houve redução do prejuízo motor, de forma significativa, nos grupos controle administrados com etanol + etanol (EE), sugerindo que com esta dose de etanol não se observa tolerância rápida. A ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol apenas

no grupo B: $F_{(1,36)} = 5,076$; $p < 0,0344$. O grupo pré-tratado com D-cicloserina 15,0 mg/kg antes do etanol, no Dia 1, apresentou tolerância rápida, no Dia 2. A ANOVA de duas vias revelou o efeito do pré-tratamento com D-cicloserina para o grupo B: $F_{(1,36)} = 17,539$; $p < 0,0001$ e a interação pré-tratamento x tratamento foi significativa no grupo B: $F_{(1,36)} = 8,948$; $p < 0,0049$. A análise *post-hoc* indicou que a D-cicloserina, na dose 15,0 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida (teste de Tukey). A D-cicloserina, na dose de 10,0 mg/kg, não foi capaz de interferir significativamente no desenvolvimento da tolerância rápida.

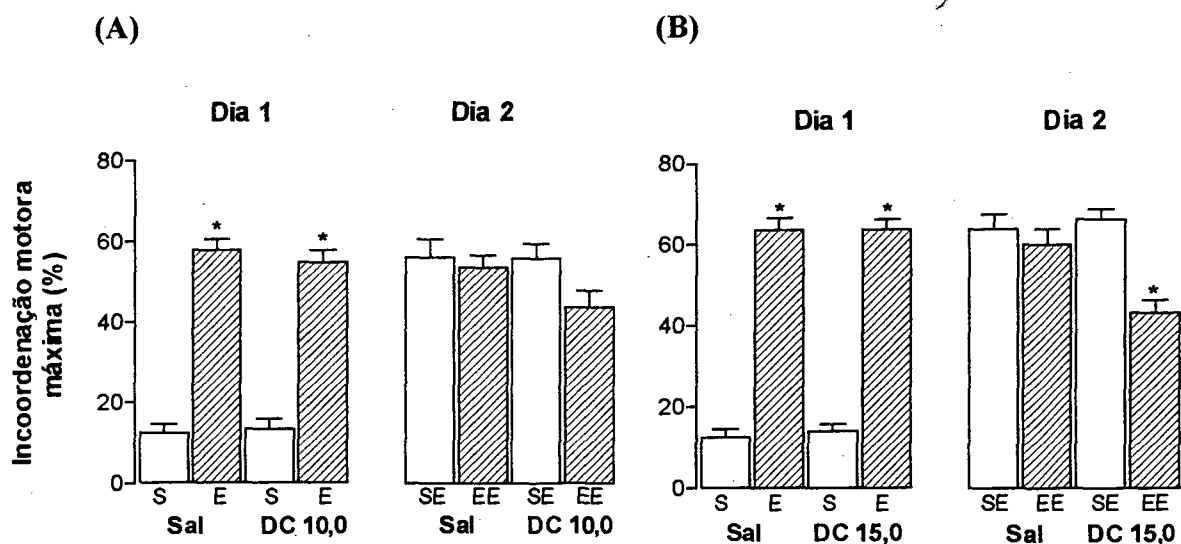


Figura 6 – Efeito da D-cicloserina no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Quatro grupos receberam salina (Sal) e outros quatro grupos receberam D-cicloserina (DC) nas doses de 10,0 ou 15,0 mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 1,9 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol é observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose 1,9 g/kg, i.p. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

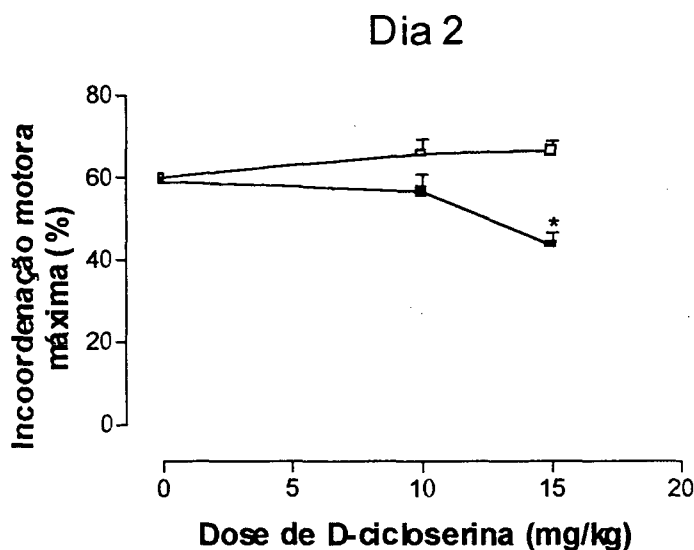


Figura 7 – Efeito das diferentes doses de D-cicloserina sobre a tolerância rápida induzida por etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (□) representa o desempenho do grupo DCSE (DC + SE) e o símbolo (■) representa o grupo DCEE (DC + EE) no Dia 2 do teste. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 3: Efeito do sulfato de pregnenolona sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod.

A fim de investigar se o neuroesteróide sulfato de pregnenolona, um modulador positivo do receptor NMDA e negativo do receptor GABA-A, facilitaria a aquisição da tolerância rápida ao etanol avaliada no rota-rod,

animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em quatro grupos: A, B, C e D. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam salina e sulfato de pregnenolona. As doses de sulfato de pregnenolona foram de 0,03 (A); 0,05 (B); 0,08 (C) e 0,15 (D) mg/kg, respectivamente. Após 30 minutos, cada um dos subgrupos foi redividido em dois, recebendo, cada um 1,9 g/kg de etanol ou salina. A seguir, foram submetidos à avaliação no rota-rod, retornando posteriormente às suas gaiolas. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com a mesma dose de etanol, e testados no aparelho do rota-rod.

Resultados

Os resultados estão retratados nas figuras 8 e 9. A administração de sulfato de pregnenolona facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, de modo dependente da dose (Figura 8). No Dia 1, a ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol para os grupos A: $F_{(1,36)} = 156,45$; $p < 0,0001$; B: $F_{(1,36)} = 115,40$; $p < 0,0001$; C: $F_{(1,36)} = 219,79$; $p < 0,0001$; D: $F_{(1,36)} = 576,06$; $p < 0,0001$. No Dia 2 do experimento, não houve redução do prejuízo motor nos grupos controle administrados com

etanol + etanol (EE), sugerindo que não houve tolerância. A ANOVA de duas vias detectou o efeito do tratamento com etanol nos diferentes grupos: B: $F_{(1,36)} = 5,472$; $p < 0,0024$; C: $F_{(1,36)} = 9,086$; $p < 0,0046$; D: $F_{(1,36)} = 13,481$; $p < 0,0007$. Os grupos pré-tratados com pregnenolona sulfato 0,05; 0,08 e 0,15 mg/kg antes do etanol, no Dia 1, apresentaram tolerância rápida, no Dia 2. A ANOVA de duas vias revelou o efeito do pré-tratamento com sulfato de pregnenolona para os grupos: C: $F_{(1,36)} = 5,316$; $p < 0,0269$ e D: $F_{(1,36)} = 10,948$; $p < 0,0021$. A interação pré-tratamento x tratamento foi significativa nos grupos: B: $F_{(1,36)} = 5,570$; $p < 0,0238$; C: $F_{(1,36)} = 10,929$; $p < 0,0021$; D: $F_{(1,36)} = 15,814$; $p < 0,0003$. A análise *post-hoc* indicou que o sulfato de pregnenolona, nas doses 0,05; 0,08 e 0,15 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida (teste de Tukey). O sulfato de pregnenolona na dose 0,03 mg/kg não foi capaz de facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida.

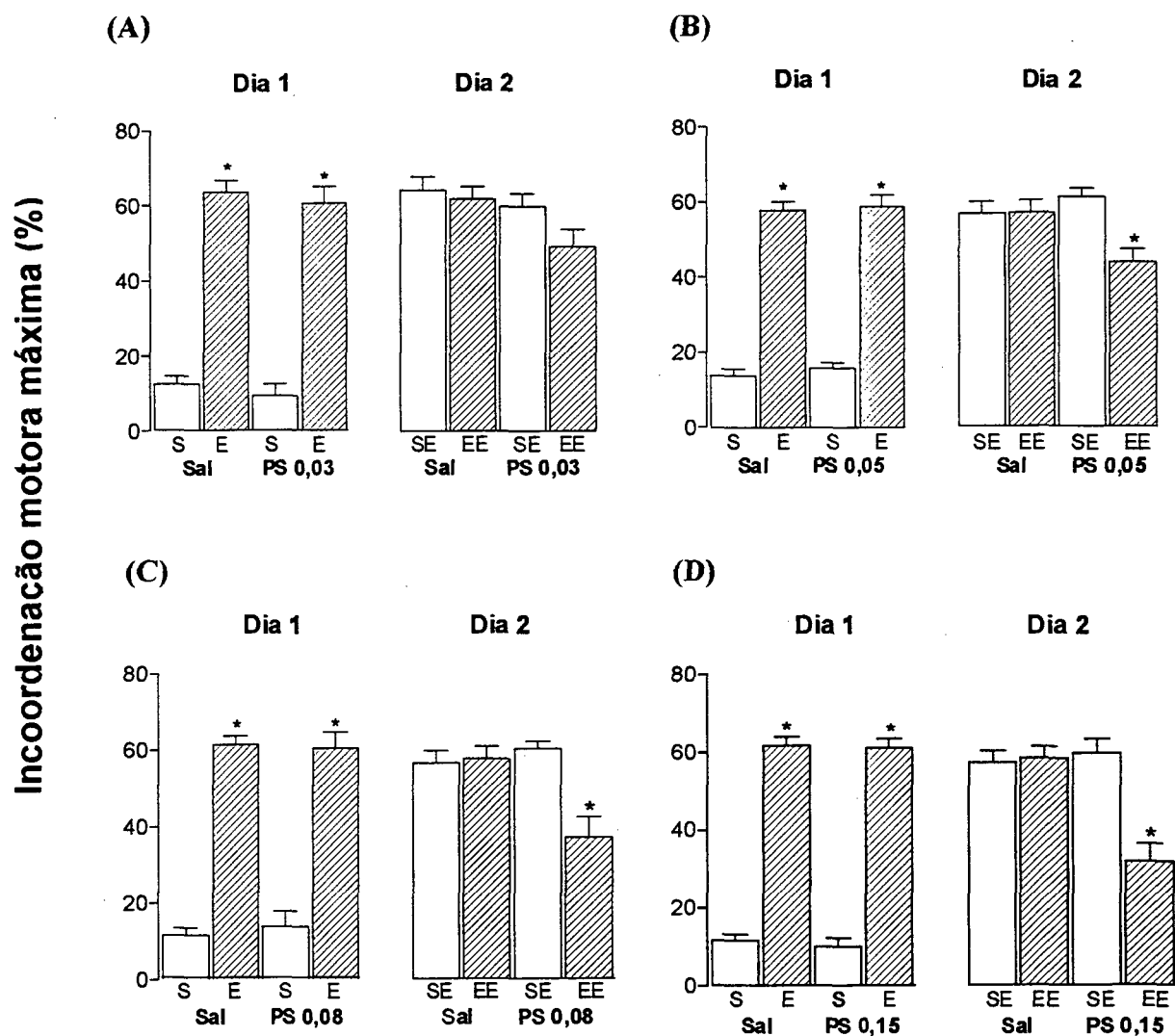


Figura 8 – Efeito do sulfato de pregnenolona no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Oito grupos receberam salina (Sal) e outros oito grupos receberam sulfato de pregnenolona (PS) nas doses de 0,03, 0,05, 0,08 ou 0,15 mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 1,9 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol é observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose 1,9 g/kg, i.p. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

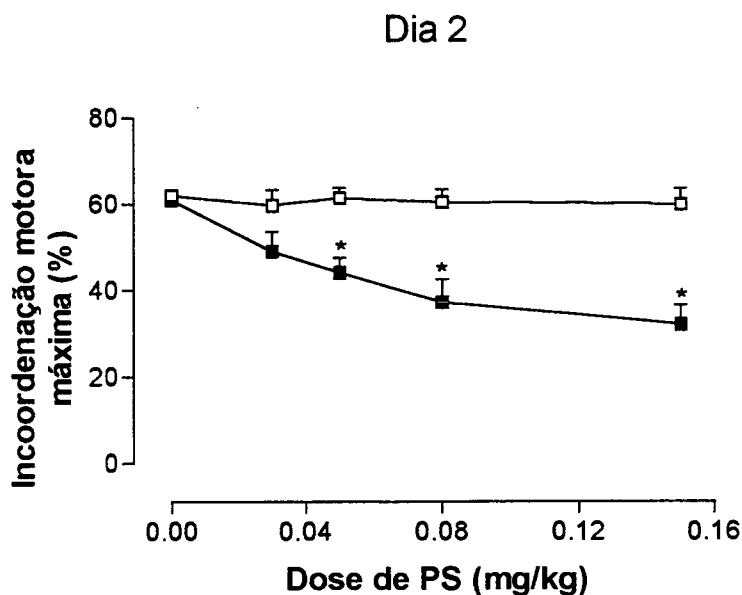


Figura 9 – Efeito das diferentes doses de sulfato de pregnenolona sobre a tolerância rápida induzida por etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (□) representa o desempenho do grupo PSSE (PS + SE) e o símbolo (■) representa o grupo PSEE (PS + EE) no Dia 2 do teste. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 4: Efeito do sulfato de dehidroepiandrosterona sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod.

Para este experimento, o objetivo foi investigar se o sulfato de dehidroepiandrosterona, um modulador negativo do receptor GABA-A, facilitaria a aquisição da tolerância rápida ao etanol. Animais previamente

treinados e selecionados conforme protocolo, foram divididos em quatro grupos: A, B, C e D. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam salina e sulfato de dehidroepiandrosterona. As doses de sulfato de dehidroepiandrosterona foram de 0,05 (A); 0,10 (B); 0,15 (C) e 0,20 (D) mg/kg, respectivamente. Após 30 minutos, cada um dos subgrupos foi redividido em dois, recebendo, cada um 1,9 g/kg de etanol ou salina. A seguir, foram submetidos à avaliação no rota-rod, após o que os animais retornaram às gaiolas. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol na mesma dose anterior, e novamente testados no aparelho do rota-rod.

Resultados

Os resultados do presente experimento estão representados nas figuras 10 e 11. A administração do sulfato de dehidroepiandrosterona facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, de acordo com uma relação dose-dependente (Figura 10). No Dia 1, a ANOVA de duas vias detectou efeito significativo do tratamento com etanol para os grupos A: $F_{(1,36)} = 539,81$; $p < 0,0001$; B: $F_{(1,36)} = 133,47$; $p < 0,0001$; C: $F_{(1,36)} = 420,39$;

$p < 0,0001$; D: $F_{(1,36)} = 311,21$; $p < 0,0001$. No Dia 2 do experimento, como esperado, não houve redução do prejuízo motor nos grupos controle administrados com etanol + etanol (EE), indicando o não desenvolvimento da tolerância rápida. A ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol nos diferentes grupos B: $F_{(1,36)} = 22,030,962$; $p < 0,0001$; C: $F_{(1,36)} = 37,585$; $p < 0,0001$; D: $F_{(1,36)} = 20,910$; $p < 0,0001$. Portanto, os grupos pré-tratados com sulfato de dehidroepiandrosterona 0,10; 0,15 e 0,20 mg/kg antes do etanol, no Dia 1, apresentaram tolerância rápida, no Dia 2. A ANOVA de duas vias revelou o efeito do pré-tratamento para os grupos: B: $F_{(1,36)} = 40,025$; $p < 0,0001$; C: $F_{(1,36)} = 9,931$; $p < 0,0032$; D: $F_{(1,36)} = 9,401$; $p < 0,0040$. A interação pré-tratamento x tratamento foi significativa nos grupos: B: $F_{(1,36)} = 7,269$; $p < 0,0105$; C: $F_{(1,36)} = 33,045$; $p < 0,0001$; D: $F_{(1,36)} = 22,377$; $p < 0,0001$. A análise *post-hoc* indicou que o sulfato de dehidroepiandrosterona, nas doses 0,10; 0,15 e 0,20 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida (teste de Tukey). O sulfato de dehidroepiandrosterona na dose 0,05 mg/kg não foi capaz de facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida.

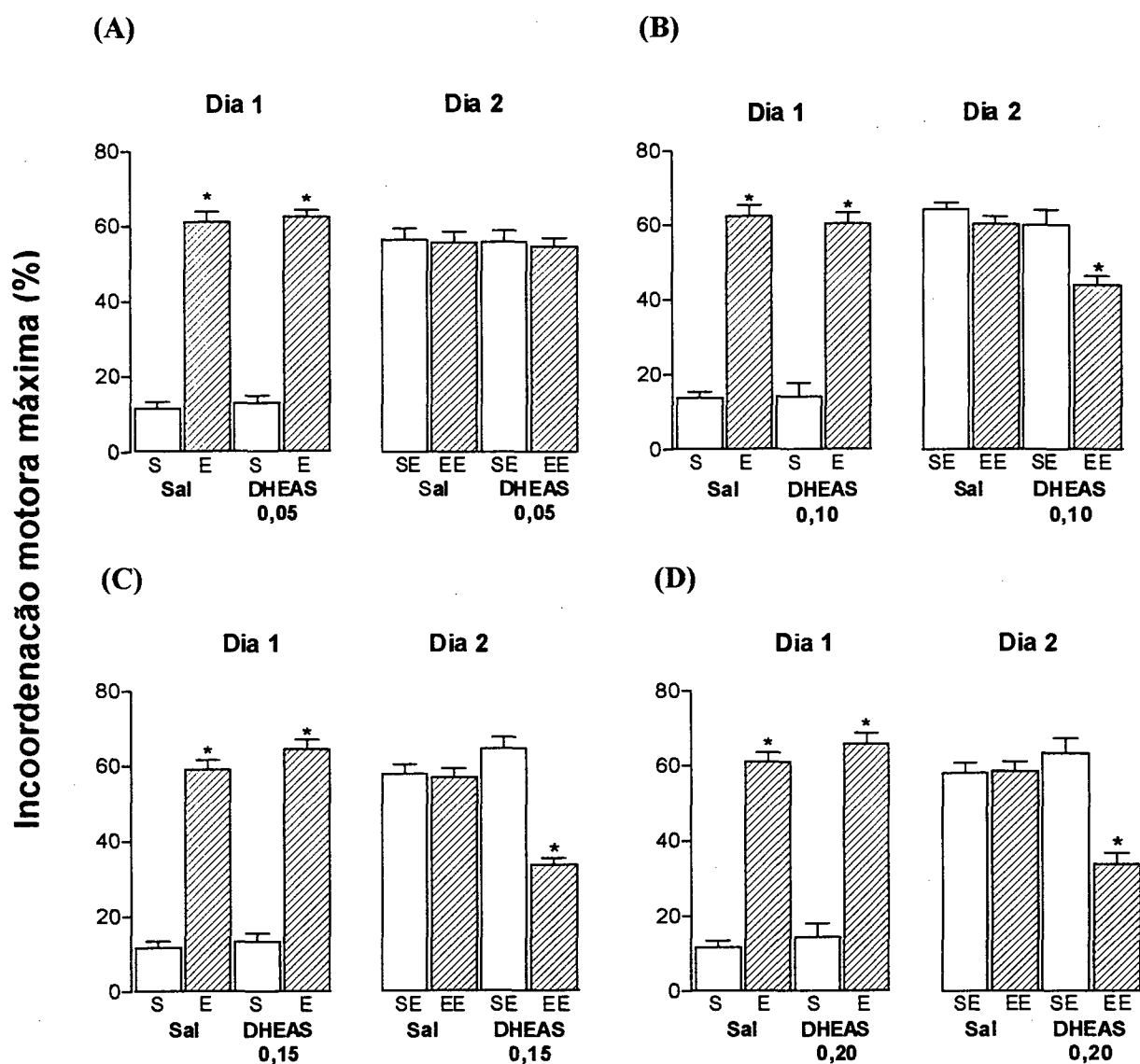


Figura 10 – Efeito do sulfato de dehidroepiandrosterona no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Oito grupos receberam salina (Sal) e outros oito grupos receberam sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) nas doses de 0,05, 0,10, 0,15 ou 0,20 mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 1,9 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol é observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose 1,9 g/kg, i.p. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

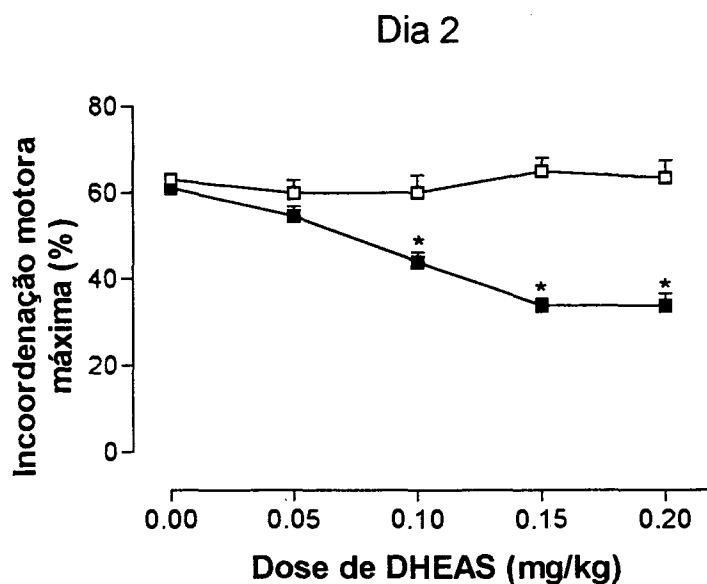


Figura 11 – Efeito das diferentes doses de sulfato de dehidroepiandrosterona sobre a tolerância rápida induzida por etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (□) representa o desempenho do grupo DHEAS-SE (DHEAS + SE) e o símbolo (■) representa o grupo DHEAS-EE (DHEAS + EE) no Dia 2 do teste. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 5: Efeito da epipregnanolona sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod.

Este experimento foi realizado para investigar se o neuroesteróide epipregnanolona, um modulador positivo do receptor GABA-A, bloquearia a aquisição da tolerância rápida ao etanol avaliada no modelo do rota-rod. Animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em três

grupos: A, B e C. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam salina e epipregnanolona. As doses de epipregnanolona foram de 0,05 (A); 0,10 (B) e 0,15 (C) mg/kg, respectivamente. Após 30 minutos, cada um dos subgrupos foi redividido em dois, recebendo, cada um 2,25 g/kg de etanol ou salina. A seguir, foram submetidos à avaliação no rota-rod, e findo o teste os animais retornaram às gaiolas. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com a mesma dose de etanol, e testados no aparelho do rota-rod.

Resultados

As figuras 12 e 13 mostram que a administração da epipregnanolona bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada no teste do rota-rod, sugerindo-se uma relação dose-dependente (Figura 12). No Dia 1, a ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol para os grupos A: $F_{(1,36)} = 90,371$; $p < 0,0001$; B: $F_{(1,36)} = 153,19$; $p < 0,0001$; C: $F_{(1,36)} = 577,88$; $p < 0,0001$. No Dia 2 do experimento, houve redução do prejuízo motor, de forma significativa, nos grupos controle administrados com etanol + etanol (EE) sugerindo que houve desenvolvimento de tolerância. A ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com

etanol nos diferentes grupos A: $F_{(1,36)} = 16,531$; $p < 0,0003$; B: $F_{(1,36)} = 10,946$; $p < 0,0021$; C: $F_{(1,36)} = 19,001$; $p < 0,0001$. Os grupos pré-tratados com epipregnanolona 0,10 e 0,15 mg/kg antes do etanol, no Dia 1, não apresentaram redução do prejuízo motor, no Dia 2, sugerindo bloqueio da tolerância. A ANOVA de duas vias revelou o efeito do pré-tratamento com epipregnanolona para os grupos: B: $F_{(1,36)} = 5,875$; $p < 0,0206$; C: $F_{(1,36)} = 45,440$; $p < 0,0001$. A análise *post-hoc* indicou que a epipregnanolona, nas doses 0,10 e 0,15 mg/kg, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida (teste de Tukey). A epipregnanolona na dose 0,05 mg/kg não foi capaz de bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida.

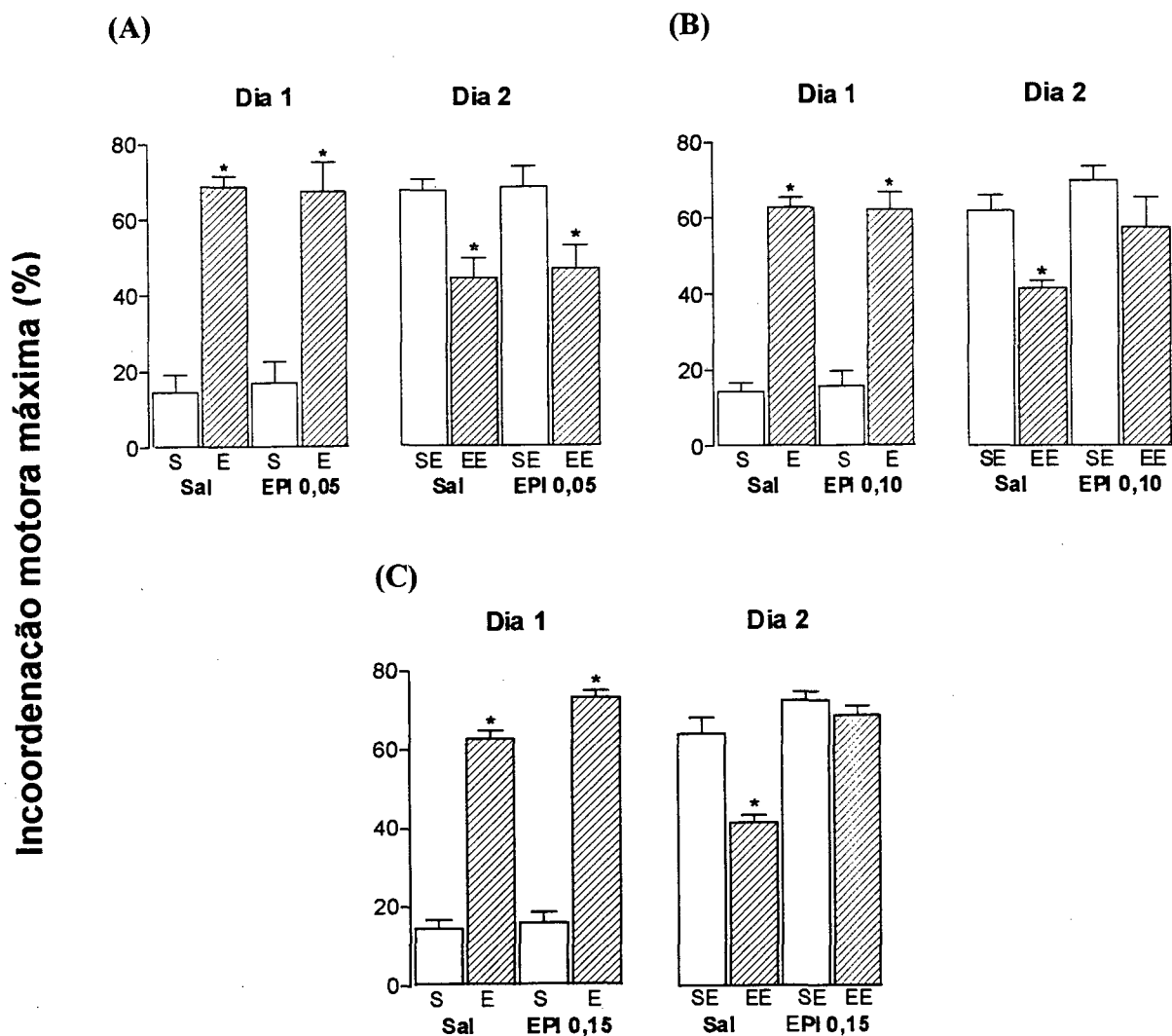


Figura 12 – Efeito da epipregnanolona no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Oito grupos receberam salina (Sal) e outros oito grupos receberam epipregnanolona (EPI) nas doses de 0,05, 0,10 ou 0,15 mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 2,25 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol é observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose 1,9 g/kg, i.p. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

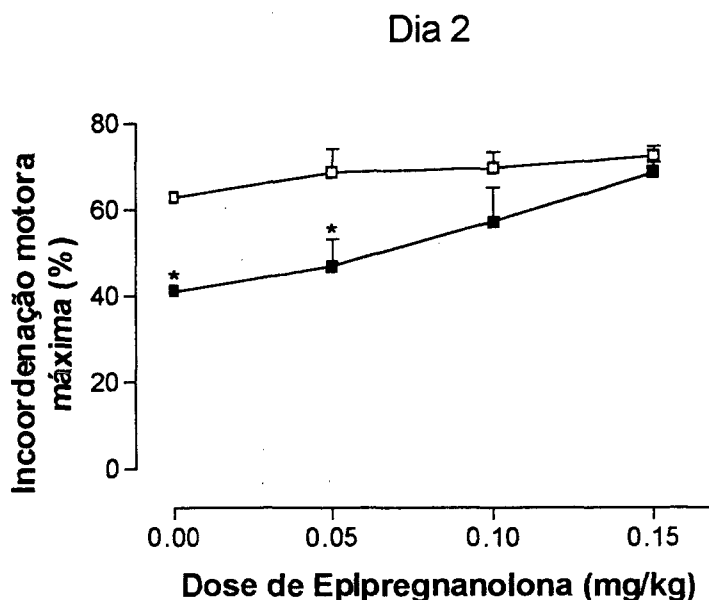


Figura 13 – Efeito das diferentes doses de epipregnanolona sobre a tolerância rápida induzida por etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (□) representa o desempenho do grupo EPISE (EPI + SE) e o símbolo (■) representa o grupo EPIEE (EPI + EE) no Dia 2 do teste. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 6: Efeito da administração prévia do (+)MK-801 sobre a facilitação da tolerância rápida ao etanol pelo sulfato de pregnenolona.

O presente experimento foi realizado com o objetivo de investigar se a ação do neuroesteróide sulfato de pregnenolona na facilitação da tolerância rápida ao etanol estaria ligada ao sistema NMDA, utilizando-se o (+)MK-801, um antagonista não-competitivo do receptor NMDA. Animais,

previamente treinados e selecionados no aparelho rota-rod, foram divididos em dois grupos. O primeiro recebeu como pré-tratamento 1, MK-801 (0,06 mg/kg) e o segundo recebeu salina. Quinze minutos após a administração, metade dos animais de cada grupo recebeu o pré-tratamento 2 com sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) e a outra, salina. Quarenta e cinco minutos após a administração de MK-801, cada grupo foi dividido em dois subgrupos que receberam o tratamento com etanol (1,9 g/kg) ou salina. Os animais foram submetidos ao rota-rod, trinta minutos após a última injeção, retornando posteriormente suas gaiolas. No dia seguinte, todos os animais foram tratados com etanol na mesma dose anterior, sendo novamente testados no aparelho do rota-rod.

Resultados

Os resultados demonstraram que os animais tratados com etanol, no Dia 1, apresentaram incoordenação motora e os grupos controles pré-tratados, com MK-801, sulfato de pregnenolona, não apresentaram prejuízo motor (figura 14). A ANOVA de três vias demonstrou o efeito do tratamento (etanol): $F_{(1,72)} = 511,69$; $p < 0,0001$; pré-tratamento 1 (MK-801): $F_{(1,72)} =$

23,279; $p < 0,0001$; pré-tratamento 2 (PS): $F_{(1,72)} = 6,733$; $p < 0,0114$; e da interação pré-tratamento 1 x pré-tratamento 2: $F_{(1,72)} = 4,390$; $p < 0,0397$; e do pré-tratamento 1 x tratamento: $F_{(1,72)} = 6,793$; $p < 0,0111$. No Dia 2, verificou-se que todos os subgrupos SE apresentaram prejuízo motor e os que receberam etanol em ambos os dias (EE) não desenvolveram tolerância rápida aos efeitos do etanol, com exceção dos animais tratados com sulfato de pregnenolona, nos quais houve desenvolvimento da tolerância rápida. A administração com MK-801, bloqueou a tolerância rápida facilitada pelo sulfato de pregnenolona. A ANOVA realizada com os dados obtidos no Dia 2, demonstrou o efeito do pré-tratamento 1 (MK-801): $F_{(1,72)} = 10,061$; $p < 0,0022$; e da interação pré-tratamento 1 x pré-tratamento 2 (PS): $F_{(1,72)} = 6,590$; $p < 0,0123$; pré-tratamento 1 x tratamento (etanol): $F_{(1,72)} = 5,963$; $p < 0,0170$; e pré-tratamento 2 x tratamento: $F_{(1,72)} = 7,789$; $p < 0,0067$. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que a injeção de sulfato de pregnenolona facilitou a aquisição da tolerância rápida no Dia 2, e a administração prévia de MK-801 antes do pré-tratamento com sulfato de pregnenolona, bloqueou a facilitação da tolerância.

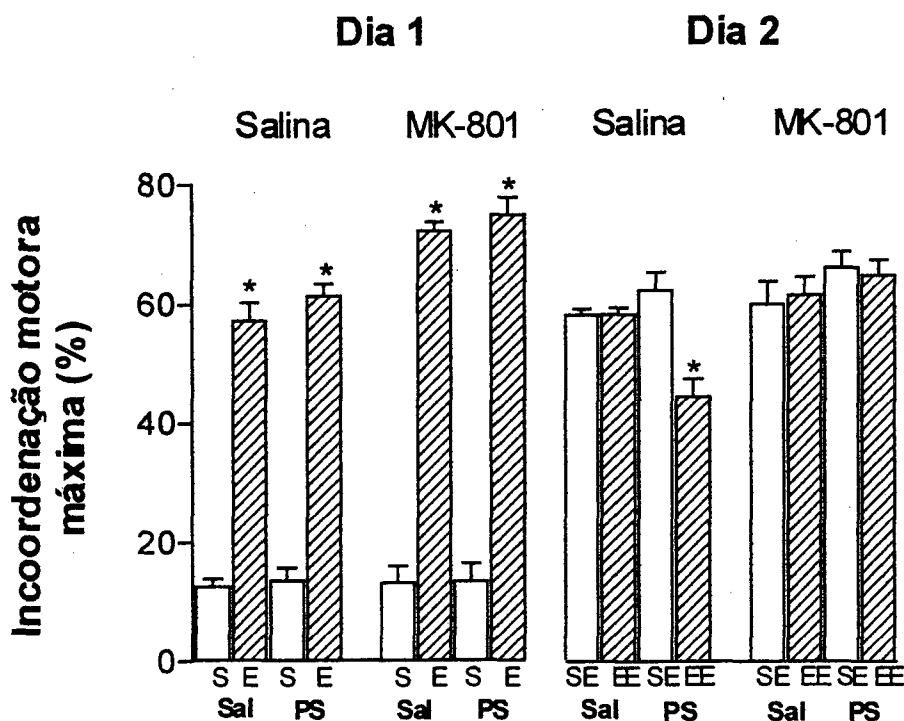


Figura 14 – Efeito da administração prévia do MK-801 sobre a facilitação do sulfato de pregnenolona na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. Um foi injetado com MK-801 (0,06 mg/kg) e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com sulfato de pregnenolona (PS) 0,08 mg/kg e a outra com salina (Sal). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 1,9 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 7: Efeito da administração prévia do (+)MK-801 sobre a facilitação da tolerância rápida ao etanol pelo sulfato de dehidroepiandrosterona.

O objetivo deste experimento foi investigar se a ação do sulfato de dehidroepiandrosterona na facilitação da tolerância rápida ao etanol também

estaria ligada ao sistema NMDA. Animais, treinados e selecionados conforme protocolo, foram divididos em dois grupos. O primeiro recebeu como pré-tratamento 1, MK-801 (0,06 mg/kg) e o segundo com salina. Quinze minutos após a administração, metade dos animais de cada grupo recebeu o pré-tratamento 2 com sulfato de dehidroepiandrosterona (0,15 mg/kg) e a outra, com salina. Quarenta e cinco minutos após a administração de MK-801, cada grupo foi dividido em dois subgrupos que receberam o tratamento com etanol (1,9 g/kg) ou salina. Os animais foram submetidos ao rota-rod, trinta minutos após a última injeção, e findo o teste os animais retornaram às gaiolas, seguindo-se procedimento anteriormente descrito.

Resultados

Os resultados do presente experimento demonstraram que os animais tratados com etanol, no Dia 1, apresentaram incoordenação motora como esperado e os grupos controles pré-tratados, com MK-801 e sulfato de dehidroepiandrosterona, não apresentaram prejuízo motor (figura 15). A ANOVA de três vias demonstrou o efeito do tratamento (etanol): $F_{(1,72)} =$

281,80; $p < 0,0001$; e da interação pré-tratamento 1 x pré-tratamento 2: $F_{(1,72)} = 5,849$; $p < 0,0181$. No Dia 2, verificou-se que todos os subgrupos SE apresentaram prejuízo motor e os que receberam etanol em ambos os dias (EE) não desenvolveram tolerância rápida aos efeitos do etanol, com exceção dos animais tratados com sulfato de dehidroepiandrosterona, nos quais houve desenvolvimento da tolerância rápida. A administração de MK-801, não alterou a tolerância rápida causada pelo sulfato de dehidroepiandrosterona. A ANOVA realizada com os dados obtidos, no Dia 2, demonstrou o efeito tratamento (etanol): $F_{(1,72)} = 19,180$ $p < 0,0001$; pré-tratamento 2 (DHEAS): $F_{(1,72)} = 8,502$; $p < 0,0047$; e da interação pré-tratamento 2 x tratamento: $F_{(1,72)} = 11,023$; $p < 0,0014$. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) mostrou diferença significativa entre o grupo pré-tratado com sulfato de dehidroepiandrosterona no Dia 1 e seu controle, sugerindo que a injeção de sulfato de dehidroepiandrosterona facilitou a aquisição da tolerância rápida no Dia 2. Além disso, a administração prévia de MK-801 antes do pré-tratamento com sulfato de dehidroepiandrosterona, não bloqueou a facilitação da tolerância.

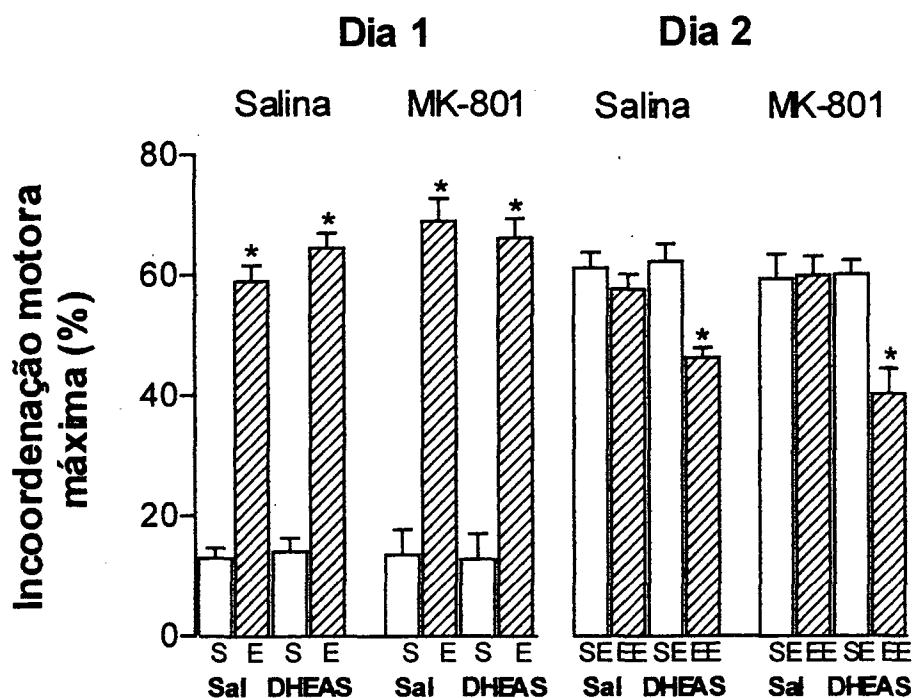


Figura 15 - Efeito da administração prévia do MK-801 sobre a facilitação do sulfato de dehidroepiandrosterona na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. Um foi injetado com MK-801 (0,06 mg/kg) e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) 0,15 mg/kg e a outra com salina (Sal). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 1,9 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 8: Efeito do muscimol sobre a tolerância rápida ao etanol avaliada pelo teste do rota-rod.

Com o objetivo de investigar se o muscimol, um agonista do receptor GABA-A, bloquearia a aquisição da tolerância rápida ao etanol avaliada no modelo do rota-rod, animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em três grupos: A, B e C. Cada grupo foi subdividido em dois, os

quais receberam salina e muscimol. As doses de muscimol foram de 0,20 (A); 0,40 (B) e 0,60 (C) mg/kg, respectivamente. Após 30 minutos, cada um dos subgrupos foi redividido em dois, recebendo, cada um 2,25 g/kg de etanol ou salina. A seguir, foram submetidos à avaliação no rota-rod, após o que os animais retornaram às gaiolas, seguindo-se o mesmo procedimento adotado nos experimentos anteriores.

Resultados

As figuras 16 e 17 apresentam os resultados do presente experimento. A administração prévia do muscimol interferiu no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliada no teste do rota-rod, de forma dependente da dose (Figura 16). No Dia 1, a ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol para os grupos A: $F_{(1,20)} = 291,613$; $p < 0,0001$; B: $F_{(1,20)} = 311,54$; $p < 0,0001$; C: $F_{(1,36)} = 762,54$; $p < 0,0001$. No Dia 2 do experimento, houve redução do prejuízo motor, de forma significativa, nos grupos controle administrados com etanol + etanol (EE), sugerindo desenvolvimento da tolerância rápida. A ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol nos diferentes grupos A: $F_{(1,20)} = 26,645$; $p < 0,0001$; B: $F_{(1,20)} = 27,931$; $p < 0,0001$; C: $F_{(1,36)} = 26,897$;

$p < 0,0001$. Os grupos pré-tratados com muscimol 0,4 e 0,6 mg/kg antes do etanol, no Dia 1, não apresentaram tolerância rápida, quando avaliados no Dia 2. A ANOVA de duas vias revelou o efeito do pré-tratamento com muscimol para os grupos: A: $F_{(1,20)} = 5,182$; $p < 0,0339$; C: $F_{(1,36)} = 24,314$; $p < 0,0001$. A interação pré-tratamento x tratamento foi significativa no grupo C: $F_{(1,36)} = 13,352$; $p < 0,0008$. A análise *post-hoc* indicou que o muscimol, nas doses 0,40 e 0,60 mg/kg, dificultou no desenvolvimento da tolerância rápida (teste de Tukey). O muscimol na dose 0,20 mg/kg não foi capaz de bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida. Na figura 17 os resultados foram parcialmente reapresentados para melhor visualização do bloqueio dose-dependente do muscimol sobre a tolerância rápida, no Dia 2.

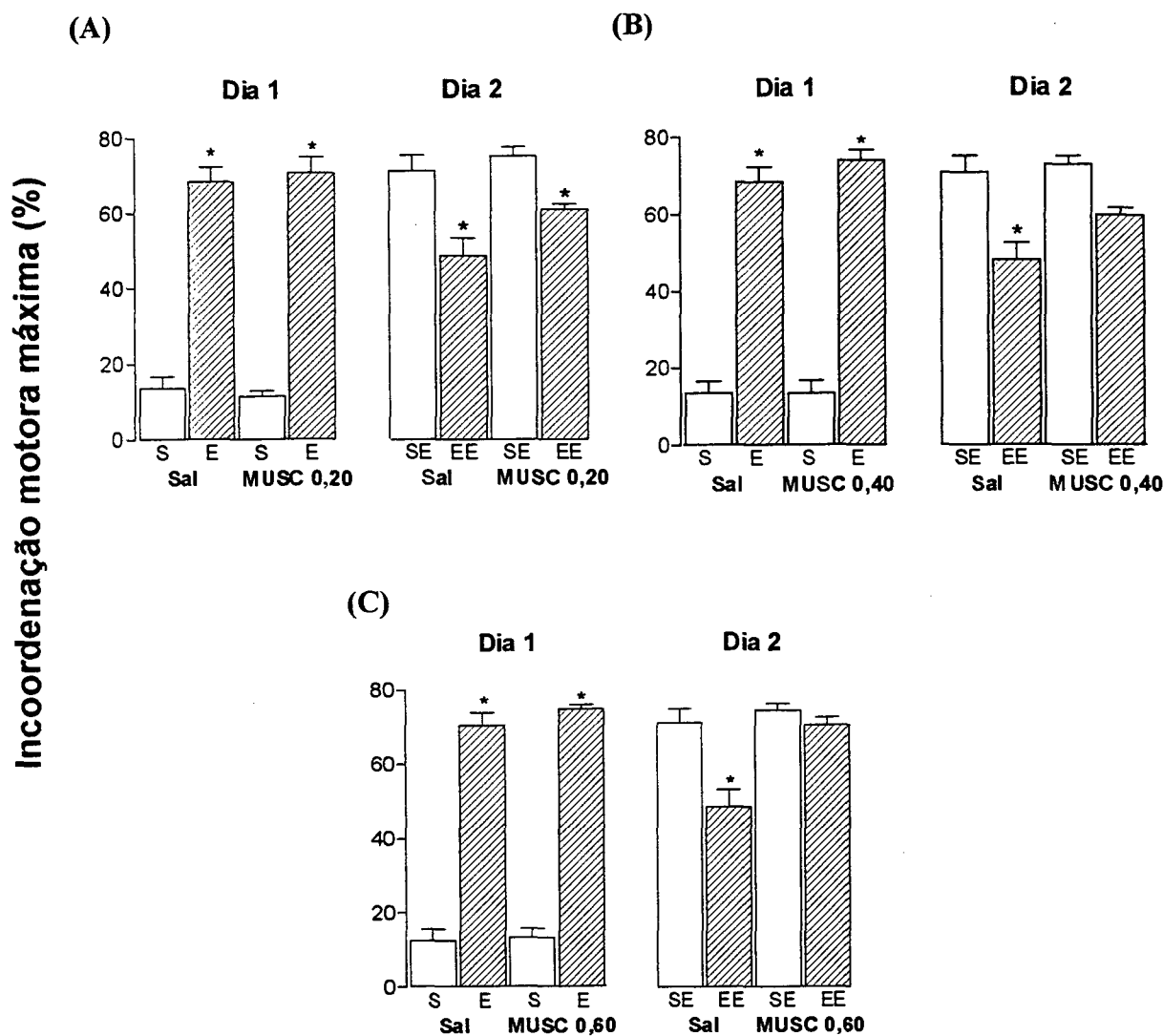


Figura 16 – Efeito do muscimol no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Seis grupos receberam salina (Sal) e outros seis grupos receberam muscimol (MUSC) nas doses de 0,20, 0,40 ou 0,60 mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 2,25 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol é observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose 2,25 g/kg, i.p. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 6 ou 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

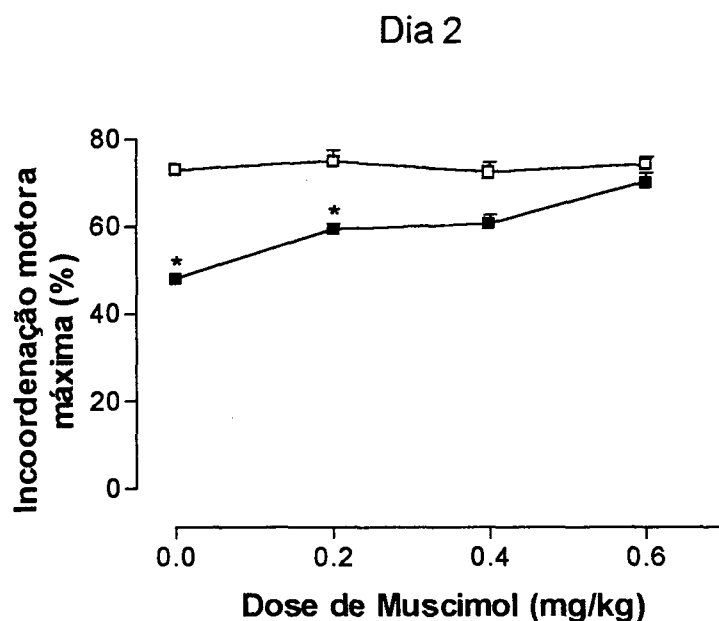


Figura 17 – Efeito das diferentes doses de muscimol sobre a tolerância rápida induzida por etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. O símbolo (□) representa o desempenho do grupo MUSC-SE (MUSC + SE) e o símbolo (■) representa o grupo MUSC-EE (MUSC + EE) no Dia 2 do teste. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 6 ou 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 9: Efeito da administração prévia do sulfato de pregnenolona sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo muscimol.

Este experimento foi realizado com o propósito de investigar a interação entre o sistema GABA-A e o neuroesteróide sulfato de pregnenolona no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, utilizando-se o muscimol, um agonista do receptor GABA-A, que no experimento

anterior, interferiu com o desenvolvimento da tolerância rápida. Animais, treinados e selecionados conforme protocolo, foram divididos em dois grupos. O primeiro recebeu como pré-tratamento 1, sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) e o segundo com salina. Quinze minutos após a administração, metade dos animais de cada grupo recebeu o pré-tratamento 2 com muscimol (0,60 mg/kg) e a outra, com salina. Quarenta e cinco minutos após a administração de sulfato de pregnenolona, cada grupo foi dividido em dois subgrupos que receberam o tratamento com etanol (2,25 g/kg) ou salina. Os animais foram submetidos ao rota-rod, trinta minutos após a última injeção, retornando posteriormente a suas gaiolas, de acordo com protocolo já descrito.

Resultados

Os resultados demonstraram que os animais tratados com etanol, no Dia 1, apresentaram a esperada incoordenação motora e os grupos controles pré-tratados com sulfato de pregnenolona e muscimol, não apresentaram prejuízo motor (figura 18). A ANOVA de três vias demonstrou apenas o efeito do tratamento com etanol: $F_{(1,72)} = 825,01$; $p < 0,0001$. No Dia 2,

verificou-se que todos os subgrupos SE apresentaram prejuízo motor e os que receberam etanol em ambos os dias (EE) desenvolveram tolerância rápida aos efeitos do etanol, com exceção dos animais pré-tratados com muscimol, nos quais não houve desenvolvimento da tolerância rápida, como já observado no experimento anterior. A administração de sulfato de pregnenolona impediu o bloqueio da tolerância rápida causado pelo muscimol. A ANOVA realizada com os dados obtidos, no Dia 2, demonstrou o efeito tratamento (etanol): $F_{(1,72)} = 50,194$ $p < 0,0001$; pré-tratamento 1 (PS): $F_{(1,72)} = 22,984$; $p < 0,0001$; pré-tratamento 2 (MUSC): $F_{(1,72)} = 19,582$; $p < 0,0001$. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que a injeção de muscimol bloqueou a tolerância rápida no Dia 2, e a administração de sulfato de pregnenolona antes do pré-tratamento com muscimol, impediu esse bloqueio.

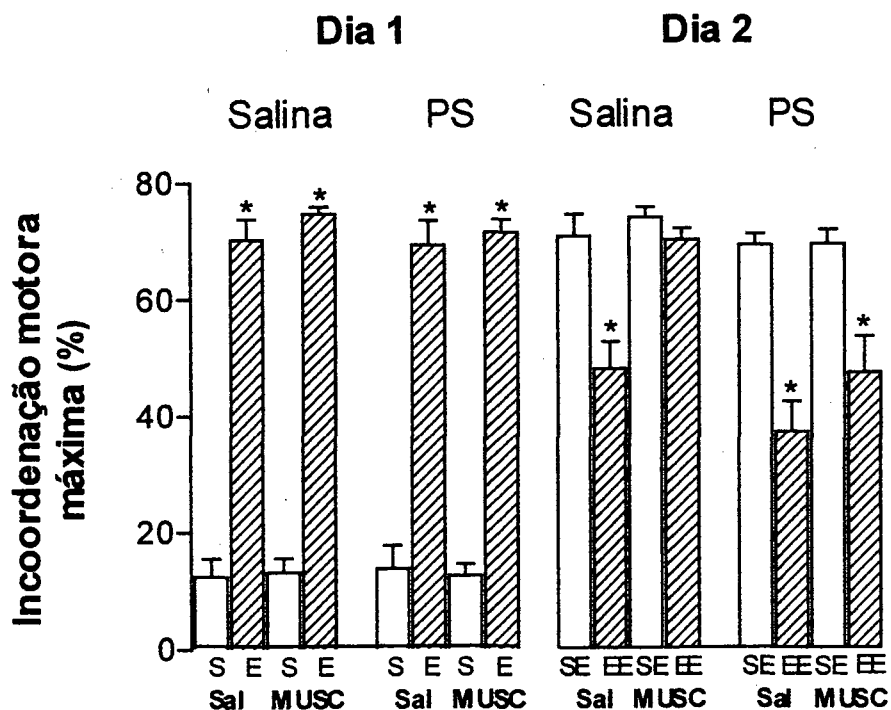


Figura 18 – Efeito da administração prévia do sulfato de pregnenolona sobre a interferência do muscimol na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. Um foi injetado com sulfato de pregnenolona (PS) 0,08 mg/kg e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com muscimol (MUSC) 0,60 mg/kg e a outra com salina (Sal). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 2,25 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 10: Efeito da administração prévia do sulfato de dehidroepiandrosterona sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo muscimol.

Como o experimento anterior, o presente experimento foi também realizado para investigar a participação do sistema GABA-A nos efeitos que

o sulfato de dehidroepiandrosterona exerce sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Animais, previamente treinados e selecionados no aparelho rota-rod, foram divididos em dois grupos. O primeiro recebeu como pré-tratamento 1, sulfato de dehidroepiandrosterona (0,15 mg/kg) e o segundo salina. Quinze minutos após a administração, metade dos animais de cada grupo recebeu o pré-tratamento 2, com muscimol (0,60 mg/kg) e a outra, com salina. Quarenta e cinco minutos após a administração de sulfato de dehidroepiandrosterona, cada grupo foi dividido em dois subgrupos que receberam o tratamento com etanol (2,25 g/kg) ou salina. Os animais foram submetidos ao rota-rod, trinta minutos após a última injeção, seguindo-se o mesmo procedimento adotado no experimento anterior.

Resultados

Os resultados deste experimento mostraram que apenas os animais tratados com etanol, no Dia 1, apresentaram incoordenação motora (figura 19). A ANOVA de três vias demonstrou apenas o efeito do tratamento com etanol: $F_{(1,72)} = 1210,58$; $p < 0,0001$. No Dia 2, verificou-se que todos os subgrupos SE apresentaram prejuízo motor e os que receberam etanol em

ambos os dias (EE) desenvolveram tolerância rápida aos efeitos do etanol, com exceção dos animais tratados com muscimol, que, como já demonstrado em experimento anterior, bloqueia a tolerância rápida. A administração de sulfato de dehidroepiandrosterona impediu o bloqueio da tolerância rápida causado pelo muscimol. A ANOVA realizada com os dados obtidos, no Dia 2, demonstrou o efeito tratamento (etanol): $F_{(1,72)} = 94,577$ $p < 0,0001$; pré-tratamento 1 (DHEAS): $F_{(1,72)} = 22,016$; $p < 0,0001$; pré-tratamento 2 (MUSC): $F_{(1,72)} = 32,761$; $p < 0,0001$. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que a injeção de muscimol bloqueou a tolerância rápida no Dia 2, e a administração prévia de sulfato de dehidroepiandrosterona, impediu esse bloqueio.

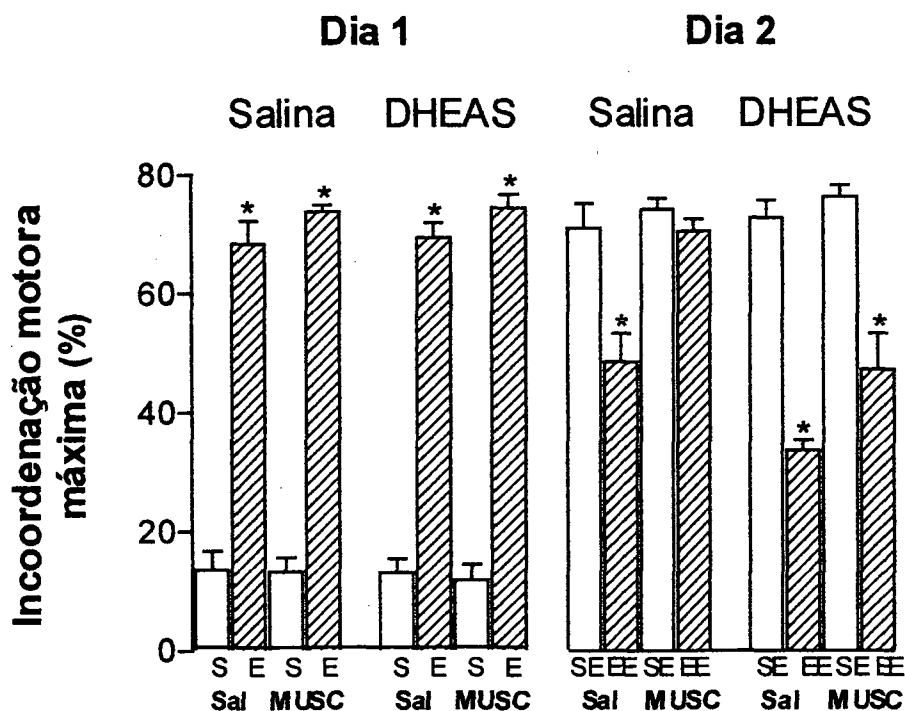


Figura 19 – Efeito da administração prévia do sulfato de dehidroepiandrosterona sobre a interferência do muscimol na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. Um foi injetado com sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) 0,15 mg/kg e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com muscimol (MUSC) 0,60 mg/kg e a outra com salina (Sal). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 2,25 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 11: Efeito da administração da epipregnanolona sobre a indução de tolerância crônica ao etanol.

A fim de verificar se o neuroesteróide epipregnanolona, bloquearia a aquisição da tolerância crônica ao etanol avaliada no modelo do rota-rod,

animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em dois grupos, os quais receberam salina e epipregnanolona (0,15 mg/kg). Após 30 minutos, cada um dos grupos foi subdividido em dois, que receberam etanol (2,5 g/kg) ou salina, respectivamente. A seguir, foram submetidos à avaliação no rota-rod, e findo o teste os animais retornaram às gaiolas; tal procedimento ocorreu durante quatro dias. No quinto dia, todos os animais foram tratados com etanol (2,5 g/kg), sendo novamente testados no aparelho do rota-rod.

Resultados

A administração de epipregnanolona bloqueou o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol, avaliada no teste do rota-rod (Figura 20). No Dia 1, a ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol $F_{(1,36)} = 318,038$; $p < 0,0001$. No Dia 5 do experimento, houve redução do prejuízo motor, de forma significativa, no grupo controle administrado com etanol + etanol (EE). A ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol $F_{(1,36)} = 28,412$; $p < 0,0001$. O grupo pré-tratado com epipregnanolona 0,15 mg/kg antes do etanol, no Dia 1, não apresentou tolerância, no Dia 5. A ANOVA de duas vias revelou o efeito do pré-

tratamento com epipregnanolona $F_{(1,36)} = 12,251$; $p < 0,0016$ e a interação pré-tratamento x tratamento $F_{(1,36)} = 7,896$; $p < 0,0093$. A análise *post-hoc* indicou que a epipregnanolona na dose 0,15 mg/kg, impediu no desenvolvimento da tolerância crônica (teste de Tukey). A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito do tempo de tratamento $F_{(4,144)} = 87,919$; $p < 0,0001$.

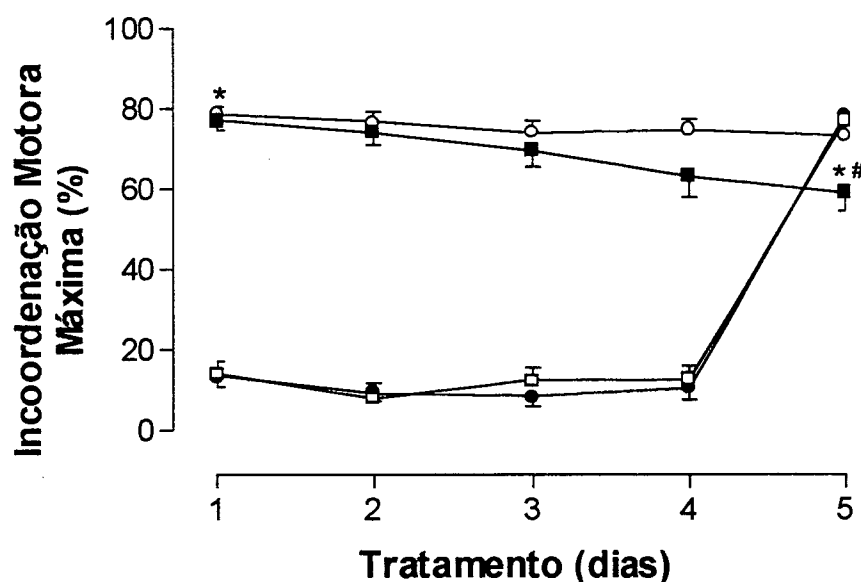


Figura 20 – Efeito da epipregnanolona no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol. Dois grupos receberam salina e outros dois grupos receberam epipregnanolona na dose de 0,15 mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina ou etanol 2,5 g/kg, i.p., no Dia 1, 2, 3 e 4. A tolerância crônica aos efeitos do etanol é observada no Dia 5, onde todos os grupos foram tratados com etanol na dose (2,5 g/kg, i.p.). O símbolo (□) representa o desempenho do grupo SS (S + S), (■) do grupo SE (S + E), (●) do grupo EPIS (EPI + S) e (○) do grupo EPIE (EPI + E). Os resultados são expressos pelas médias ± E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle; # $p < 0,05$ comparado com os Dias 1 e 2 (SE) (Teste de Tukey).

Experimento 12: Efeito da administração do sulfato de pregnenolona sobre a indução de tolerância crônica ao etanol.

Este experimento foi realizado para verificar se o sulfato de pregnenolona, facilitaria a aquisição da tolerância crônica ao etanol do mesmo modo que obtido com a tolerância rápida. Animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em dois grupos, os quais receberam salina e sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg). Após 30 minutos, cada um dos grupos foi subdividido em dois, que receberam etanol (2,5 g/kg) ou salina, respectivamente. A seguir, foram submetidos à avaliação no rota-rod, e findo o teste os animais retornaram às gaiolas; tal procedimento ocorreu durante quatro dias. No quinto dia, todos os animais foram tratados com etanol (2,5 g/kg), sendo novamente testados no aparelho do rota-rod.

Resultados

A administração de sulfato de pregnenolona facilitou o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol, avaliada no teste do rota-rod (Figura 21). No Dia 1, a ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol $F_{(1,36)} = 335,602$; $p < 0,0001$. No Dia 5 do experimento,

houve redução do prejuízo motor, de forma significativa, no grupo administrado com etanol + etanol (EE) em relação ao grupo controle. A ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol $F_{(1,36)} = 44,511$; $p < 0,0001$. O grupo pré-tratado com sulfato de pregnenolona 0,08 mg/kg antes do etanol, no Dia 1, apresentou tolerância, no Dia 5. A ANOVA de duas vias revelou o efeito do pré-tratamento com sulfato de pregnenolona $F_{(1,36)} = 5,291$; $p < 0,0273$ e a interação pré-tratamento x tratamento foi significativa $F_{(1,36)} = 5,052$; $p < 0,0308$. A análise *post-hoc* indicou que o sulfato de pregnenolona na dose 0,08 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância crônica (teste de Tukey). A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito do tempo de tratamento $F_{(4,144)} = 52,328$; $p < 0,0001$.

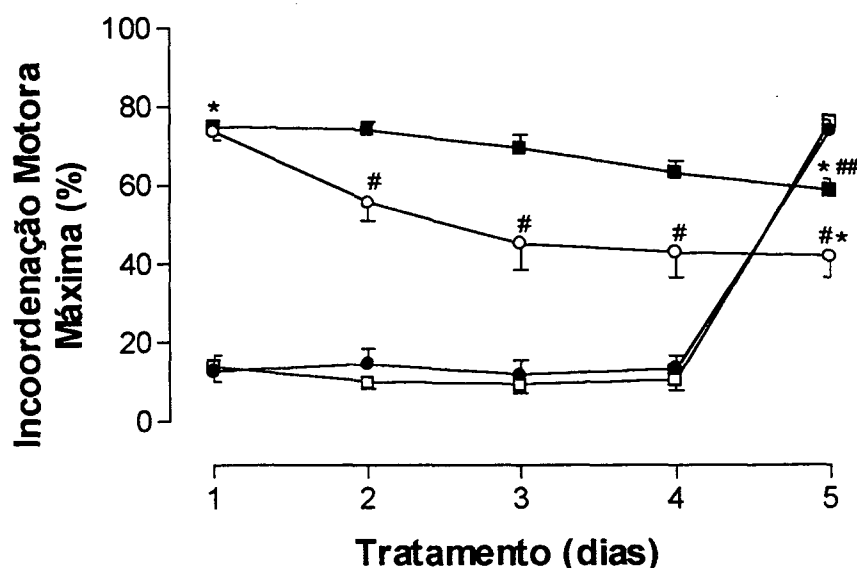


Figura 21 - Efeito do sulfato de pregnenolona no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol. Dois grupos receberam salina e outros dois grupos receberam sulfato de pregnenolona na dose de 0,08 mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina ou etanol 2,5 g/kg, i.p., no Dia 1, 2, 3 e 4. A tolerância crônica aos efeitos do etanol é observada no Dia 5, onde todos os grupos foram tratados com etanol na dose (2,5 g/kg, i.p.). O símbolo (□) representa o desempenho do grupo SS (S + S), (■) do grupo SE (S + E), (●) do grupo PSS (PS + S) e (○) do grupo PSE (PS + E). Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle; ## $p < 0,05$ comparado com os Dias 1 e 2 (SE); # $p < 0,05$ comparados com o Dia 1 (PSE) (Teste de Tukey).

Experimento 13: Dosagem do Álcool

A fim de verificar a possível interação farmacocinética entre o etanol e as demais drogas, sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg), sulfato de dehidroepiandrosterona (0,15 mg/kg), (+)MK-801 (0,06 mg/kg), epipregnanolona (0,15 mg/kg) e muscimol (0,60 mg/kg), sete grupos de

animais foram submetidos aos seguintes tratamentos: salina + etanol (1,9 g/kg); sulfato de pregnenolona + etanol (1,9 g/kg); sulfato de dehidroepiandrosterona + etanol (1,9 g/kg); (+)MK-801 + etanol (1,9 g/kg); salina + etanol (2,25 g/kg); epipregnanolona + etanol (2,25 g/kg); muscimol + etanol (2,25 g/kg). Após 30 minutos o sangue foi colhido e a dosagem alcoólica realizada como descrito no procedimento geral.

Resultados

Os resultados são apresentados nas tabelas 1 e 2. A ANOVA de uma via revelou que não existem diferenças significativas, entre os grupos. Estes dados sugerem que os efeitos dessas drogas na tolerância não se devem a uma interferência na farmacocinética do etanol, pois a concentração sangüínea de etanol foi similar entre os grupos.

Tabela 1. Efeito da concentração de etanol no sangue de camundongos no teste do rotarod. Quatro grupos de animais foram pré-tratados com salina, sulfato de pregnenolona, sulfato de dehidroepiandrosterona e (+)MK-801 (i.p.) 30 min antes da administração de etanol (1,9 g/kg i.p.). Os resultados estão expressos pelas médias \pm E.P.M. de 4 animais por grupo. * $p < 0,05$, comparado ao seu respectivo controle (ANOVA de uma via)

PRÉ-TRATAMENTOS	ALCOOLEMIA (mg/dl)
Salina	156,0 \pm 2,3
Sulfato de pregnenolona	134,5 \pm 7,2
Sulfato de dehidroepiandrosterona	133,6 \pm 11,5
(+)MK-801	138,2 \pm 9,7

Tabela 2. Efeito da concentração de etanol no sangue de camundongos no teste do rotarod. Três grupos de animais foram pré-tratados com salina, epipregnanolona e muscimol (i.p.) 30 min antes da administração de etanol (2,25 g/kg i.p.). Os resultados estão expressos pelas médias \pm E.P.M. de 4 animais por grupo. * $p < 0,05$, comparado ao seu respectivo controle (ANOVA de uma via)

PRÉ-TRATAMENTOS	ALCOOLEMIA (mg/dl)
Salina	182,3 \pm 3,2
Epipregnanolona	145,7 \pm 10,5
Muscimol	149,4 \pm 8,3

DISCUSSÃO

Tem-se sugerido que a tolerância ao etanol é um dos fatores associados com a dependência desta droga. É definida como um processo adaptativo do organismo, onde os efeitos de uma droga diminuem após um período em que ela é administrada repetidamente (Lê, 1990). Quando a tolerância se deve à redução da biodisponibilidade da droga no organismo, esta é denominada disposicional ou farmacocinética. Quando a adaptação ocorre no sistema nervoso central, a tolerância é considerada funcional ou farmacodinâmica (Kalant e Khanna, 1990). Esta tem sido bastante estudada, por ser uma forma de plasticidade neuronal, que são alterações estruturais e funcionais nas sinapses como resultado dos processos adaptativos.

Estudos mostram que o consumo agudo de etanol facilita a transmissão GABAérgica e inibe a transmissão glutamatérgica, enquanto que, a tolerância associada ao consumo crônico de etanol ocorre paralelamente à redução da transmissão GABAérgica e aumento da transmissão glutamatérgica (Nevo e Hamon, 1995; Crews *et al.*, 1996). É provável que estas adaptações influenciem o hábito de beber e o estado de dependência ao etanol (Schulteis *et al.*, 1996; Gordis, 1995; Morrow *et al.*, 1988; Mehta e Ticku, 1988).

O presente estudo demonstrou o desenvolvimento de tolerância rápida e crônica à incoordenação motora induzida pelo etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. Estes dados confirmam trabalhos prévios obtidos em nosso laboratório em camundongos (Morato e Barreto, 1996; Barreto *et al.*, 1998) e, em ratos, com outros modelos de incoordenação motora (Khanna *et al.*, 1996; Morato e Khanna, 1996). Utilizou-se o protocolo experimental com dose única de etanol no Dia 1 porque, além de minimizar o possível “stress” causado por duas administrações de etanol nos animais no primeiro dia, traz evidências adicionais de que a tolerância rápida é adquirida durante o teste sob ação do etanol. Esses resultados concordam com os de Khanna *et al.* (1996), mostrando que não há diferença no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora produzida pelo etanol utilizando dose única de etanol e doses subdivididas em ratos quando testados no “tilt plane”.

Vários estudos demonstraram que a tolerância à incoordenação motora produzida pelo etanol pode ser facilitada quando os animais praticam o teste enquanto intoxicados (Bitrán e Kalant, 1991; Chen, 1968; Leblanc *et al.*, 1973; Lê e Kalant, 1992) e que a aquisição da tolerância, pode ser influenciada pela aprendizagem (Crabbe *et al.*, 1979; Bitrán e Kalant, 1991; Lê *et al.*, 1987). Assim como a velocidade de aprendizagem inicial de uma

certa tarefa torna-se mais rápida na reaprendizagem, após um período em que foi esquecida, a reaquisição da tolerância após um período em que foi perdida, é mais rápida que a primeira aquisição da mesma. Para a investigação da participação de processos de aprendizagem na tolerância, uma das abordagens tem sido verificar se as drogas que prejudicam a aprendizagem, também prejudicariam o desenvolvimento da tolerância. Muitos trabalhos foram realizados nesse sentido (Ex.: Moreira *et al.*, 1981; Khanna *et al.*, 1996; Morato e Khanna, 1996; Barreto *et al.*, 1998).

Estudos têm demonstrado que antagonistas não-competitivos do receptor NMDA, podem bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida (Khanna *et al.*, 1991b; 1993a), bem como da tolerância crônica (Khanna *et al.*, 1992c.; 1994; Wu *et al.*, 1993) aos efeitos de hipotermia e incoordenação motora do etanol. Khanna *et al.* (1993b; 1995), mostraram que o (+)MK-801 e a cetamina quando administrados previamente à D-cicloserina, bloqueiam o desenvolvimento da tolerância rápida, sugerindo que este sistema esteja envolvido no desenvolvimento da tolerância ao etanol.

No presente estudo, foram inicialmente selecionadas as doses de etanol a serem usadas para avaliar a influência de neuroesteróides sobre a tolerância. Considerou-se que as doses de 2,0 e 2,25 g/kg de etanol poderiam ser adequadas para o estudo do bloqueio da tolerância. Considerando-se que

nessa faixa de doses camundongos apresentam aumento da atividade locomotora (Masur e Boerngen, 1980), não pode ser descartada a possibilidade de que uma estimulação locomotora relacione-se com o desenvolvimento da tolerância ao etanol. Para verificar se a dose de 1,9 g/kg de etanol, que não produz tolerância *per se*, resultaria em desenvolvimento de tolerância rápida pelo pré-tratamento com um agonista do sítio da glicina no receptor NMDA, utilizou-se a D-cicloserina (Rabe e Tabakoff, 1990). Esta, quando administrada previamente ao etanol no Dia 1, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida, confirmando trabalhos prévios obtidos em outros e em nosso laboratório (Khanna *et al.*, 1993b; 1995; Zaleski, 1998).

Após padronizada a tolerância rápida nesse modelo, a influência dos neuroesteróides no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, e a relação destes com os sistemas NMDA e GABA-A foram avaliadas. Utilizando-se o sulfato de pregnenolona, um modulador positivo do receptor NMDA e negativo do receptor GABA-A (Wu *et al.*, 1991b; Bolwby, 1993; Majewska *et al.*, 1990a; Mienville e Vicini, 1989), e o sulfato de dehidroepiandrosterona, um modulador negativo do receptor GABA-A (Demirgorem *et al.*, 1991; Majewska *et al.*, 1990b), verificou-se que a

administração destes previamente ao etanol, facilitou a aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora causada pelo etanol.

No entanto, utilizando-se a epipregnanolona, um modulador positivo do receptor GABA-A (Melchior e Ritzmann, 1996), verificou-se que sua administração previa, bloqueou a aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora causada pelo etanol. O efeito destes neuroesteróides em facilitar ou bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida ocorreu de forma dependente da dose. As doses utilizadas não alteraram a performance dos animais, os quais apresentaram resultados similares aos dos grupos controle (SS), indicando que as alterações de performance observadas em ambos os dias do teste devem ser atribuídas aos efeitos do etanol. Também não se observaram efeitos residuais destas drogas sobre a coordenação motora dos animais no Dia 2. Esses resultados sugerem que a administração destes neuroesteróides influenciam os processos relacionados com o desenvolvimento da tolerância ao etanol.

Vários estudos demonstraram que os receptores NMDA são sensíveis à modulação pelos neuroesteróides (Wu *et al.*, 1991b; Bowlby, 1993). Devido aos efeitos modulatórios positivos sobre este receptor em estudos *in vitro* (Wu *et al.*, 1991b; Bowlby, 1993), em estudos sobre as propriedades convulsivantes em camundongos (Maione *et al.*, 1992) e a diminuição do

prejuízo da aprendizagem e memória induzido por antagonistas do receptor NMDA (Mathis *et al.*, 1994; 1996), tem sido sugerido que o sulfato de pregnenolona module os processos de aprendizagem e memória através de sua ação sobre os receptores NMDA (Mathis *et al.*, 1996). A partir desses dados, testou-se, se a ação dos neuroesteróides sobre a tolerância ao etanol observada em nosso modelo, estaria ligada ao sistema NMDA.

O tratamento com MK-801, previamente à administração do sulfato de pregnenolona, bloqueou a facilitação da tolerância pela administração desse neuroesteróide. Como o sulfato de pregnenolona é modulador positivo do NMDA, este resultado sugere que a facilitação da tolerância por este neuroesteróide está relacionada com este sistema. No entanto, quando os animais foram submetidos a experimento semelhante, porém utilizando o sulfato de dehidroepiandrosterona, o prévio tratamento com MK-801 não bloqueou a facilitação causada por este neuroesteróide. Assim, este resultado sugere que o efeito do sulfato de dehidroepiandrosterona em nosso modelo não parece estar ligado ao sistema NMDA.

Em nosso estudo, observou-se que o MK-801 aumentou significativamente o efeito do etanol no Dia 1 em alguns experimentos. No entanto, não se observou nenhum efeito residual sobre a coordenação motora

dos animais no dia seguinte ou tolerância cruzada ao etanol. Tal resultado é compatível com os obtidos por Khanna *et al* (1994; 1993a; 1991b).

Trabalhos anteriores mostraram que ratos e camundongos ao serem tratados com doses superiores a 0,125 mg/kg de (+)MK-801 apresentaram elevado grau de prejuízo motor quando submetidos aos testes do “tilt plane” e “rota-rod” (Khanna *et al.*, 1993a; Barreto *et al.*, 1998). Com base nisso, foi utilizada a dose de 0,06 mg/kg de (+)MK-801. De fato, a dose de 0,12 mg/kg de (+)MK-801, promoveu uma fase inicial de excitação, seguida de uma elevada depressão motora, que impediu a manipulação dos animais para o teste (dados não apresentados).

Estudos têm mostrado que a ação do GABA pode ser potencializada ou antagonizada dependendo do neuroesteróide empregado. Os antagonistas GABA-A (como por exemplo, o sulfato de pregnenolona) atuam de maneira não competitiva, diminuindo a atividade desse receptor quando estimulados pelo GABA (Majewska *et al.*, 1988; Mienville e Vicini, 1989), enquanto que os moduladores alostéricos positivos estimulam e potencializam a ligação do GABA e benzodiazepinas a membranas neuronais, aumentando o transporte de cloreto (Majewska, 1986; Schumacher e McEwen, 1989).

No presente estudo, verificou-se que a administração do muscimol, um agonista do receptor GABA-A, previamente ao etanol, bloqueou a

aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora causada pelo etanol em camundongos submetidos ao rota-rod. O bloqueio exercido pelo muscimol, no desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do etanol, foi dependente da dose, sem interferir com a coordenação motora dos grupos controles no primeiro dia do teste. Também não houve qualquer efeito residual sobre a coordenação motora dos animais no segundo dia, sugerindo que o muscimol influencia processos relacionados com o desenvolvimento da tolerância ao etanol.

A partir desses resultados, o estudo sobre a interação entre o sistema GABA-A e neuroesteróides no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, foi realizado utilizando-se somente a dose de 0,60 mg/kg de muscimol. Os resultados mostraram que o tratamento prévio com sulfato de pregnenolona e sulfato de dehidroepiandrosterona evitou o bloqueio da tolerância causado pela administração de muscimol, no segundo dia, em camundongos tratados com etanol. Esse fato, sugere que estas drogas atuam por um mecanismo que envolve o receptor GABA-A.

Vários estudos têm sugerido que a tolerância ao etanol e outras drogas pode ser influenciada por vários fatores, tais como a prática sob a influência da droga, variação do sistema de teste, influência do ambiente, bem como pela dose de tratamento (Kalant e Khanna, 1980; 1990). Embora a existência

da tolerância rápida seja conhecida há 15 anos, estudos da relação entre a tolerância rápida e crônica, ou tolerância rápida e aguda, têm sido aprofundados recentemente. Devido á similaridade observada em ratos nos modelos de tolerância rápida e tolerância crônica, tem sido sugerido que a tolerância rápida pode ser usada como um modelo preditivo da tolerância crônica e cruzada (Khanna *et al.*, 1991a; 1992a; Chan *et al.*, 1985). Usando um modelo de tratamento crônico, Khanna *et al* (1992c; 1994) mostraram que ratos que recebem apenas etanol diariamente demonstraram significante tolerância ao etanol nos dias 5 e 10, mas aqueles que recebem cetamina previamente ao etanol, todos os dias, demonstraram significativamente menos tolerância ao etanol. A cetamina interferiu no desenvolvimento da tolerância crônica como havia sido previamente mostrado impedir a tolerância rápida. Em outros estudos, ambas as tolerâncias rápida e crônica foram similarmente bloqueadas pelo MK-801 (Szabó *et al.*, 1994). Recentemente, Khanna *et al* (1996) mostraram que em diferentes manipulações experimentais, a tolerância rápida foi similar a tolerância crônica e, embora estes estudos sejam consistentes, seriam necessários estudos adicionais para confirmar a hipótese de que a tolerância rápida e crônica são produzidas pelo(s) mesmo(s) processo(s).

O presente estudo demonstrou desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol em camundongos submetidos a um teste de coordenação motora, no rota-rod. Verificou-se que a dose de 2,5 g/kg de etanol administrada nos Dias 1, 2, 3 e 4, produziu tolerância no Dia 5 do teste, sendo escolhida para o estudo sobre a influência dos neuroesteróides, epipregnanolona e sulfato de pregnenolona na tolerância crônica ao etanol.

O tratamento crônico com epipregnanolona previamente ao etanol foi feito para verificar se este neuroesteróide bloquearia o desenvolvimento da tolerância crônica pelo etanol, como ocorreu com a tolerância rápida. Os resultados mostraram que o tratamento prévio com epipregnanolona, durante quatro dias, bloqueou significativamente o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol. Estes resultados foram obtidos com doses que não interferem com a coordenação motora dos animais nos Dias 1-4, também não se observando nenhum efeito residual sobre a coordenação motora basal dos animais no Dia 5.

Já o tratamento crônico com sulfato de pregnenolona previamente ao etanol foi realizado para verificar se facilitaria a aquisição da tolerância crônica pelo etanol. Os resultados mostraram que o tratamento prévio com sulfato de pregnenolona, durante quatro dias, facilitou significativamente o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol, no quinto dia do teste.

Esses resultados obtidos com o tratamento crônico foram similares aos obtidos com o tratamento agudo, reforçando a hipótese de que a tolerância rápida possa ser usada como um modelo preditivo da tolerância crônica (Khanna *et al.*, 1991a; 1992c; 1996).

Assim, os resultados do presente estudo demonstram que os neuroesteróides, sulfato de pregnenolona, sulfato de dehidroepiandrosterona e epipregnanolona, influenciam o desenvolvimento da tolerância aos efeitos do etanol, em camundongos, possivelmente por mecanismos relacionados ao sistema NMDA e ao sistema GABA-A. Muitas hipóteses podem ser aventadas para explicar estas interações. Primeiramente, pode-se ponderar que os neuroesteróides interferiram no desenvolvimento da tolerância por afetarem o metabolismo do etanol, uma vez que foram administrados por via sistêmica. No entanto, não há evidências de que os neuroesteróides afetem as concentrações de álcool (Melchior e Allen, 1992; Melchior e Ritzmann, 1996). Além disso, em nosso estudo, nenhum dos neuroesteróides empregados alterou as concentrações séricas de álcool, sugerindo que interferências farmacocinéticas não participam nesta interação observada.

Outra possibilidade de interferência na tolerância poderia decorrer de um bloqueio ou estímulo da ação do etanol pelos neuroesteróides. Nossos resultados sugerem que não houve uma ação direta dos neuroesteróides sobre

os efeitos do etanol, uma vez que não foram observadas diferenças significantes entre os grupos experimentais e os grupos controle, com relação ao tratamento no Dia 1.

Existem estudos mostrando que a tolerância e a dependência ao etanol estão associados com a diminuição na sensibilidade das respostas mediadas pelo receptor GABA-A no córtex cerebral (Morrow *et al.*, 1988a; Sanna *et al.*, 1993) e em cultura de neurônios da medula espinhal (Mehta e Ticku, 1988; Ticku, 1989). Há evidências de que após tratamento crônico com etanol, ambos etanol e GABA têm seus efeitos reduzidos no receptor, portanto, tanto a inibição quanto o influxo de cloreto são reduzidos (Allan e Harris, 1987; Morrow *et al.*, 1988; Grobin *et al.*, 1998). Outros estudos mostram um aumento na função do receptor NMDA após uso crônico com etanol (Grant *et al.*, 1990; Tabakoff e Hoffman, 1991; Samson e Harris, 1992). Considerando que a tolerância é um mecanismo adaptativo e que o álcool estimula os receptores GABA-A e bloqueia o receptor NMDA (Tabakoff e Hoffmam, 1996), poder-se-ia pensar que a tolerância rápida ocorreu por uma subsensibilidade de receptores GABA-A ou por uma supersensibilidade de receptores NMDA. Nesse contexto, o sulfato de pregnenolona (que modula negativamente o receptor GABA-A e positivamente o receptor NMDA) poderia atuar de modo oposto ao do álcool

dificultando a adaptação. O mesmo seria esperado do efeito do sulfato de dehidroepiandrosterona, modulador negativo do GABA-A. Já a epipregnanolona, modulador positivo do GABA-A, atuaria no mesmo sentido do álcool, contribuindo para a subsensibilidade do receptor GABA-A, facilitando a adaptação. No entanto, em nosso estudo os efeitos dos neuroesteróides moduladores negativos do GABA-A e positivo do NMDA facilitaram a aquisição da tolerância, enquanto que o modulador positivo do GABA-A bloqueou a tolerância.

Uma outra possibilidade para explicar os resultados é a interferência, dos neuroesteróides, em processos adaptativos relacionados com a plasticidade sináptica, como a LTP, durante o primeiro dia de exposição ao rota-rod. Como já mencionado, há evidências de que os sistemas receptor NMDA e do receptor GABA-A estejam envolvidos com os processos de aprendizagem e memória, como a LTP (Morrisett e Swartzwelder, 1993), e que a tolerância pode sofrer influência do aprendizado (Bitrán e Kalant, 1991). Além disso, como mencionado anteriormente, vários estudos têm sugerido que os neuroesteróides podem facilitar a aprendizagem e memória. Mathis *et al* (1994; 1996), investigaram os efeitos da administração do sulfato de pregnenolona sobre a aprendizagem e memória em camundongos, revelando que este neuroesteróide reverteu o prejuízo da performance

induzido por antagonistas do receptor NMDA, tanto no rota-rod quanto na caixa de Skinner. Um outro estudo feito por Flood *et al* (1992; 1988), utilizando camundongos tratados com sulfato de pregnenolona e dehidroepiandrosterona, mostrou uma melhora da memória, avaliada no “T-maze”. Mais recentemente, Melchior e Ritzmann (1996), revelaram que os neuroesteróides, dehidroepiandrosterona, pregnenolona e seus sulfatos (moduladores negativos GABA-A) facilitaram, enquanto a pregnanolona e epipregnanolona (moduladores positivos GABA-A) prejudicaram a memória. Ademais, a sugestão de que os neuroesteróides, podem prevenir o prejuízo de memória produzido pelo etanol (Melchior e Ritzmann, 1996), mostrou-se consistente com estudos envolvendo outros compostos GABAérgicos (Castelano e Pavone, 1988).

Considerados em conjunto, nossos resultados reforçam a hipótese de que a tolerância rápida pode sofrer influência do aprendizado, e ainda sugerem que a tolerância rápida pode ser usada como um modelo preditivo da tolerância crônica.

CONCLUSÕES

1. O pré-tratamento com sulfato de pregnenolona (0,05; 0,08 e 0,15 mg/kg) e sulfato de dehidroepiandrosterona (0,10; 0,15 e 0,20 mg/kg) facilitou o desenvolvimento da *tolerância rápida* para os efeitos do etanol, de modo dependente da dose.
2. O pré-tratamento com epipregnanolona (0,10 e 0,15 mg/kg) bloqueou o desenvolvimento da *tolerância rápida* para os efeitos do etanol, de modo dependente da dose.
3. O (+)MK-801 na dose 0,06 mg/kg bloqueou significativamente a facilitação *tolerância rápida* ao etanol induzida pela administração de sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg), mas não pela administração de sulfato de dehidroepiandrosterona (0,15 mg/kg).
4. O tratamento com sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) e sulfato de dehidroepiandrosterona (0,15 mg/kg), impediram significativamente o bloqueio da *tolerância rápida* ao etanol, pelo muscimol (0,60 mg/kg).

5. A epipregnanolona (0,15 mg/kg) bloqueou e o sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) facilitou o desenvolvimento da *tolerância crônica* ao etanol.

6. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que os neuroesteróides interferem com a *tolerância rápida* induzida pelo etanol, possivelmente por um mecanismo que envolve o receptor NMDA e o receptor GABA-A. Os nossos resultados também sugerem que a *tolerância rápida* pode ser usada como um modelo preditivo da *tolerância crônica*.

ABSTRACT

Previous studies from this and other laboratories have shown that drugs that impair learning and memory can block the development of chronic and rapid tolerances to ethanol in rodents. Moreover some studies have found that neurosteroids may facilitate learning. The aim of the present study was to investigate the influence of neurosteroids on the development of rapid tolerance (RT) to ethanol. Male Swiss mice were tested in the rota-rod apparatus at 30, 60 and 90 min. after intraperitoneal ethanol injections. Initially, we evaluated rapid tolerance using different doses of ethanol (1.9 – 3.0 g/kg) in order to select two doses to be used further. In a second step, we investigated whether PS (0.03 – 0.15 mg/kg), DHEAS (0.05 - 0.20 mg/kg) and EPI (0.05 – 0.15 mg/kg) injected before ethanol on Day 1 influenced the development of RT to ethanol. Pretreatment of animals with PS or with DHEAS significantly stimulated the acquisition of tolerance. Pretreatment with EPI significantly blocked the development of RT. Furthermore, administration of (+)MK-801 reversed the stimulatory action of PS and did not reversed the stimulatory action of DHEAS on tolerance development. Pretreatment with PS or DHEAS prevented the inhibitory action of muscimol on tolerance development. Recently, it was suggested that RT could be a predictor for chronic tolerance, given the similarities observed in both rapid and chronic types. Thus, we investigated the effect of chronic EPI or PS treatment on chronic tolerance to ethanol. It was observed that chronic tolerance to the motor incoordinating effect of ethanol in mice was blocked by pretreatment with EPI. Conversely, it was stimulated by pretreatment with PS. Considering that PS e DHEAS are negative modulators of GABA-A, and that PS may be a positive modulator of NMDA, taken together, our results suggest that neurosteroids influence the development of rapid tolerance to ET, possibly by an mecanism related to both NMDA and GABA-A receptors. Furthermore, our results strenghtens the suggestion that RT may be a predictor for chronic tolerance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, A.M. e HARRIS, R.A. Acute chronic ethanol treatment alters GABA receptor-operated chloride channels. *Pharmacol Biochem Behav*, 27: 665-670, 1987.
- ALLAN, A.M.; MAYES, C.G.; DRASKI, L.J. Gamma-aminobutyric acid-activated chloride channels in rats selectively bred for differential acute sensitivity to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 15 (2): 212-218, 1991.
- ARAGON, C.M.; ROGAN, F.; AMIT, Z. Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H₂O₂ system. *Biochem Pharmacol*, 44: 93-98, 1992.
- BARRETO, P.S.; LEMOS, T.; MORATO, G.S. NMDA-receptor antagonists block the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Addiction Biology*, 3: 55-64, 1998.
- BAULIEU, E.E. Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell*, 71: 3-10, 1991.
- BEGERON, R.; MONTIGNY, C.; DEBONNEL, G. Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *J Neuroscience*, 16(3): 1193-1202, 1996.
- BITRÁN, M. e KALANT, H. Learning factor in rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment. *Pharmacol Biochem Behav*, 39: 917-922, 1991.
- BLISS, T.V.P. e COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361: 31-39, 1993.
- BOWLBY, M.R. Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-d-aspartate receptor channels in hippocampal neuron. *Molec Pharmacol*, 43: 813-819, 1993.
- CARR, L.G.; LI, T. e YIN, S. Cytochrome P4502E1 Genotypes, Alcoholism, and Alcoholic Cirrhosis in Han Chinese and Atayal Natives of Taiwan. *Alcohol Clin Exp Res*, 20 (1): 43-46, 1996.
- CASTELANO, C. e PAVONE, F. Effects of ethanol on passive avoidance behavior in the mouse: Involvement of GABAergic mechanisms. *Pharmacol Biochem Behav*, 29: 321-324, 1988.

- CHAN, A.W.K.; SCHANLEY, D.L.; ALEO, M.D.E LEONG, F.W. Cross tolerance between ethanol and chlordiazepoxide. *Alcohol*, 2: 209-213, 1985.
- CHANDLER, J.L.; HARRIS, A.R.; CREWS, T.F. Ethanol tolerance and synaptic plasticity. *Tips*, 19: 491-495, 1998.
- CHEN, C.S. A study of the alcohol-tolerance effect and an introduction of a new behavioral technique. *Psychopharmacology (Berl.)*, 12: 433-440, 1968.
- CLONINGER, C.R. Neurogenetic adaptative mechanisms in alcoholism. *Science*, 236: 410-416, 1987.
- COLLINGRIDGE, G.L.; HARVEY, J.; FRENGUELLI, B.G.; BORTOLOTTI, Z.I.B.; DAVIES, C.H. Amino acid receptors and long term potentiation: targets for the development of cognitive enhancers. *Int Acad Biomed Res*, 2: 41-49, 1992.
- COLLINGRIDGE, G.L. e LESTER, R.A. J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Ver*, 40: 143-210, 1989.
- COLLINGRIDGE, G.L. e SINGER, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci*, 11: 290-296, 1990.
- COMPAGNONE, N.A.; BULFONE, A.; RUBENSTEIN, J.L.; MELLON, S.H. Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology*, 136(11): 5212-5223, 1995.
- CORPÉCHOT, C.; SYNGUELAKIS, M.; TALHA, S.; AXELSON, M.; SOJÖVALL, J.; VIHKO, R.; BAULIEU, E.E.; ROBEL, P. Pregnenolone and its sulphate ester in the rat brain. *Brain Res*, 270: 119-125, 1983.
- COSTA, E.; AUTA, J.; GUIDOTTI, A.; KORNEYEV, A. The pharmacology of neurosteroidogenesis. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 49: 385-389, 1994.
- COTMAN, C.W.; MONAGHAN, D.T.; OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *TINS*, 10: 273-280, 1987.
- CRABBE, J.C.; RIGTER, H.; UIJLEN, J.; STRIJBOS, C. Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. *J. Pharmacol Exper Ther*, 208: 128-133, 1979.
- CREWS, F.T.; MORROW, A.L.; CRISWELL, H.; BREESE, G. Effects of ethanol on ion channels. *Int Ver Neurobiol*, 39: 283-367, 1996.

- DAVIES, P.A.; HANNA, M.C.; HALES, T.G. e KIRKNESS, E.F. Insensitivity to anaesthetic agents conferred by class of GABA-A receptor subunit. *Nature*, 385: 820-823, 1997.
- DEMIRGOREN, S.; MAJEWSKA, M.D.; SPIVAK, C.E.; LONDON, E.D. Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, na antagonist of the GABA_A receptor. *Neuroscience*, 45: 127-135, 1991.
- ECKARDT, M.J.; FILE, S.E.; GESSA, G.L.; GRANT, K.A.; GUERRI, C.; HOFFMAN, P.L.; KALANT, H.; KOOB, G.F.; LI, T.K.; TABAKOFF, B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(5):998-1040, 1998.
- ERICKSON, C.K. e GRAHAM, D.T. alterations in cortical and reticular acetylcholine release by ethanol in vivo. *J pharmacol Exp Ther*, 185: 583-593, 1973.
- ERWIN, V.G.; McCLEARN, G.E.; KUSE, A.R. Interrelationships of alcohol consumptions, actions of alcohol and biochemical traits. *Pharmacol Biochem Behav*, 13 (1): 297-302, 1980.
- ESTALL, B.L.; GRANT, S.J.; CICALA, G.A. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol biochem Behav*, 46: 959-962, 1993.
- EVANS, M.S. e VIOLA-McCABE, K.E. Midazolam Inhibits Long-Term Potentiation Through modulation of GABA_A Receptors. *Neuropharmacology*, 35(3): 347-357, 1996.
- FAINGOLD, C.L.; N'GOUENO, P.; RIAZ, A. Ethanol and neurotransmitter interactions from molecular to integrative effects. *Prog Neurobiol*, 55 (5): 509-535, 1998.
- FEIGENSPAN, A., WASSLE, H., BORMANN, J. Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. *Nature*, 14;361(6408): 159-162, 1993.
- FRENCH-MULLEN, J.H.M. e SPENCE, K. Neurosteroids block ca²⁺ channel current in freshly isolated hippocampal CA1 neurons. *Eur J Pharmacol*, 202: 269-272, 1991.
- FLOOD, J.F. e ROBERTS, E. Deydroepiandrosterone sulfate improves memory in aging mice. *Brain Res*, 488: 178-181, 1988.
- FLOOD, J.F.; MORLEY, J.E.; ROBERTS, E. Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 1567-1571, 1992.

- GILL, K.; MENEZ, J.F.; LUCAS, D. DEITRICH, R. A. Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. *Alcohol Clin Exp Res*, 16: 910-915, 1992.
- GIVENS, B.S. Low doses of ethanol impair spatial working memory and reduce hippocampal theta. *Alcohol Clin Exp Res*, 19: 763-767, 1995.
- GOLDSTEIN, D.B. Physical dependence on ethanol: Its relation to tolerance. *Drug Alcohol Depend*, 4: 33-42, 1979.
- GORDIS, E. Alcohol and tolerance. *NIAAA Alcohol Alert*, 28: 1-4, 1995.
- GRANT, K.A.; VALVERIUS, P.; HUDSPITH, M.; TABAKOFF, B. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur J Pharmacol*, 176: 289-296, 1990.
- GROBIN, A.C.; MATTHEWS, D.B.; DEVAUD, L.L.; MORROW, A.L. The role of GABA_A receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology*, 139: 2-19, 1998.
- HOFFMAN, P.L.; RABE, C.S.; MOSES, F.; TABAKOFF, B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem*, 52: 1937-1940, 1989.
- HOFFMAN, P.L. e TABAKOFF, B. The role of the NMDA receptor in ethanol withdrawal. *EXS*, 71: 61-70, 1994.
- HOLLMANN M. e HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17: 31-108, 1994.
- HU, Z.Y.; JUNG-TESTAS, I.; ROBEL, P.; BAULIEU, E.E. Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 8215-8219, 1987.
- HUNT, W.A. e MAJCHROWICZ, E. Alterations in high-affinity choline uptake in brain after chronic ethanol treatment. *J Pharmacol Exp Ther*, 210: 259-263, 1985.
- IRWIN, R.P.; MARAGAKIS, N.J.; ROGAWSKI, M.A.; PURDY, R. .; FARB, D.H.; PAUL, S.M. Pregnenolone sulfate augments NMDA receptor mediated increases in intracellular Ca²⁺ in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett*. 141: 30-34, 1992.
- ITO, M. Roles of GABA neurons in integrated functions of the vertebrate CNS, In: GABA in neurons system function. ROBERTS, E.; CHASE, T. N. and TOWER, D. B., (eds). *Raven Press, New York*. 427, 1976.

- IZQUIERDO, I. Role of NMDA receptors in memory. *Trends pharmacol Sci.* 21, 1991.
- IZQUIERDO, I. e MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem*, 63(1): 19-32, 1995.
- JACKSON, M.B.; LEAR, H.; MATHERS, D.A.; BARKER, J.L. Single channels currents activated by γ -aminobutyric acid, muscimol, and (-)-pentobarbital in cultured mouse spinal neurones. *J Neurosci*, 2: 889-894, 1982.
- JARGENSEN, M.; TYGESEN, C.K.; ANDERSEN, P.H. Iontropic glutamate receptors-focus on non-NMDA receptors. *Pharmacology and Toxicology*, 76: 312-319, 1995.
- JOHNSON, J.W. e ASCHER, P. Glicine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325: 529-531, 1987.
- JOHNSTON, G.A.R. GABA_C receptors. *Prog. Brain Res*, 100: 61-65, 1994.
- JOHNSTON, G.A.R. GABA_A receptor pharmacology. *Pharmacol Ther*, 69: 173-198, 1996.
- KALANT, H. Tolerance, learning and neurochemical adaptation. *Can J Physiol Pharmacol*, 63: 1485-1494, 1985.
- KALANT, H. Research on tolerance: What can we learn from history? *Alcohol Clin Expres*, 22: 67-76, 1998.
- KALANT, H. e KHANNA, J.M. Environment-neurochemical interactions in ethanol tolerance. In: Sandler, M., (eds) *Psychopharmacology of alcohol*. Raven Press, New York. 107-120, 1980.
- KALANT, H. e KHANNA, J.M. Methods for the study of tolerance. *Mod Meth Pharmacol*, Vol 6, 43-66, 1990.
- KALANT, H.; LEBLANC, A.E.; GIBBINS, R.J. Tolerance to, and dependence on, some non-opiate psychotropic drugs. *Pharmacol Rev*, 23: 135-191, 1971.
- KAUPMANN, K.; HUGGEL, K.; HEID, J.; FLOR, P.J.; BISCHOFF, S.; MICKEL, S.J.; McMASTER, B. Expression cloning of GABA-B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386: 239-246, 1997.
- KERR, D.I.B. e ONG, J. GABA_B receptors. *Pharmacol Ther*, 67: 187-246, 1995.

- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; SHAH, G.; WEINER, J. Rapid tolerance as an index of chronic tolerance. *Pharmacol Biochem Behav*, 38: 427-432, 1991a.
- KHANNA, J.M.; WU, P.H.; WEINER, J.; KALANT, H. NMDA antagonist inhibits rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 26: 643-645, 1991b.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; WEINER, J.; CHAU, A. Rapid tolerance and cross-tolerance as predictors of chronic tolerance and cross-tolerance. *Pharmacol Biochem Behav*, 41: 355-360, 1992a.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; SHAH, G.; CHAU, A. Effect of (+) MK-801 and ketamine on rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 28: 311-314, 1992b.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; WEINER, J.; CHAU, A.; SHAH, G. Ketamine retards chronic but not acute tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 42: 347-350, 1992c.
- KHANNA, J.M.; SHAH, G.; WEINER, J.; WU, P.H.; KALANT, H. Effect of NMDA antagonists on rapid tolerance to ethanol. *European J Pharmacol*. 230: 23-31, 1993a.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; SHAH, G.; CHAU, A. Effect of D-cycloserine on rapid tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 45: 983-986, 1993b.
- KHANNA, J.M.; MORATO, G.S.; CHAU, A.; SHAH, G.; KALANT, H. Effect of NMDA antagonists on rapid and chronic tolerance to ethanol: importance of intoxicated practice. *Pharmacol Biochem Behav*, 48: 755-763, 1994.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; MORATO, G.S.; CHAU, A.; SHAH, G. D-cycloserine enhances rapid tolerance to ethanol motor incoordination. *Pharmacol Biochem Behav*, 52: 609-611, 1995.
- KHANNA, J.M.; CHAU, A.; SHAH, G. Characterization of the Phenomenon of Rapid tolerance to Ethanol. *Alcohol*, 13(6): 621-628, 1996.
- KHANMAA, K. e TABAKOFF, B. Neurochemical correlates of tolerance and strain differences in the neurochemical effects of ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 18: 383-388, 1993.
- KREEB, M.J. Multiple Drug Abuse Patterns and Medical Consequences. In: Psychopharmacology: The third Generation of Progress (eds). *Raven Press, New York*. Cap 172, 1597-1604, 1987.
- LÊ, A.D. Factors regulating ethanol tolerance. *Ann Med*, 22: 265-268, 1990.

- LÊ, A.D. e KALANT, H. Influence of intoxicated practice on the development of acute tolerance to the motor impairment effect of ethanol. *Psychopharmacology*, 106: 572-576, 1992.
- LÊ, A.D., KALANT, H. e KHANNA, J.M. Role of intoxicated practice in the development of ethanol tolerance. *Psychopharmacology*, 99: 366-370, 1989.
- LÊ, A.D., KHANNA, J.M. e KALANT, H. Role of Pavlovian conditioning in the development of tolerance and cross-tolerance to the hypothermic effect of ethanol and hydralazine. *Psychopharmacology*, 92: 210-214, 1987.
- LÊ, A.D.; KHANNA, J.M.; KALANT, H.; LEBLANC, A.E. Effect of tryptophan on the acquisition of tolerance to ethanol-induced motor impairment and hypothermia. *Psychopharmacology*, 61: 125-129, 1979.
- LÊ, A.D. e KIIANMAA, K. Characteristics of ethanol tolerance in alcohol drinking (AA) and alcohol avoiding (ANA) rats. *Psychopharmacology*, 94: 479-483, 1988.
- LEBLANC, A.E e GIBBINS, R.J. Acute tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 41: 43-49, 1975.
- LEBLANC, A.E; GIBBINS, R.J.; KALANT, H. Behavioral augmentation of tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacology*, 30: 117-112, 1973.
- LEBLANC, A.E; KALANT, H.; GIBBINS, R.J. Acquisition and loss of behaviorally augmented tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacology*, 48: 153-158, 1976a.
- LEBLANC, A.E; KALANT, H.; GIBBINS, R.J.; BERMAN, N.D. Acquisition and loss of tolerance to ethanol by the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 168: 244-250, 1969.
- LESLIE, W.; BROWN, L.M.; DILDY, J.E.; SIMS, J.S. Ethanol and neuronal calcium channels. *Alcohol*, 7: 233-236, 1990.
- LIEBER, C.S. Mechanisms of ethanol-drug-nutrition interactions. *J Toxicol Clin Toxicol*, 32: 631-681, 1994.
- LIPTON, S.A. e ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*, 330: 613-622, 1994.
- LOVINGER, D.M.; WHITE, G.; WEIGHT, F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 243: 1721-1724, 1989.

- MACDONALD, R.L.; ROGERS, C.L.; TWYMAN, R.E. Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABA-A receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol*, 417: 483-500, 1989.
- MAIONE, S.; BERRINO, L.; VITAGLIANO, S.; LEYVA, J.; ROSSI, F. Pregnenolone sulfate increases the convulsant potency of N-methyl-d-aspartate in mice. *Eur J Pharmacol*, 219: 477-479, 1992.
- MAJEWSKA, M.D. Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABA-A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol*, 38: 379-395, 1992.
- MAJEWSKA, M.D.; DEMIRGOREN, S.; LONDON, E.D. Binding of pregnenolone sulfate to rat brain membranes suggests multiple sites of steroid action at the GABA_A receptor. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol Sect*, 189: 307-315, 1990a.
- MAJEWSKA, M.D.; DEMIRGOREN, S.; SPIVAK, C.E.; LONDON, E.D. The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABA_A receptor. *Brain Res*, 526: 143-146, 1990b.
- MAJEWSKA, M.D.; HARRISON, N.L.; SCHWARTZ, R.D.; BARKER J.L.; PAUL, S.M. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 232, 1004, 1986.
- MAJEWSKA, M.D.; MIENVILLE, J.D.; VICINI, S. Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonises electrophysiological responses to GABA in neurones. *Neurosci Lett*, 90, 279, 1988.
- MANSFIELD, J.G. e GUNNINGHAM, C.L. Conditioning and extinction of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in rats. *J Comp Physiol*, 94: 962-969, 1980.
- MASUR, J. e BOERNGEN, R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. *Pharmacol Biochem Behav*. 114: 315-320, 1980.
- MATHERS, D.A. e BARKER, J.L. (-)-Pentobarbital opens ion channels of long duration in cultured mouse spinal neurons. *Science*, 209: 507-509, 1980.
- MATHIS, C.; PAUL, S.M.; CRAWLEY, N. The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks NMDA antagonist-induced deficits in a passive avoidance memory task. *Psychopharmacology*, 116: 201-206, 1994.
- MATHIS, C.; VOGEL, E.; CAGNIARD, B.; CRISCUOLO, F.; UNGERER, A. The Neurosteroids Pregnenolone Sulfate Blocks Deficits Induced by a Competitive NMDA Antagonist in Active Avoidance and Lever-press Learning Tasks in Mice. *Neuropharmacology*, 35(8): 1057-1064, 1996.

- MAURICE, T.; JUNIEN, J. L.; PRIVAT, A. Dehydroepiandrosterone sulfate attenuates dizolciline-induced learning impairment in mice via σ 1-receptors. *Behav Brain Res*, 83: 159-164, 1997.
- MAYER, M.L. e WESTROOK, G.L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J Physiol*, 394: 501-527, 1987.
- MAYO, W.; DELLU, F.; ROBEL, P.; CHERKAOUI, J.; LE MOAL, M., BAULIEU, E. E.; Simon, H. Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Res*, 607: 324-328, 1993.
- McBURNEY, R.N. e BARKER, J.L. GABA-induced conductance fluctuations in cultured spinal neurons. *Nature*, 274, 596, 1978.
- McCAULEY, L.D.; PARK, C.H.; LAN, N.C.; TOMICH, J.M.; SHIVELY, J.E.; GEE, K.W. Benzodiazepines and peptides stimulate pregnenolone synthesis in brain mitochondria. *Eur J Pharmacol*, 276: 145-153, 1995.
- McENTEE, W.J. e CROOK, T.H. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*, 111: 391-401, 1993.
- McEWEN, B.C. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci*, 12: 141-147, 1991.
- MEHTA, A.K. e TICKU, M.K. Ethanol potentiation of GABAergic transmission in cultured spinal cord neurons involves γ -aminobutyric acid-gated chloride channels. *J Pharmacol Exp Ther*, 246: 558-564, 1988.
- MELCHIOR, C.L. e ALLEN, P.M. Interaction of pregnanolone and pregnenolone sulfate with ethanol and pentobarbital. *Pharmacol Biochem Behav*. 42: 605-611, 1992.
- MELCHIOR, C.L. e RITZMANN, R.F. Dehydroepiandrosterone enhances the hypnotic and hypothermic effects of ethanol and pentobarbital. *Pharmacol Biochem Behav*. 43: 223-227, 1992.
- MELCHIOR, C.L. e RITZMANN, R.F. Neurosteroids Block the Memory-Impairing Effects of Ethanol in Mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 53(1): 51-56, 1996.
- MELCHIOR, C.L. e TABAKOFF, B. Modification of environmentally-cued tolerance to ethanol in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 219: 175-180, 1981.

- MELCHIOR, C.L. e TABAKOFF, B. Features of environment-dependent tolerance to ethanol. *Psychopharmacology*, 87: 94-100, 1985.
- MELLAMBY, E. Alcohol: its absorption into and disappearance from the blood under different conditions. *MRC Special Report Series* No. 31. HMSO, London, 1919.
- MELLO, N.K. Alcohol Abuse and Alcoholism 1978-1987. In: *Psychopharmacology: The third Generation of Progress* (eds). *Raven Press, New York*. Cap. 162, 1515-1520, 1987.
- MICHAEL, S.; ROBEL, P.; BAULIEU, E.E. Development and regeneration of the nervous system: A role for neurosteroids. *Neurosci*, 18: 6-21, 1996.
- MIENVILLE, J.M. e VICINI, S. Pregnenolone sulfate antagonises GABA-A receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res*, 489, 190-194, 1989.
- MIHIC, S.J.; YE, Q.; WICK, M. J.; KOLTCHINES, V.V.; KRASOWSKI, M.D.; FINN, S.E.; MASCIA, M.P.; VALENZUELA, C.F.; HANSON, K.K.; GREENBLATT, E.P.; HARRIS, R.A.; HARRINSON, N.L. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA_A and glycine receptors. *Nature*, 389: 385-389, 1997.
- MONAGHAN, D.T. e COTMAN, C.W. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive 1-[³H]glutamate binding sites in rat brain. *J Neurosci*, 5: 2909-2919, 1986.
- MONAGHAN, J.B.; HANDELMANN, G.E.; HOOD, W.F.; CORDI, A.A. D-cycloserine, a positive modulator of the N-methyl-D-aspartate receptor, enhances performance of learning tasks in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 34: 649-653, 1989.
- MONNET, F.P.; MAHÉ, V.; ROBEL, P.; BAULIEU, E.E. Neurosteroids, via σ receptors, modulate the [³H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Prog Natn Acad Sci USA*. 92: 3774-3778, 1995.
- MORATO, G.S. e BARRETO, P.S. Ketamine influences rapid tolerance to ethanol. *Alcoholism Clin Exper Research*, 20: 20A, 1996.
- MORATO, G.S. e KHANNA, J.K. N-methyl-D-aspartate receptors, nitric oxide, and ethanol tolerance. *Bras J Med Biol Res*. 29: 1415-1426, 1996.

- MOREIRA, L.F.S., CAPRIGLIONE, M.J., MASUR, J. Development and Reacquisition of Tolerance to Ethanol Administered Pre- and Post-trial to Rats. *Psychopharmacology*, 73: 165-167, 1981.
- MORRIS, R.G.M.; ANDERSON, E.; LYNCH, G.S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319: 774-776, 1986.
- MORRISETT, R.A. e SWARTZWELDER, H.S. Attenuation of Hippocampal Long-Term Potentiation by Ethanol: A Patch-clamp Analysis of Glutamatergic and GABAergic Mechanisms. *J Neurosci*, 13 (5): 2264-2272, 1993.
- MORRISETT, R.A.; MARTIN, D.; OEHING, T.A.; LEWIS, D.V.; WILSON, W. A.; SWARTZWELDER, H.S. Ethanol and Mg^{++} inhibit NMDA mediated synaptic potentials in an interactive manner. *Neuropharmacology*, 30: 1173-1178, 1991.
- MORROW, A.L.; PLACE, J.R.; PURDY, R.H.; PAUL, S.M. Characterization of steroid interactions with γ -aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites. *Molec Pharmacol*, 37: 263-270, 1990.
- MORROW, A.L.; SUZDAK, P.D.; KARANIAN, J.K.; PAUL, S.M. Chronic ethanol administration alters γ -aminobutyric acid, pentobarbital and ethanol-mediated ^{36}Cl -uptake in cerebral cortical synaptoneuroosomes. *J Pharmacol Exp Ther*, 246: 158-164, 1988.
- MORSE, R.M. e FLAVIN, D.K. The definition of alcoholism. *Journal of the American Medical Association*, 268: 1012-1014, 1992.
- NEIL. A Tolerance and Dependence In BENEDETTI, C. *et al.* (eds). Advances in pain research and therapy. *Raven Press, New York*. Vol 14, 121-142, 1990.
- NEVO, I. e HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem Int*, 26(4): 305-336, 1995.
- NISTRÌ, A. e CONSTANTÌ, A. Pharmacological characterization of different types of GABA and Glutamate receptors in vertebrates and invertebrates. *Prog Neuro Biol*, 13, 117, 1979.
- PARK-CHUNG, M. WU, F.S., PURDY, R.H., MALAYEV, A.A., GIBBS, T.T., FARB, D.H. Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol*, 52(6): 1113-1123, 1997.
- PAUL, S.M. e PURDY, R.H. Neuroactive steroids. *FASEB J*, 6: 2311-2322, 1992.

- POTTS, G.; CREANGE, J.E.; HARDING, H.R.; SCHANE H.P. Trilostane, an orally active inhibitor of steroid biosynthesis. *Steroids*, 32: 257-267, 1978.
- RABE, C.S. e TABAKOFF, B. Glycine site-directed agonists reverse the actions of ethanol at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular Pharmacol*, 38: 753-757, 1990.
- RAYMOND, F.A. New methodologies for pharmacological treatment trials for alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*, 20 (7): 3A-9A, 1996.
- RECASENS, M. Putative molecular mechanisms underlying long term potentiation (LTP): the key role of excitatory amino acid receptors. *Thérapie*, 50: 19-34, 1995.
- ROBEL, P. e BAULIEU, E.E. Neurosteroids biosynthesis and function. *TEM*, 5: 1-8, 1994.
- ROBEL, P.; YOUNG, J.; CORPÈCHOT, C.; MAYO, W.; PERCHÈ, F.; HAUG, M.; SIMON, H.; BAULIEU, E.E. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: Functional correlates. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 53 (1-6): 355-360, 1995.
- ROBERTS, E.; BOGOLA, L.; FLOOD, J.F.; SMITH, G.E. Effects of dehydroepiandrosterone and its sulfate on brain tissue in culture and on memory in mice. *Brain Res*, 406: 357-362, 1987.
- ROGERS, C.J.; TWYMAN, R.E.; MACDONALD, R.L. Benzodiazepine and β -carbonile regulation, of single neurones in culture. *J Physiol*, 475: 69-82, 1994.
- SALMELA, K.S.; KAIHOVAARA, P.; SALASPURO, M.; ROINE, R.P. Role of catalase in rat gastric mucosal ethanol metabolism in vitro. *Alcohol Clin Exp Res*, 20 (6): 1011-1015, 1996.
- SAMSON, H.H. e HARRIS, R.A. Neurobiology of alcohol abuse. *Tips*, 13: 206-211, 1992.
- SANNA, E.; SERRA, M.; COSSU, A.; COLOMBO, G.; FOLLESA, P.; CUCCHEDDU, T.; CONCAS, A.; BIGGIO, G. Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA_A and NMDA receptor function in the rat brain. *Alcohol Clin Exp Res*, 17: 115-123, 1993.
- SARTER, M.; McGAUGHTY, J.; HOLLEY, L.A.; DUDCHENKO, P. Behavioral facilitation and cognition enhancement. In: Benzodiazepine Receptor Inverse Agonists. SARTER, M.; NUTT, D. J. and LISTER, R. G. (eds). *Wiley-Liss*, 213-242, 1995.

- SCHULTEIS, G.; HYYTIA, P.; HEINRICHS, S.C.; KOOB, G.F. Effects of chronic ethanol administration on oral self-administration of ethanol or saccharin by wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 20: 164-171, 1996.
- SCHUMACHER, M. e McEWEN, B.S. Steroid and barbiturate modulation of the GABA-A receptor. *Mol Neurobiol*, 3: 275-280, 1989.
- SHCUMMERS, J.; BENTZ, S.; BROWNING, M.D. Ethanol's Inhibition of LTP May Not Be Mediated Solely via Direct Effects on the NMDA Receptor. *Alcohol Clin Exp Res*, 21(3): 404-408, 1997.
- SEABROOK, G.R.; EASTER, A.; DAWSON, G.R.; BOWERY, B.J. Modulation of Long-term Potentiation in CA1 Region of Mouse Hippocampal Brain Slices by GABAA Receptor Benzodiazepine Site Ligands. *Neuropharmacology*, 36(6): 823-830, 1998.
- SHEFINER, S.A. e TABAKOFF, B. Basal firing rate of rat locus coeruleus neurons affects sensitivity to ethanol. *Alcohol*, 2: 239-243, 1985.
- SHINGAI, R.; SUTHERLAND, M.L.; BARNAD, E.A. Effects of subunit types of the cloned GABA-A receptor on the response to a neurosteroid. *Eur J Pharmacol*, 206: 77-80, 1991.
- SIEGEL, S. Classical conditioning, drug tolerance, and drug dependence. In: SMART, R. J., GLASER, F. B., ISRAEL, Y., KALANT, H. POPHAM, R. E. SCHMIDT W (eds) Research advances in alcohol and drugs problems. *Plenum Press, New York*. Vol 7, 207-246, 1983.
- SIEGHART, W. GABA_A receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trends Pharmacol Sci*, 13: 446-450, 1992.
- STUDY, R.E. e BARKER, J.L. Diazepam and (-)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of γ -aminobutyric acid responses in cultured neurones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 7180-7184, 1981.
- SZABÓ, G.; TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. The NMDA receptor antagonist, Dizolciline, differentially affects environment-dependent and environment-independent ethanol tolerance. *Psychopharmacology*, 113: 511-517, 1994.
- TABAKOFF, B. Alcohol and Tolerance: in *Alcohol Alert, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 28: 1-4, 1995.
- TABAKOFF, B.; CORNELL, N.; HOFFMAN, P.L. Alcohol tolerance. *Ann Emerg Med*, 15: 1005-1012, 1986.

- TABAKOFF, B. e HOFFMAN, P.L. Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci*, 32, 197-204, 1983.
- TABAKOFF, B. e HOFFMAN, P.L. Mechanisms of alcohol tolerance. *Alcohol Alc*, 24: 251-252, 1989.
- TABAKOFF, B. e HOFFMAN, P.L. Neurochemical effects of alcohol. In FRANCES, R. J.; MILLER, S. I. (eds), *Clinical Textbook of Addictive Disorders*. Guilford Press, New York. 501-525, 1991.
- TABAKOFF, B. e HOFFMAN, P.L. Alcohol Addiction: Na enigma among us neuron, 16: 909-912, 1996.
- TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L.; MOSES, F. Neurochemical correlates of ethanol withdrawal: alterations in serotonergic function. *J Pharm Pharmacol*, 29: 471-476, 1977.
- THOMSON, A.M. Glicine modulation of the NMDA receptor/channel complex. *TINS*, 12: 349-353, 1989.
- TICKU, M.K. Ethanol and the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Experientia*, 45: 413-418, 1989.
- TICKU, M.K. e KULKARNI, S.K. Molecular interactions of ETOH with GABAergic system and potential of Ro15-4513 as na ETOH antagonist. *Pharmacol Biochem Behav*, 30: 501-510, 1988.
- VALERA, S.; BALLIVET, M.; BERTRAND, D. Progesterone modulates a neuronal nicotinic a cetylcholine receptor. *Proc natl Acad Sci USA*, 89: 9949-9953, 1992.
- VANDERGRIF, J.L.; MATHEWS, D.B.; BEST, P.J.; SIMSON, P.E. Effects of ethanol and diazepam on spatial and non-spatial tasks in rats on na 8-arm maze. *Alcohol Clin Exp Res*, 19: 64, 1995.
- VOGEL-SPROTT, M.D. Acute recovery and tolerance to low doses of alcohol: Differences in cognitive and motor skill performance. *Psychopharmacology*, 61(3): 287-291, 1979.
- VOURC'H, C.; EYCHENNE, B.; JO, D.H. Δ^5 - 3β -Hydroxysteroid acyl transferase activity in the rat brain. *Steroids*, 57: 210-215, 1992.
- WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *TIPS*, 11: 25-33, 1990.

- WHITE, A.M.; SIMSON, P.E.; BEST, P.J. Comparison between the effects of ethanol and diazepam on spatial working memory in the rat. *Psychopharmacology*, 133: 256-261, 1997.
- WIGSTRÖM, H. e GUSTAFSSON, B. Facilitation of hippocampal long-lasting potentiation by GABA antagonists. *Acta Physiol Scand*, 125: 159-172, 1985.
- WILLIAMS, K.; DICHTER, M.A.; MOLINOFF, P.B. Up-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors on cultured cortical neurons after exposure to antagonists. *Mol Pharmacol*, 42: 147-151, 1992.
- WU, F.S.; GIBBS, T.T.; FARB, D.H. Inverse modulation of γ -aminobutyric acid and glycine-induced currents by progesterone. *Molec Pharmacol*, 37: 597-602, 1990.
- WU, F.S.; GIBBS, T.T.; FARB, D.H. Pregnenolone sulfate: A positive allosteric modulator at the N-methyl-d-aspartate receptor. *Molec Pharmacol*, 40: 333-336, 1991.
- WU, F.S.; MIHIC, S.J.; LIU, J.F.; LÊ, A.D.; KALANT, H. Blockade of chronic tolerance to ethanol by the NMDA antagonist, (+)-MK-801. *European J Pharmacol*, 231: 157-164, 1993.
- YAGHOUBI, N., MALAYEV, A., RUSSEK, S.J., GIBBS, T.T., FARB, D.H. Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. *Brain Res*, 24(1-2): 153-160, 1998.
- YANG, X.; CRISWELL, E.; SIMSON, P.; MOY, S.; BREESE, G. Evidence for a selective effect of ethanol on N-methyl-D-aspartate response: ethanol affects a subtype of the ifenprodil-sensitive N-metil-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 278: 114-124, 1996.
- ZALESKI, M.J.B. Estudo do papel do receptor GABA-B na aquisição da tolerância rápida ao etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. Tese Mestrado em Farmacologia – Centro de Ciências Biológicas, Universidade de Santa Catarina, 1998.
- ZAMAN, S.H.; SHINGAI, R.; HARVERY, R.J.; DARLISON, M.G. and BARNARD, E. A. Effects of subunit types of the recombinant GABA-A receptor on the response to a neurosteroid. *Eur J Pharmac Molec Pharmac Sect.*, 225: 321-330, 1992.