

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ELISABETH WAZLAWIK

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR NMDA E DO ÓXIDO
NÍTRICO NA TOLERÂNCIA À INCOORDENAÇÃO
MOTORA E À HIPOTERMIA INDUZIDAS POR ETANOL**

Florianópolis, 2003

ELISABETH WAZLAWIK

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR NMDA E DO ÓXIDO
NÍTRICO NA TOLERÂNCIA À INCOORDENAÇÃO
MOTORA E À HIPOTERMIA INDUZIDAS POR ETANOL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa Dra Gina Struffaldi Morato

Florianópolis, 2003

WAZLAWIK, Elisabeth. Participação do receptor NMDA e do óxido nítrico na tolerância à incoordenação motora e à hipotermia induzidas por etanol. Florianópolis, 2003. 249p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Gina Struffaldi Morato.

Defesa: 14/02/2003.

A [tolerância] ao [etanol] pode prognosticar a susceptibilidade ao alcoolismo, relacionando o consumo e a dependência, e servir de modelo para processos neuroadaptativos. Nos testes do plano inclinado e da temperatura em ratos, a administração por via intracerebroventricular de fármacos que interferem com o receptor [NMDA] e com o [óxido nítrico] (NO) reproduziu os efeitos obtidos com a administração sistêmica dos mesmos. A inibição e estimulação das vias nitrérgicas indicaram que estas vias opõem-se à tolerância, interferindo com a coordenação motora, sendo importantes na dependência ao etanol. O inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), 7-NI, não interferiu na alcoolemia dos animais no tratamento agudo e crônico, apontando mecanismos farmacodinâmicos na incoordenação motora ao etanol. A exposição crônica ao etanol confirma que a tolerância rápida possa predizer a crônica, havendo bloqueio na presença de 7-NI. O imunoconteúdo das isoformas de NOS obtido de hipocampo e cerebelo não reflete a atividade de NOS e os níveis de NO após o tratamento crônico com etanol e/ou 7-NI.

[tolerância] [etanol] [NMDA] [óxido nítrico]

Se você aceitar suas possibilidades no presente, com certeza vai melhorar no futuro.

Mas, se negar suas limitações, jamais se verá livre delas.

Paulo Coelho

Com amor e carinho...
Aos meus pais, Walter e Ignez, pelo
incentivo e constante apoio.
E para Alexandre, Márcia, Fernando, Felipe
e Vinícius.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Metabolização do etanol.....	21
1.2 Mecanismos de ação do etanol.....	25
1.2.1 Receptor NMDA.....	30
1.2.2 Óxido nítrico.....	33
1.3 O fenômeno da tolerância.....	37
1.3.1 Tolerância farmacocinética.....	38
1.3.2 Tolerância farmacodinâmica.....	39
1.3.3 Classificação da tolerância sob o ponto de vista temporal.....	39
1.3.4 A tolerância influenciada pelo comportamento e pelo aprendizado.....	41
1.3.5 Tolerância ao etanol, receptor NMDA e óxido nítrico.....	42
2 HIPÓTESES.....	46
3 OBJETIVOS.....	47
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Animais.....	49
4.2 Drogas e reagentes.....	49
4.3 Estereoxia.....	50
4.3.1 Cirurgia e métodos de microinjeção.....	50
4.3.2 Cânulas e microinjeções.....	52
4.3.3 Confirmação da posição das cânulas i.c.v.	52
4.4 Procedimento experimental para avaliação do comportamento.....	54

4.4.1 Avaliação da coordenação motora no plano inclinado.....	54
4.4.2 Avaliação da temperatura corporal.....	56
4.5 Tratamento crônico com etanol.....	57
4.5.1 <i>Western blot</i>	57
4.5.1.1 Preparação das amostras para eletroforese.....	58
4.5.1.2 Separação de proteínas.....	58
4.5.1.3 Eletrotransferência e imunodeteção.....	59
4.5.1.4 Dosagem de proteínas.....	60
4.6 Dosagem alcoólica.....	61
4.6.1 Coleta de sangue.....	61
4.6.2 Preparo das amostras.....	62
4.7 Análise estatística.....	62
5 PROCEDIMENTOS E RESULTADOS.....	64
Experimento 1: Indução da tolerância rápida ao etanol com o emprego de doses únicas e de uma dose com reforço no teste do plano inclinado.....	65
Experimento 2: Efeito de D-cicloserina no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.....	69
Experimento 3: Efeito de ⁽⁺⁾ MK-801 sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliado no plano inclinado.....	75
Experimento 4: Interferência de ⁽⁺⁾ MK-801 no efeito de DCS na facilitação da tolerância rápida ao etanol, avaliado no plano inclinado.....	79
Experimento 5: Influência da administração de ácido 7-cloro quinurênico na facilitação da tolerância rápida ao etanol induzida por D-cicloserina, no modelo do plano inclinado.....	82

Experimento 6: Efeito de 7-nitroindazol administrado por via i.p. sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no plano inclinado.....	84
Experimento 7: Efeito da administração prévia, por via i.p., de L-arginina ou D-arginina sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo 7-NI, no plano inclinado.....	86
Experimento 8: Efeito da administração por via i.c.v. de L-Arg, D-Arg e 7-NI na tolerância rápida ao etanol, avaliado no plano inclinado.....	89
Experimento 9: Efeito de SNAP sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no plano inclinado.....	92
Experimento 10: Efeito do nitruprussiato de sódio sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no plano inclinado.....	94
Experimento 11: Efeito de inibidores da guanilato ciclase solúvel sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliado no plano inclinado.....	98
Experimento 12: Efeito de 8-Bromo-GMPc sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliado no plano inclinado.....	102
Experimento 13: Indução da tolerância rápida ao etanol com a utilização de doses únicas no teste da temperatura corporal.....	105
Experimento 14: Efeito de DCS sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.....	109
Experimento 15: Efeito do ⁽⁺⁾ MK-801 sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.....	111
Experimento 16: Efeito de 7-NI sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.....	113
Experimento 17: Efeito da administração de etanol e de 7-NI sobre a indução da tolerância crônica, no modelo do plano inclinado.....	115

Experimento 18: Imunodeteccção das isoformas de óxido nítrico sintase neuronal, induzida e endotelial, após o tratamento crónico com etanol e com 7-NI.....	118
Experimento 19: Dosagem alcoólica.....	126
6 DISCUSSÃO.....	128
7 CONCLUSÕES.....	149
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151
9 ANEXOS.....	182

LISTA DE ABREVIATURAS

5HT	5-hidroxi-triptamina (serotonina)
7-Cl	Ácido 7 cloro quinurênico
7-NI	7-nitroindazol
8-Br-GMPc	3',5'-monofosfato sódico de 8-bromoguanosina cíclico
ADH	Enzima álcool desidrogenase
ALDH	Enzima aldeído desidrogenase
AMPA	α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propionato
AMPC	Monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAM	Calmodulina
CAM-K	Proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina
CO	Monóxido de carbono
D ₁	Receptor dopaminérgico D ₁
D ₂	Receptor dopaminérgico D ₂
D-Arg	D-arginina
DCS	D-cicloserina
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPM	Erro padrão da média
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
GCs	Guanilato ciclase solúvel

GIRK	<i>G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channel</i>
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
L-Arg	L-arginina
L-NA	L-nitroarginina
L-NAME	L-nitroarginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo de <u>Escherichia coli</u>
LTP	Potenciação de longa duração
LY83583	6(Fenilamino)-5,8-quinolinediona
MEOS	Sistema microssômico de oxidação do etanol
Mg ²⁺	Íon magnésio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
MK-801	Dizocilpina
Na ⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzida
nNOS	Sintase do óxido nítrico neuronal
NPS	Nitroprussiato de sódio
NS2028	4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo(3,4-d)benz(b)(1,4)oxazin-1-ona

ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-alfa]quinoxalin-1-ona
PKA	Proteína quinase A dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PSD-95	Proteína de densidade pós-sináptica 95
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNC	Sistema nervoso central
Zn ²⁺	Íon zinco

LISTA DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS

Figura 1: Representação esquemática da ativação da nNOS no SNC.....	35
Esquema I: Hipóteses.....	46
Figura 2: Secção frontal de cérebro de rato do Atlas de Paxinos e Watson (1997), na coordenada (ântero-posterior) -0,8 a partir do bregma. A seta indica o local de injeção dos fármacos nos ventrículos laterais.....	53
Esquema II: Exemplificação de procedimento experimental da maioria dos ensaios comportamentais relacionados à tolerância rápida ao etanol.....	54
Figura 3: Plano inclinado para avaliar a coordenação motora.....	56
Figura 4: Imunodeteção através de quimioluminescência de um polipeptídeo, usando anticorpo específico.....	60
Tabela I: Fármacos utilizados nos testes com as respectivas doses de etanol.....	63
Figura 5: Desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, nas doses de 2,3 g/Kg; 2,5 g/Kg; 2,7 g/Kg; 2,7 g/Kg + reforço e 3,0 g/Kg, no teste do plano inclinado.....	67
Figura 6: Efeito de diferentes doses de etanol sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida no dia 2, em ratos submetidos ao teste do plano inclinado.....	68
Figura 7: Efeito da dose única de 2,7 g/Kg de etanol nos dias 1 e 2 em todos os tempos nos quais os ratos foram avaliados no plano inclinado.....	68
Figura 8: Efeito de D-cicloserina nas doses de 10 nmol e 20 nmol, e etanol na dose de 2,3 g/Kg, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	72

Figura 9: Efeito de D-cicloserina nas doses de 10 nmol e 20 nmol, e etanol na dose de 2,5 g/Kg, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	73
Figura 10: Efeito de D-cicloserina nas doses de 10 nmol; 20 nmol, e 40 nmol, e etanol na dose de 2,7 g/Kg, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	74
Figura 11: Efeito de ⁽⁺⁾ MK-801 nas doses de 1 nmol; 2 nmol, e 4 nmol, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	77
Figura 12: Efeito da administração de 1 e 3 injeções de ⁽⁻⁾ MK-801 na dose de 4 nmol; no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	78
Figura 13: Efeito da interação de ⁽⁺⁾ MK-801 nas doses de 1 nmol ou 4 nmol, com 20 nmol de D-cicloserina, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	81
Figura 14: Efeito do ácido 7-cloro quinurênico na dose de 40 nmol e de D-cicloserina, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	83
Figura 15: Efeito da administração por via i.p. de 7-Nitroindazol nas doses de 3, 6, 9 e 12 mg/Kg, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	85
Figura 16: Efeito da administração por via i.p. de 200 mg/Kg de: L-arginina ou D-arginina, sobre o bloqueio de 12 mg/Kg de 7-NI, via i.p., no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	88
Figura 17: Efeito da administração por via i.c.v.. de 600 nmol de: L-arginina ou D-arginina, e de 40 nmol de 7-NI, sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	91

Figura 18: Efeito de SNAP nas doses de 40 nmol e 80 nmol, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	93
Figura 19: Efeito de nitroprussiato de sódio nas doses de 40 nmol e 80 nmol, e etanol na dose 2,7 g/Kg, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	96
Figura 20: Efeito de nitroprussiato de sódio nas doses de 40 nmol e 80 nmol, e etanol na dose de 2,3 g/Kg, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	97
Figura 21: Efeito de 30 nmol de azul de metilano e de 10 nmol de LY83583, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	100
Figura 22: Efeito de 10 nmol de NS2028 e de 1 nmol de ODQ, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	101
Figura 23: Efeito de 8-Br-GMPc nas dose de 40 nmol e 80 nmol, no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste do plano inclinado.....	104
Figura 24: Desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol nas doses de 2,3 e 2,5 g/Kg administradas no dia 2, em ratos no teste da temperatura.....	107
Figura 25: Efeito das doses de 2,3 e 2,5 g/Kg de etanol sobre a hipotermia e o desenvolvimento da tolerância rápida no dia 2, em ratos submetidos à avaliação da temperatura corporal.....	108
Figura 26: Efeito das doses de etanol: 4 g/Kg no dia 1 e 2,3 g/Kg no dia 2, em todos os tempos nos quais foi avaliada a temperatura nos ratos.....	108
Figura 27: Efeito de D-cicloserina nas doses de 20 e 40 nmol no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no teste da temperatura.....	110
Figura 28: Efeito de ⁽⁺⁾ MK-801 na dose de 2 nmol na tolerância rápida ao etanol, no teste da temperatura.....	112

Figura 29: Efeito de 7-Nitroindazol nas doses de 40 e 80 nmol na tolerância rápida ao etanol, no teste da temperatura.....	114
Figura 30: Efeito do tratamento crônico (i.p.) com etanol e 7-NI no desenvolvimento da tolerância crônica ao plano inclinado.....	117
Figura 31: Imunoquantificação de NO na nNOS de homogenatos de hipocampo de ratos tratados cronicamente com etanol, na ausência e presença de 7-NI.....	120
Figura 32: Imunoquantificação de NO na iNOS de homogenatos de hipocampo de ratos tratados cronicamente com etanol, na ausência e presença de 7-NI.....	121
Figura 33: Imunoquantificação de NO na eNOS de homogenatos de hipocampo de ratos tratados cronicamente com etanol, na ausência e presença de 7-NI.....	122
Figura 34: Imunoquantificação de NO na nNOS de homogenatos de cerebelo de ratos tratados cronicamente com etanol, na ausência e presença de 7-NI.....	123
Figura 35: Imunoquantificação de NO na iNOS de homogenatos de cerebelo de ratos tratados cronicamente com etanol, na ausência e presença de 7-NI.....	124
Figura 36: Imunoquantificação de NO na eNOS de homogenatos de cerebelo de ratos tratados cronicamente com etanol, na ausência e presença de 7-NI.....	125
Tabela II: Alcoolemia de ratos submetidos ao tratamento com veículo ou 7-NI e etanol.....	127
Tabela III: Alcoolemia de ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 15 dias, na ausência e presença de veículo ou 7-NI, e salina ou etanol.....	127
Esquema III: Provável mecanismo de ação envolvendo a interação NMDA e as vias do NO.....	148

RESUMO

A síndrome de dependência ao álcool ou alcoolismo repercute na qualidade de vida dos indivíduos e pode causar sérios danos em nível orgânico, psicológico e social. A tolerância refere-se a uma redução na intensidade do efeito de drogas, com o seu uso repetido. Para obter o mesmo efeito inicial, uma pessoa tolerante necessita ingerir quantidades crescentes de etanol, mantendo ou agravando a dependência. Ademais, os estudos referentes à tolerância podem prognosticar a susceptibilidade ao alcoolismo, relacionando o consumo e a dependência à droga, além de servir de modelo para outros processos neuroadaptativos.

O receptor NMDA, que é extremamente sensível ao etanol, em receptores pós-sinápticos, estimula a formação de óxido nítrico (NO), que, por sua vez, promove a liberação de glutamato em terminais pré-sinápticos. Esse fenômeno, além de envolver processos de memória e aprendizagem, está relacionado com a tolerância e dependência às drogas. Na literatura, foi relatado o envolvimento do receptor NMDA e do NO com os mecanismos de tolerância rápida ao etanol. Inicialmente, no presente trabalho, foram desenvolvidos estudos semelhantes, avaliando ratos em testes de coordenação motora e hipotermia. No entanto, os fármacos, com exceção do etanol, foram administrados por via intracerebroventricular (i.c.v.) para averiguar se aqueles efeitos estariam ocorrendo no sistema nervoso central.

No presente estudo, a administração via i.c.v. de agonista e antagonistas do receptor NMDA, de um inibidor preferencial da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e de um gerador de NO, reforçou a hipótese do envolvimento do NMDA e do NO na tolerância rápida ao etanol. Por isso, foi analisado o efeito de substâncias que interferem na via do GMPc, tais como inibidores da guanilato ciclase solúvel e análogo de GMPc, no modelo do plano inclinado. Os resultados obtidos mostraram a interferência da via GMPc-NO na tolerância ao etanol, avaliada no teste de incoordenação motora.

Posteriormente, foram desenvolvidos experimentos testando os efeitos da administração crônica de etanol e do inibidor preferencial de nNOS no teste do plano inclinado. Além disso, foi medida a alcoolemia e avaliado o imunocontéudo das 3 isoformas de NOS no hipocampo e cerebelo desses ratos. Os resultados reforçam a sugestão de que a tolerância rápida possa prever características da tolerância crônica. A dosagem alcoólica no sangue mostrou que a ação do inibidor de NOS foi farmacodinâmica, já que não alterou a alcoolemia. Nesses mesmos animais, foi avaliado o imunocontéudo das isoformas de NOS, dos hipocampos e cerebelos, através da técnica de *Western blotting*. De acordo com os resultados obtidos, o imunocontéudo das isoformas de NOS não foi modificado paralelamente às alterações comportamentais dos animais. Isto ressalta que a avaliação do imunocontéudo dessas enzimas pode não refletir certos efeitos da exposição prolongada ao etanol na presença, ou não, de um inibidor preferencial da nNOS.

ABSTRACT

Alcohol dependence syndrome or alcoholism is characterized by the loss of control over the amount of ethanol intake, which reflects on the quality of life of the subjects and also can cause serious organic, psychological, and social damage. Tolerance refers to a reduction in the effects of drugs with their repeated use. To obtain the same initial effect, a tolerant person needs increasing ethanol doses, maintaining or aggravating the dependence. Studies on tolerance can predict susceptibility to alcoholism and relate consumption to the dependence upon this drug, as well as serving as a model for other neurological adaptation processes.

The NMDA receptor is extremely sensitive to the effects of ethanol, and in postsynaptic receptor it stimulates the formation of nitric oxide (NO), which in turn promotes the release of glutamate in presynaptic terminals. This phenomenon, apart from involving memory and learning processes, is also related to drug tolerance and dependence. Evidence from the literature suggests the involvement of the NMDA receptor and NO with mechanisms related to tolerance to ethanol. Initially in this work, similar studies evaluating the motor incoordination and hypothermia on rats were developed. However, the drugs, with the exception of ethanol, were administered by intracerebroventricular (i.c.v) route to confirm whether the effects occurred in the central nervous system.

In the present study, the i.c.v. administration of an agonist and certain antagonists of the NMDA receptor, a preferential inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and a NO generator, gave support to the hypothesis of the involvement of NMDA and NO in the rapid tolerance to ethanol. For this reason, the effects of substances which interfere with the cGMP pathway were analysed, such as soluble guanylate cyclase inhibitors and cGMP analogue in the tilt plane test. The results suggested interference in the cGMP-NO pathway in the tolerance to ethanol, which was evaluated by the motor incoordination test.

Subsequently, in the tilt plane test on rats, experiments testing the effects of chronic ethanol administration and the preferential nNOS inhibitor were developed. In addition, evaluations were made on the effect of a chronic dosage of ethanol and of the 3 isoforms of NOS expression. The results reinforced previous statements that rapid tolerance can predict the characteristics of chronic tolerance. The level of ethanol in the blood suggested that the NOS inhibitor's action was pharmacodynamic, since no alterations in the plasmatic ethanol levels were observed. In the same animals, NOS expression in hippocampus and cerebellum, evaluated by Western blotting technique, was not altered in parallel to the behavioural changes. This suggests that the NOS expression of these enzymes is unable to reflect the effects of long-term exposure to ethanol regardless of the presence or absence of a preferential nNOS inhibitor.

1 INTRODUÇÃO

Desde a antigüidade, as drogas psicoativas - em especial as bebidas alcoólicas - são utilizadas por diferentes culturas com propósitos diversos. No entanto, tem sido observado que alguns fatores de risco tornam certos indivíduos mais vulneráveis a ingerir bebidas alcoólicas em quantidades excessivas (FORMIGONI e MONTEIRO, 1997).

A síndrome de dependência ao álcool, alcoolismo ou etilismo, é uma doença primária crônica, originada pelo consumo excessivo do álcool etílico ou etanol, sendo o seu desenvolvimento e manifestações influenciados por fatores genéticos, psicossociais e ambientais (MORSE e FLAVIN, 1992). Tem sido preconizado que o tipo de personalidade e o temperamento de alcoolistas estariam associados com fatores genéticos e ambientais, idade, estresse e condições psiquiátricas coexistentes. Desta forma, um indivíduo poderia tornar-se dependente de drogas devido a um fator, ou mais provavelmente pela interação de vários fatores de risco (ALTMAN et al., 1996; FINN et al., 2000). É pressuposto que os alcoolistas, em função dos efeitos reforçadores da droga, possam sentir-se motivados ao consumo continuado e exagerado do etanol (VERBANCK, 1995).

O 1^o Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil – 2001 – (CEBRID, 2001) permitiu traçar o perfil do consumo de várias drogas em nosso país. O objetivo principal desta pesquisa domiciliar de caráter nacional sobre o consumo de drogas foi estimar, pela primeira vez no país, a prevalência do uso ilícito de drogas, de álcool, de tabaco e o uso não médico de medicamentos psicotrópicos, além de esteróides anabolizantes. O universo estudado correspondeu à população brasileira residente nas cidades com mais de 200.000 habitantes, segundo os dados do IBGE de 1995 (disponíveis no momento da elaboração da amostragem). O estado do Tocantins foi o único a não apresentar município com mais de duzentos mil habitantes, e não foi incluído no estudo. A amostragem abrangeu

41,3% da população total do Brasil, ou seja, o equivalente a 47.045.907 habitantes, conforme o Censo Demográfico de 2000. A faixa etária dos indivíduos pesquisados compreendeu a idade de 12 a 65 anos, sendo, destes, 43% homens e 57% mulheres. De acordo com a faixa etária, os percentuais da amostra foram: 12%, de 12 a 17 anos; 18%, de 25 a 34; 21%, de 18 a 24; e 49%, com idade igual ou superior aos 35 anos.

O uso, na vida, de bebidas alcoólicas, nas 107 maiores cidades do país, foi de 68,7%, percentagem próxima à do Chile (70,8%) e dos Estados Unidos (81,0%). O menor uso, na vida, de bebidas alcoólicas ocorreu na região Norte (53,0%) e o maior, na região Sudeste (71,5%). A estimativa de dependentes de etanol no Brasil foi de 11,2%, sendo que, no Nordeste e Norte, as porcentagens atingiram cerca de 16%. Em todas as regiões, observaram-se mais dependentes de bebidas alcoólicas para o sexo masculino, numa proporção de três para um.

Dentre os sinais e sintomas relacionados ao diagnóstico de dependência de bebidas alcoólicas, os mais referidos foram o desejo de diminuir ou de parar o uso (14,5%) e a perda de controle em beber (9,4%). A relação entre uso de etanol, na vida, e dependência mostrou que de cada seis pessoas que fizeram uso, na vida, de bebidas alcoólicas, uma delas tornou-se dependente. A proporção para o sexo feminino dobrou nessa relação, sendo de doze por um. Para avaliar a tolerância, foi indagado aos indivíduos se os mesmos necessitavam de maiores quantidades de etanol para sentirem os mesmos efeitos anteriores. Entre os 12 e 17 anos de idade, já foi constatado o fenômeno da tolerância (em redor de 1%), que aumentou com a idade dos indivíduos (18 a 24 anos: 6,1%; 25 a 34: 6,3%; com a idade igual ou superior aos 35 anos: 7,1%). Além disso, em média, 7,1% dos entrevistados referiram que tiveram algum problema pessoal pelo uso de bebidas alcoólicas (tais como: com familiares, com amigos, no trabalho, com a polícia, ou algum problema emocional ou psicológico) (CEBRID, 2001).

O uso de drogas, além de contribuir para o hábito, pode agir como reforço positivo ou negativo. Uma droga pode agir como reforço positivo quando acrescenta algo desejável, como a sensação de euforia, e como reforço negativo quando elimina algo desagradável como, por exemplo, quando reduz a ansiedade (ROBERTS e KOOB, 1997). Isso pode contribuir, em parte, no fato de que, apesar dos efeitos deletérios do alcoolismo para o organismo, os indivíduos apresentam muita dificuldade em abandonar o vício. Assim, uma pessoa pode se sentir motivada a beber tanto em razão dos efeitos prazerosos percebidos (reforço positivo), como também para não sentir as sensações desagradáveis da síndrome de abstinência ao álcool (reforço negativo) (MERIKANGAS, 1990; ALTMAN et al., 1996).

De acordo com Schuckit (1987), a susceptibilidade aos efeitos do etanol está relacionada com a resistência aos efeitos das bebidas, interferindo com o seu consumo e tolerância, uma vez que uma menor sensibilidade aos efeitos aversivos do etanol aumenta a possibilidade de os indivíduos se tornarem alcoolistas. Para obter o mesmo efeito inicial, uma pessoa tolerante necessita ingerir quantidades crescentes de etanol, conseqüentemente, mantendo ou agravando a dependência (CAPPELL e LEBLANC, 1979; ERWIN et al., 1980; CÍCERO, 1980; HOLLOWAY et al., 1988; LÊ e KIIANMAA, 1988; VOGEL-SPROTT e SDAO-JARVIE, 1989). Desta maneira, segundo Kalant (1996), a ingestão exacerbada pode aumentar o dano induzido pelo etanol ao fígado, coração, pâncreas e outros órgãos nas pessoas das quais o “sistema nervoso tornou-se tolerante”.

Várias pesquisas que acompanharam familiares e irmãos gêmeos com antecedentes de alcoolismo, e indivíduos criados por pais adotivos (SCHUCKIT, 1985 e 1986), demonstraram a interação entre os fatores biológicos e ambientais na manifestação da patologia (SCHUCKIT, 1987). A avaliação de filhos de alcoolistas, não dependentes, revelou que aproximadamente 40% apresentavam uma sensibilidade menor ao etanol (SCHUCKIT, 1993), o que, por sua vez, poderia contribuir para a tolerância e dependência à droga. Assim, após a

ingestão de bebidas alcoólicas, indivíduos predispostos a se tornarem dependentes podem sentir-se motivados ao uso continuado em decorrência dos efeitos reforçadores do etanol (VERBANCK, 1995). Destaca-se que, a partir de estudos desenvolvidos com animais, foi observado que as variações na sensibilidade e tolerância ao etanol têm relação com as diferenças genéticas (REED et al., 2001).

Valenzuela (1997) elucida de forma simplificada a homeostasia do cérebro, relacionando o tempo de exposição ao etanol com as funções cerebrais. É mencionado que, em condições normais, existe um equilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e a inibitória no cérebro. No consumo agudo ou de curta duração, o balanço homeostático tende à inibição, aumentando a função de neuromoduladores e neurotransmissores inibitórios (por exemplo, GABA – ácido γ -aminobutírico, glicina e adenosina) e diminuindo a ação dos neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato). No consumo crônico ou de longa duração, por mecanismos compensatórios, é possível que o cérebro possa restabelecer o equilíbrio contrabalançando os efeitos depressores do etanol, diminuindo a neurotransmissão inibitória e aumentando a excitatória. Este processo poderia contribuir para a tolerância aos efeitos do etanol. Na retirada do etanol, após o consumo crônico, não ocorrendo mais o efeito compensatório induzido pela droga, manifesta-se uma excitabilidade aumentada, caracterizada por crises epiléptiformes, delírios e ansiedade, peculiares na síndrome de abstinência ao álcool.

1.1 Metabolização do etanol

O etanol ou álcool é uma molécula orgânica composta de dois átomos de carbono, seis de hidrogênio e um de oxigênio, lipossolúvel e hidrossolúvel, que pode ser distribuída amplamente no organismo (TABAKOFF e HOFFMAN, 1999).

Após a ingestão de etanol, mais de 90% são metabolizados, sendo que a maior parte das reações bioquímicas ocorre no fígado, através de vias oxidativas. O remanescente é eliminado de forma inalterada, na respiração, suor e urina. Os níveis circulantes de etanol no sangue e no cérebro são determinados por fatores relacionados com a sua absorção no estômago e intestino delgado e com o seu metabolismo (LIEBER, 1985; BULLOCK, 1990).

Em decorrência de diferenças genéticas das enzimas que metabolizam o etanol, podem ocorrer variações metabólicas individuais (COUZIGOU et al., 1994; YIN, 1994; MURAMATSU et al., 1995; revisto por AGARWAL, 2001). Assim, o metabolismo do etanol pode interferir na resposta individual através de uma maior ou menor intoxicação e nos efeitos de recompensa, reforçadores ou aversivos. Além disso, interferem ainda outros fatores como os hormonais (MARDH et al., 1986), o sexo (MARSHALL et al., 1983) e o estado nutricional (LIEBER, 1991).

A maior parte do metabolismo do etanol ocorre no parênquima hepático, catalizado pela enzima álcool desidrogenase (ADH), sendo esta, até algum tempo atrás, considerada a única via significativa para a metabolização da droga (LIEBER, 1999). No fígado humano, têm sido descritas três classes de isoenzimas da ADH: I, II e III, conforme as diferenças estruturais e propriedades de metabolização dos substratos dessas proteínas (WAGNER et al., 1984). A ADH humana é uma enzima citosólica dimérica contendo zinco, constituída de seis subunidades denominadas: α , β_1 , β_2 , e β_3 , e γ_1 , e γ_2 . Essas subunidades são codificadas por genes distintos e seus respectivos alelos. Devido à existência de homodímeros e heterodímeros, são possíveis muitas combinações das isoenzimas, contribuindo para as diferenças no metabolismo do etanol entre os indivíduos (DEITRICH e PALMER, 1995).

O etanol, metabolizado pela ADH a acetaldeído, é oxidado a acetato pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH). Cada uma destas etapas produz uma molécula da forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) a partir da forma oxidada, NAD^+

(GELLERT e TESCHKE; 1988; DEITRICH e PALMER, 1995; revisto por AGARWAL, 2001). Por sua vez, o acetato é oxidado a dióxido de carbono e água. Uma quantidade reduzida de etanol é metabolizada no estômago pela ADH, antes da sua entrada na circulação portal (MORENO e PARES, 1991), havendo evidências de que essa transformação seja menor no sexo feminino (FREZZA et al., 1990).

Nos seres humanos, a ALDH é distribuída em enzimas de classe I (ALDH1, citosólica) e classe II (ALDH2, mitocondrial), sendo identificadas ainda outras formas (KITSON, 1996). Uma mutação no locus da ALDH2 torna essa forma de enzima inativa (YOSHIDA et al., 1984), resultando no acúmulo de acetaldeído em indivíduos com essa forma mutante de ALDH (HARADA et al., 1981).

A catalase demonstrou ser capaz de oxidar o etanol *in vitro*, na presença de um sistema gerador de peróxido de hidrogênio, no cérebro de rato (ARAGON et al., 1992). Apesar de não ser atribuída à catalase uma ação primordial em nível hepático, em condições fisiológicas, é possível que possa ser significativa em nível gástrico, na metabolização do etanol, conforme observado em ratos (SALMELA et al., 1996). Após o consumo crônico de etanol, podem ocorrer adaptações e a possibilidade da ativação de vias adicionais (LIEBER, 1999).

O etanol também pode ser metabolizado a acetaldeído pelo sistema microsômico de oxidação do etanol (MEOS), através do citocromo P450 (UMENO et al., 1988; BULLOCK, 1990). O sistema MEOS contém a enzima microsomal citocromo P450E1 (CYP2E1), que é encontrada principalmente no fígado, mas também pode estar presente em outros tecidos extra-hepáticos, incluindo o cérebro (LIEBER e DECARLI 1968 e 1970; ZIMATKIN e DEITRICH, 1997; LIEBER, 1999). Embora o CYP2E1 desempenhe atividade mais pronunciada em microsomos do fígado em humanos, existem evidências de que CYP1A2 e CYP3A4 também possam estar envolvidas na metabolização do etanol (ASAI et al., 1996; SALMELA et al., 1998 e 2001; LIEBER, 1999). Devido à exposição prolongada ao etanol,

pode ocorrer indução enzimática no MEOS, que pode ser relevante no alcoolismo crônico (LIEBER, 1985). Este processo, por sua vez, também pode contribuir para a tolerância aos efeitos do etanol.

Foi verificado, em homogenatos de cérebro, que os ratos que voluntariamente consomem altas doses de etanol, por características genéticas, apresentaram uma capacidade de oxidação do acetaldeído maior do que a linhagem de animais que consome baixas doses de etanol (QUINTANILLA e TAMPIER, 1995). Ademais, concentrações cerebrais elevadas de acetaldeído nos ratos que consomem baixos níveis de etanol causaram efeitos aversivos. Ao contrário, a linhagem que consome elevada quantidade de etanol manifestou maior tolerância ao acetaldeído e ao etanol (QUINTANILLA et al., 2002; TAMPIER e QUINTANILLA 2002a e b).

O polimorfismo genético das enzimas ADH e ALDH (CHEN et al., 1999) indicou diferenças entre dependentes e não dependentes da droga (MURAMATSU et al., 1995). Em relação à frequência de alelos no *locus* da ALDH, o gene *ALDH2*2* parece estar relacionado com o metabolismo diminuído de etanol (THOMASSON et al., 1993), podendo, desse modo, haver uma proteção para o abuso do etanol e alcoolismo (COUZIGOU et al., 1994).

Uma vez que existem diferenças genéticas entre os indivíduos, aqueles que apresentam dificuldades em metabolizar o etanol, e são mais sensíveis e menos tolerantes aos efeitos do etanol, podem estar menos vulneráveis à dependência da droga. Os alcoolistas mostram um maior clearance de etanol no sangue e desenvolvem tolerância metabólica (LINDROS et al., 1980; KALANT, 1996; LIEBER, 2000). O aumento da oxidação hepática de etanol eleva os níveis sanguíneos de acetaldeído e acetato (NUUTINEN et al., 1983; SUOKAS et al., 1984). Após o consumo crônico de etanol, há um aumento da atividade de MEOS e do CYP2E1. Essa indução está associada com a proliferação do sistema do retículo endoplasmático, em humanos e em experimentos com animais (LIEBER, 1999). Assim, o MEOS e CYP2E1, além

de envolvidos no metabolismo, estão relacionados com a tolerância ao etanol (LIEBER, 1990 e 1993).

1.2 Mecanismos de ação do etanol

Vários sistemas de neurotransmissores estão envolvidos com os efeitos do etanol. A administração de etanol afeta diversos sistemas de receptores, entre eles GABA_A, NMDA, serotonina (5TH), opióides, além de interferir com a produção de segundos mensageiros, transporte de adenosina e liberação de dopamina, óxido nítrico, entre outros. À exceção do que ocorre com outras drogas psicotrópicas, o etanol não produz seus efeitos ligando-se a receptores específicos, porém se liga a lipídeos e proteínas da membrana celular, que, por sua vez, interferem com vários mecanismos moleculares e bioquímicos (CHIN e GOLDSTEIN, 1977; KHANNA et al., 1993c; TABAKOFF et al., 1996; NUTT, 1999; UZBAY e OGLESBY, 2001).

A ingestão de etanol produz aumento dos níveis de dopamina no núcleo *accumbens*, área tegmental ventral, e em outras regiões relacionadas com o sistema de recompensa (GESSA et al., 1985; IMPERATO e DI CHIARA, 1986; CARBONI et al., 1989; WOZNIAK et al., 1990). Foi sugerido que os níveis diminuídos de dopamina poderiam motivar o consumo de etanol, por ser observado que, em animais dependentes, na abstinência, a auto-administração de etanol restaurou os níveis de dopamina ao normal, no núcleo *accumbens* (WEISS et al., 1996). Em outros estudos, entretanto, foi constatado que os antagonistas dopaminérgicos podem reduzir o consumo de etanol em ratos (SAMSON et al., 1993; PANOCKA et al., 1995a). A liberação de dopamina induzida pelo etanol, além disso, pode ser bloqueada por antagonistas serotoninérgicos e opióides (BLANDINA et al., 1989; ACQUAS

et al., 1993; BENJAMIN et al., 1993; CAMPBELL e MCBRIDE, 1995; ESTEBAN et al., 2002).

É considerado que a ativação de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ possa modular a liberação de outros neurotransmissores como a acetilcolina, glutamato e GABA. Foi postulado ainda que a ativação mediada por dopamina em receptores extra sinápticos D₁ aumenta a liberação de acetilcolina, glutamato e GABA, e a ativação de receptores extra sinápticos D₂ diminui a liberação destes neurotransmissores (revisto por DI CHIARA, 1997; WISE, 1998).

A serotonina tem sido associada à ingestão de etanol. A exposição aguda ao etanol elevou os níveis deste neurotransmissor no cérebro de animais experimentais, havendo ainda evidências de que alguns alcoolistas apresentem níveis diminuídos de serotonina envolvidos na neurotransmissão (LEMARQUAND et al., 1994a e b). Em animais *knockout*, para o receptor 5-HT_{1B}, houve uma menor intoxicação após a administração aguda de etanol (CRABBE et al., 1996). Por outro lado, a ingestão de etanol foi reduzida com a utilização de antagonistas de receptores: 5-HT₂ (PANOCKA et al., 1996) e 5-HT₄ (PANOCKA et al., 1995b), em ratos, e 5-HT₃ em pessoas não dependentes e dependentes (JOHNSON et al., 1993; SELLERS et al., 1994). A administração de antagonistas dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1C} e 5-HT₂ reduziu o comportamento ansioso, durante a abstinência, em ratos (LAL et al., 1993; RISINGER e BOYCE, 2002).

Os peptídeos opióides podem modular os efeitos do etanol, apresentando efeitos reforçadores e contribuindo para o seu consumo excessivo. Em experimentos com roedores, as *beta* endorfinas e as encefalinas atuaram como reforçadoras da ingestão de etanol. Nos seres humanos, entre outros fatores, a sensação de euforia e bem-estar tem sido relacionada com as *beta* endorfinas. E, em indivíduos com a história familiar de alcoolismo, o consumo de etanol causou aumento significativo nos níveis plasmáticos de *beta* endorfinas, em relação às

peessoas sem antecedentes da patologia (FROEHLICH, 1995 e 1997). Assim, a ingestão de etanol, ao aumentar os níveis plasmáticos de *beta* endorfinas, pode contribuir para o efeito reforçador positivo causado pela droga (DAVIS et al., 1987; revisto por FROEHLICH, 1997; revisto por ROBERTS e KOOB, 1997).

Tanto os antagonistas não seletivos quanto os seletivos, para os subtipos de receptores opióides *mu* e *delta*, demonstraram diminuir a auto-administração de etanol em roedores e macacos sob uma variedade de condições experimentais (ACQUAS et al., 1993; BENJAMIN et al., 1993; FROEHLICH e LI, 1994; revisto por FROEHLICH, 1997; ROMMELSPACHER et al., 2001), havendo ainda o envolvimento dos receptores *kappa* no consumo do etanol (SANDI et al., 1988). Além disso, os peptídeos opióides estão relacionados com a inibição da liberação de acetilcolina, dopamina e noradrenalina no SNC e periférico, podendo ainda modular a liberação de serotonina e GABA no cérebro (revisto por FROEHLICH, 1997).

Foi descoberto recentemente que o etanol, ao interagir com os canais de potássio GIRK, pode reduzir a atividade dos mesmos (LEWOHL et al., 1999; KOBAYASHI et al., 1999) e que os referidos canais podem interagir com vários receptores, entre eles os opióides, e produzir efeitos analgésicos (KOBAYASHI et al., 2002).

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do cérebro de mamíferos, sendo considerado que a atividade do receptor GABA_A está aumentada durante a exposição aguda ao etanol (CHIN e GOLDSTEIN, 1977; HARRIS et al., 1984; ALLAN e HARRIS, 1986 e 1987; HOFFMAN et al., 1989; AGUAYO, 1990; TABAKOFF e HOFFMAN, 1996). Os efeitos do etanol sobre o receptor GABA_A podem contribuir para as ações ansiolíticas, sedativas, para o prejuízo motor (SUZDAK et al., 1986; GIVENS e BREESE, 1990) e para déficit na aprendizagem e memória (WHITE et al., 1997).

Os receptores NMDA e GABA_A parecem ser mais sensíveis aos efeitos do etanol e estão envolvidos nos mecanismos de tolerância e dependência, ocorrendo adaptações com o

tempo de exposição (CHIN e GOLDSTEIN, 1977; HARRIS et al., 1984; HOFFMAN et al., 1989; TABAKOFF et al., 1986; VALENZUELA, 1997). Apesar dos referidos receptores serem mais estudados, o subtipo GABA_B também está relacionado com a tolerância rápida ao etanol (ZALESKI et al., 2001).

Na exposição aguda ao etanol, ocorre uma alteração na atividade inibitória do receptor GABA_A, aumentando o influxo de íons cloreto pelo canal do receptor, enquanto no receptor NMDA há uma diminuição no influxo de cálcio. Já no consumo crônico ou na dependência ao álcool, menos cloreto entra no neurônio, diminuindo, conseqüentemente, a atividade inibitória de GABA, enquanto a maior liberação de glutamato resulta no aumento do influxo de cálcio nos neurônios (HOFFMAN et al., 1989; TABAKOFF e HOFFMAN 1992; IORIO et al., 1992; HU et al., 1996; revisto por FINN e CRABE, 1997).

Os sistemas de segundos mensageiros e a adenosina parecem envolvidos nos efeitos de incoordenação motora decorrentes do etanol. A exposição aguda ao etanol altera a regulação da atividade da adenilato ciclase pela ação da proteína G inibitória (Gi). Já o tratamento crônico com etanol pode interferir no funcionamento da proteína G estimulatória (Gs). Estas alterações interferem na estimulação da adenilato ciclase e na produção de AMPc e são relacionadas com o desenvolvimento da tolerância ao etanol. Além disto, são propostos vários outros processos na regulação da atividade de segundos mensageiros, associados com o etanol (GORDON et al., 1986; MOCHLY-ROSEN et al., 1988; HOFFMAN e TABAKOFF, 1990; TABAKOFF e HOFFMAN, 1996; revisto por DOHRMAN et al., 1997).

As proteínas quinases são importantes alvos da ação do etanol no sistema nervoso, estando relacionadas com a modulação de vários receptores como o NMDA e GABA_A (ALLAN e HARRIS, 1987; GRANT e LOVINGER, 1995; COE et al., 1996; GERSTIN et al., 1998; MCMAHON et al., 2000; OLIVE e HODGE, 2000; NARITA et al., 2001). Tem sido destacado que proteínas quinases C (PKC) sejam capazes de fosforilar os receptores GABA_A

em sítios específicos, que, uma vez alterados, poderiam reduzir a susceptibilidade aos efeitos do etanol e, assim, produzir tolerância (BROWNING et al., 1990; revisto por MIHIC e HARRIS, 1997). De fato, o etanol causou menos efeitos comportamentais em camundongos mutantes deficientes em PKC *gamma* (HARRIS et al., 1995; WEINER et al., 1997).

Por outro lado, foi salientado que a inibição da PKC *epsilon* aumenta a sensibilidade de receptores GABA_A (HODGE et al., 1999). Os camundongos deficientes nesta quinase mostraram uma menor auto-administração de etanol, sendo que os níveis de dopamina no núcleo *accumbens*, avaliados por microdiálise *in vivo*, não variaram após a administração aguda nos referidos animais, ao contrário do que acontecia com os do tipo selvagem (OLIVE et al., 2000). Isto confirma o envolvimento da via mesolímbica com os efeitos reforçadores do etanol, havendo ainda a possibilidade de que fármacos com a propriedade de inibir a PKC *epsilon* possam ser úteis no tratamento da dependência ao etanol.

Ademais, o tratamento crônico com etanol aumentou as expressões das PKC *delta* e *epsilon*, as quais estão envolvidas na *upregulation* induzida pelo etanol em canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L e N, respectivamente. Foi verificado que este mecanismo pode contribuir para a excitabilidade neuronal, observada na síndrome de abstinência ao etanol (GERSTIN et al., 1998; MCMAHON et al., 2000).

Deve ser enfatizado que as amplas e diferenciadas ações do etanol com os diversos sistemas de neurotransmissores, canais iônicos e segundos mensageiros não se limitam ao exposto. No presente estudo, serão destacados os efeitos do etanol relacionados com o receptor NMDA e com o óxido nítrico.

1.2.1 Receptor NMDA

As ações do glutamato são mediadas através de duas classes de receptores de membrana: os metabotrópicos, ligados à proteína G, e os ionotrópicos, que operam através de íons permeáveis sódio, potássio e cálcio (COLLINGRIDGE e LESTER 1989; HOFFMAN et al., 1990). Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos são farmacologicamente subdivididos e classificados de acordo com seus agonistas específicos: existindo, pelo menos, três tipos: o N-metil-D-aspartato (NMDA), o cainato e o quisqualato ou AMPA (α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxanol propionato) (NAKANISHI, 1992; HOLLMANN e HEINEMANN, 1994; MCBAIN e MAYER, 1994). Dentre esses sistemas de receptores, a neurotransmissão glutamatérgica, mediada pelo receptor NMDA, tem merecido um destaque especial nos mecanismos de ação do etanol (GRANT, 1994).

Os receptores ionotrópicos apresentam diferenças específicas que lhes dão características funcionais peculiares. Por exemplo, a maioria dos receptores AMPA/cainato permite maior influxo de Na^+ , do que Ca^{2+} nas células. Além disso, esses receptores apenas requerem a presença de glutamato para serem ativados. Os receptores NMDA, em contraste, são igualmente permeáveis ao Na^+ e Ca^{2+} no neurônio e requerem glutamato e um estímulo despolarizante adicional (por exemplo, de um receptor AMPA ou cainato previamente estimulado) para a sua ativação (revisto por GONZALES e JAWORSKI, 1997).

O etanol, dependendo do tempo de exposição, desempenha efeitos opostos sobre os receptores NMDA. A exposição aguda ao etanol inibe o influxo de íons através deste receptor, enquanto que a crônica causa aumento do número de receptores, aumentando, desta forma, o influxo de íons (HU e TICKU, 1995; FREUND e ANDERSON, 1996). Na exposição crônica ao etanol, a *upregulation* de receptores NMDA se relaciona com as alterações comportamentais e funcionais observadas na dependência à droga (DEVAUD e

MORROW, 1999). Assim, é provável que o uso continuado e excessivo da droga possa produzir uma regulação seletiva nos receptores NMDA (TREVISAN et al., 1994; FOLLESA e TICKU, 1995).

Dependendo do tipo de preparação e de procedimentos laboratoriais, as concentrações de 5-60 mM (20-240 mg%) de etanol demonstraram inibir as respostas mediadas pelo receptor NMDA *in vitro* (GOTHERT e FINK, 1989; LOVINGER et al., 1989; GONZALES e WOODWARD, 1990; WOODWARD e GONZALES, 1990) e de 10-100 mM (40-400 mg%) (LOVINGER et al., 1990; GROVER et al., 1994).

O receptor NMDA é regulado por diferentes sítios de reconhecimento tanto para ligantes endógenos quanto exógenos, incluindo o glutamato, glicina, magnésio, zinco, poliaminas, fármacos como a fenciclidina (agonista inverso), os antagonistas MK-801 (dizocilpina) e quetamina, além das regiões sensíveis ao CO e ao pH (MAYER e WESTBROOK, 1987; COLLINGRIDGE e LESTER, 1989; RECASENS, 1995; WATKINS et al., 1990). A glicina atua como agonista parcial num sítio insensível à esticnina, sendo necessária para a ativação do receptor NMDA pelo glutamato, aumentando a frequência da abertura do canal (VERDOORN et al., 1987; KLECKNER e DIGLENDINE, 1988; revisto por SHEININ et al., 2001). O sítio da glicina pode ser bloqueado competitivamente e seletivamente pelo ácido 7-cloro quinurênico (KEMP et al., 1988). Várias pesquisas indicam que o etanol é um antagonista do referido sítio (FERREIRA e MORATO 1996 e 1997; NUNEZ et al., 2000). Além disso, a partir de estudos com homogenatos de cérebro, foi sugerido que o acetaldeído possa modular as ações do etanol no sítio da glicina (WEINER e ARDELT, 1984; MASCIA et al., 2001).

Cada receptor NMDA consiste de várias subunidades, motivo pelo qual os tipos de receptores diferem entre os neurônios (GONZALES e JAWORSKI, 1997), sendo alguns neurônios mais sensíveis ao etanol (CREWS et al., 1996). Foram caracterizados sete tipos de

subunidades de receptores NMDA: NR1, NR2A-D, NR3A-B (OZAWA et al., 1998; DINGLELINE et al., 1999; ANDERSSON et al., 2001; NISHI et al., 2001; CHATTERTON et al., 2002). A composição exata dos receptores NMDA não está totalmente esclarecida, mas os receptores funcionais parecem conter pelo menos uma subunidade NR1 com uma ou mais subunidades NR2 (MONYER et al., 1994; STEPHENSON, 2001). É postulado que o tratamento crônico com etanol possa ativar a subunidade NR2B, a qual é fosforilada pela PKC, potencializando a entrada de cálcio no receptor NMDA (NARITA et al., 2001). O tratamento de neurônios cerebelares com etanol mostrou que tanto as subunidades NR2A quanto as NR2B, expostas ao etanol, podem interferir no desenvolvimento neuronal (SNELL et al., 2001). Para que o etanol interfira no receptor NMDA, deve estar presente pelo menos uma subunidade NR2A e/ou uma subunidade NR2B (GONZALES e JAWORSKI, 1997; CHATTERTON et al., 2002). Ademais, é provável que as subunidades NR2A e NR2B tenham interação com a proteína de densidade pós-sináptica (PSD-95) ou seus homólogos (SAP97, SAP 102, chapsina) (KORNAU et al., 1995; MULLER et al., 1996; revisto por LYNCH E GUTTMANN, 2001).

O receptor NMDA está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos, sendo destacada a sua ação na aquisição da memória, LTP, plasticidade sináptica, epilepsia e excitotoxicidade (CHOI, 1988; LOVINGER et al., 1989; MELDRUM e GARTHWAITE, 1990; MACDONALD et al., 1991; MADISON et al., 1991; MCBAIN e MAYER, 1994; COLLINGRIDGE e BLISS, 1995; CHANDLER et al., 1999). Além disso, as alterações no receptor NMDA induzidas pelo etanol podem contribuir para prejuízos no aprendizado, perdas neuronais, déficit cognitivo e manifestações da síndrome de abstinência (HOFFMAN et al., 1990; HODGES et al., 1991; MORRISETT e SWARTZWELDER, 1993; RANDALL et al., 1995; PYAPALI et al., 1999).

Tem sido verificado que o glutamato, propiciando um maior influxo de cálcio em receptores do tipo NMDA, pode interferir na ativação da sintase do óxido nítrico cálcio-calmodulina dependente e, assim, haver um aumento na síntese de óxido nítrico (BREDT e SNYDER, 1989; DAWSON e SNYDER, 1994; MORRIS et al., 1994; GARTHWAITE e BOULTON, 1995; KENDRICK et al., 1996).

1.2.2 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula extremamente lábil, podendo atuar como radical livre (SNYDER e BREDT, 1992), que desempenha funções importantes em diversos processos fisiológicos. Devido à natureza ubíqua do NO, a liberação inapropriada desse mediador tem sido relacionada à patogênese ou à etiologia de diversas doenças (KUGLER e DRENCKHAHN, 1996).

O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina, pelas sintases do óxido nítrico (NOS). As NOS podem ocorrer na forma constitutiva: endotelial (eNOS, NOS_{III}) e neuronal (nNOS, NOS_I), e na forma induzida (iNOS, NOS_{II}) (PALMER et al., 1987 e 1993; DAWSON et al., 1991; GARTHWAITE, 1991; SCHMIDT et al., 1992; SHERMAN et al., 1993; FÖRSTERMANN, 1994; NATAN e XIE, 1994). As enzimas constitutivas são ativadas pelo complexo Ca²⁺ - calmodulina e produzem quantidades muito menores de NO do que a enzima induzida (AOKI et al., 1995; ZHANG e SNYDER, 1995). As formas constitutivas da NOS ocorrem no tecido vascular, especialmente no endotélio (GRYGLEWSKI, 1995a, b), no sistema nervoso central e em fibras nervosas não-adrenérgicas não colinérgicas, entre outros (GARTHWAITE, 1991; MONCADA e HIGGS, 1993).

A iNOS pode ser induzida em resposta a estímulos imunológicos ou inflamatórios e nesta forma é encontrada em uma variedade de células, entre elas, nos macrófagos,

neutrófilos, células endoteliais, músculo liso vascular, miócitos cardíacos, hepatócitos, células microgliais, como também nas ilhotas de Langerhans (SOUTHERN et al., 1990; KIECHLE e MALINSKI, 1993; EIZIRIK e LEIJRSTAM, 1994; KOSTKA, 1995, VLADUTIU, 1995). Há evidências de que certos tipos de células, sob certas condições, possam expressar mais do que uma isoforma de NOS. Por exemplo, células que apresentam a enzima constitutiva, quando estimuladas com citocinas e endotoxina bacteriana, passam a expressar também a isoforma induzida (GIBALDI, 1993; FERNANDES e ASSREUY, 1994; SCHULZ e TRIGGLE, 1994).

O NO é considerado um mensageiro retrógrado envolvido em funções centrais e periféricas diferenciadas (MONCADA et al., 1991; SCHUMAN e MADISON, 1994; ZHUO et al., 1993), que difere dos neurotransmissores clássicos, por não ser armazenado em vesículas sinápticas e porque sua liberação não depende de exocitose. O NO é formado no momento da sua liberação e difunde-se através das membranas celulares, podendo atuar no interior dos neurônios em que é formado e nas proximidades dos mesmos, participando da transmissão sináptica (BREDT et al., 1990; GARTHWAITE, 1991; SHIBUKI e OKADA, 1991). A liberação de neurotransmissores induzida pelo NO pode ser mediada tanto por processos dependentes quanto independentes de cálcio (OHKUMA e KATSURA, 2001).

A ativação de receptores AMPA e, especialmente do NMDA pelo glutamato, promove o influxo de cálcio nos neurônios permitindo a ativação de NOS cálcio-calmodulina dependente. Assim, os aminoácidos excitatórios podem estimular, através de NOS cálcio-calmodulina dependente, a síntese de NO. Esse modo de ativação pode justificar a possibilidade da neurotransmissão glutamatérgica estimular a formação de NO em segundos (GARTHWAITE et al., 1989). O NO produzido pode difundir-se para o neurônio pré-sináptico, onde ele ativa a guanilato ciclase, havendo, conseqüentemente, um aumento dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (GMPc) e a liberação de glutamato (BREDT E SNYDER, 1989; GARTHWAITE, 1991; MANZONI et al., 1992; MORRIS et al., 1994). A

nNOS, em particular, está conectada aos receptores NMDA através da proteína de densidade pós-sináptica (PSD-95), que é sensível ao influxo de cálcio, resultante da ativação de receptores NMDA (MIGAUD et al., 1998) (Figura 1).

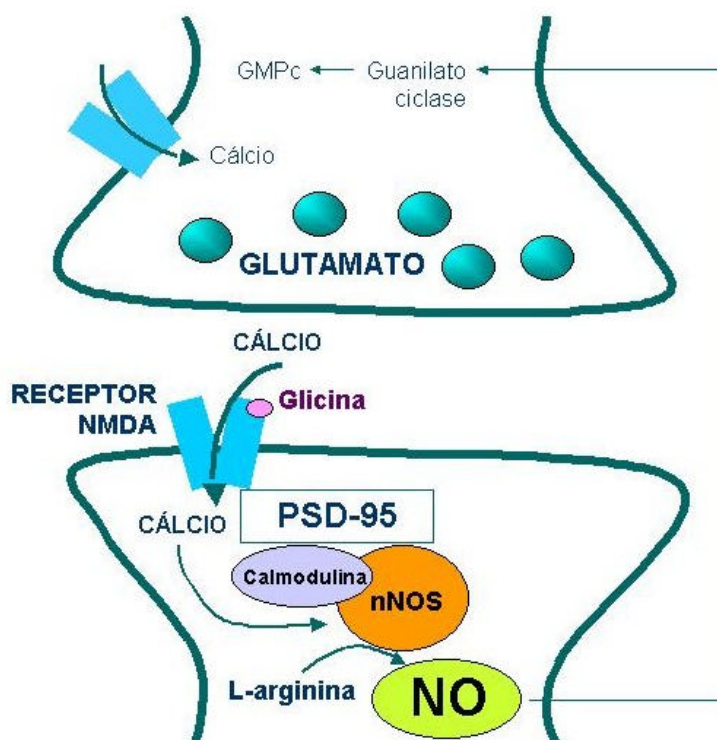


Figura 1: Representação esquemática da ativação da nNOS no SNC.

(Adaptado de KISS e VIZI, 2001; UZBAY e OGLESBY, 2001)

A excitabilidade neuronal pode promover o aumento dos níveis de GMPc em diferentes regiões cerebrais, como o cerebelo, córtex cerebral, estriado e hipocampo (GARTHWAITE e BOULTON, 1995). Também há evidências de que o NO possa interferir com outros sistemas de neurotransmissores, além do glutamatérgico (BRENMAN e BREDT, 1997).

Em várias regiões cerebrais, o fluxo de GMPc é sensível a inibidores da NOS. É pressuposto que a maioria dos efeitos do NO, relacionados com a excitabilidade neuronal no SNC, dependa da síntese de GMPc (PRAST e PHILIPPU, 2001), sendo a proteína quinase G

a principal via de sinalização do NO (WANG e ROBINSON, 1997; SMOLENSKI et al., 1998) e as proteínas quinases A e C ligadas à produção de NO (DAWSON et al., 1998; ONOUE et al., 2002). A ativação do receptor NMDA pode estimular o aumento da formação de GMPc (EAST e GARTHWAITE, 1991), enquanto que os inibidores de NOS bloqueiam esta elevação (MONTAGUE et al., 1994).

As 3 isoformas de NOS (HOBBS et al., 1999) podem ser encontradas no SNC, onde o NO parece desempenhar várias ações, incluindo: a regulação da liberação e recaptção de neurotransmissores (KISS, 2000), a inibição da função dos transportadores de monoaminas (KISS e VIZI, 2001), plasticidade sináptica (O'DELL et al., 1991), aprendizagem e memória (CHAPMAN et al., 1992; BARATTI e KOPF, 1996), ansiedade (GUIMARÃES et al., 1994; FERREIRA et al., 1999; BARETTA et al., 2001), atividade epiléptica (KAPUTLU e UZBAY, 1997), controle do sono (MONTI et al., 1999), neurotoxicidade nas doenças de Alzheimer e Huntington e isquemia cerebral (HOFFMAN, 1991; NOWICKI et al., 1991; ELIASSON et al., 1999), dor neuropática e inflamação (YAMAMOTO et al., 1993; HOLTHUSEN E ARNDT, 1995; ZIMMERMANN, 2001). É também ressaltado que o NO possa participar da tolerância rápida ao etanol (KHANNA et al., 1993c e 1995b; BARRETO, 1997) e no desenvolvimento da dependência física de algumas substâncias de abuso, como o etanol e opióides (UZBAY e OGLESBY, 2001), bem como no dano neuronal decorrente do uso de etanol (LANCASTER, 1992).

Em experimentos *in vivo* com coelhos, o NO exalado através da respiração diminuiu após a administração de etanol, efeito que não foi revertido com a administração de L-arginina (PERSSON e GUSTAFSSON, 1992). Foi observado que a administração aguda de etanol pode inibir a produção de NO induzida pela estimulação de neurônios não adrenérgicos não colinérgicos *in vitro* (KNYCH, 1994). Além disso, concentrações de etanol de 20 a 60 mmol/L não alteraram a resposta de arteríolas cerebrais, enquanto que concentrações mais

elevadas (80 e 100 mmol/L) demonstraram produzir um prejuízo na dilatação dependente de NO no endotélio, como também, interferir na atividade neuronal (MAYHAN e DIDION, 1995).

Foi constatado que a inibição de NOS e a conseqüente diminuição na produção de NO aumentam a narcose induzida pelo etanol e que o aumento na concentração de NO inibe o efeito depressor do etanol (ADAMS et al., 1994). O inibidor preferencial da nNOS, 7-nitroindazol, aumentou o efeito ansiolítico do etanol no teste do labirinto em cruz elevado em ratos (FERREIRA et al., 1999), e a utilização de outro inibidor de nNOS não seletivo reduziu a preferência do etanol no tratamento crônico (CALAPAI et al., 1996; LALLEMAND e DE WITTE, 1997). Assim, após examinar estes e outros dados da literatura, poderia ser aventado que, com a inibição das vias do NO, haveria uma acentuação dos efeitos do etanol, e ao contrário, um aumento do NO poderia diminuir as sensações decorrentes da droga.

1.3 O fenômeno da tolerância

A tolerância é um fenômeno complexo com importantes implicações terapêuticas (PORTENOY, 1994) e refere-se a uma redução na intensidade do efeito de drogas, com o uso repetido das mesmas (KALANT et al., 1971). Deste modo, quando ocorre o fenômeno da tolerância, uma dose maior é necessária para produzir o mesmo efeito original (LÊ et al., 1989). A tolerância é significativa no abuso de drogas, sendo um dos critérios para diagnóstico das substâncias psicoativas pelo DSM-IV (Manual de Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais), da Associação Americana de Psiquiatria (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

O conceito de tolerância tem sido considerado relevante no estudo do alcoolismo, por sua possível relação com o consumo de etanol (WALLER et al., 1983), por seu valor na

predição à susceptibilidade ao alcoolismo (SCHUCKIT, 1986) e por envolver também muitos outros processos neuroadaptativos (KALANT, 1998). É considerado que o organismo possa se adaptar à presença da droga, havendo uma redução dos efeitos comportamentais e/ou fisiológicos. Na tolerância, as drogas parecem promover reações fisiológicas opostas aos efeitos iniciais, na tentativa de compensar e restabelecer as condições estáveis do meio interno (homeostase). Para avaliar a aquisição da tolerância ao etanol, podem ser observados tanto efeitos fisiológicos - como a redução da temperatura corporal - quanto efeitos comportamentais - como um prejuízo na coordenação motora (revisto por VOGEL-SPROTT, 1997).

A seguir, serão exibidos vários tipos de tolerância, sendo que um tipo não necessariamente exclui o outro, podendo ainda haver interações entre eles. Assim, a tolerância farmacocinética e a comportamental podem propiciar um aumento no consumo da droga, que produzirá alterações posteriores, por meio da regulação de mecanismos intracelulares e de receptores (ALTMAN et al., 1996). E, desta forma, a presença prolongada de concentrações altas de drogas, por sua vez, propicia o desenvolvimento das adaptações neurais que geram a tolerância farmacodinâmica (GRAEFF, 1999).

1.3.1 Tolerância farmacocinética

A tolerância é considerada farmacocinética ou disposicional quando é resultado de alterações na farmacocinética da droga, de maneira que a mesma dose resulta em menor quantidade no sítio de ação. Neste caso, ocorrem alterações na distribuição, com um aumento da velocidade de metabolização e excreção de etanol, de modo que, após a ingestão, haja níveis mais baixos da droga, por exemplo, no sangue ou no cérebro (KALANT e KHANNA, 1990).

Em geral, as mulheres apresentam uma menor ação da álcool desidrogenase gástrica em relação aos homens, com a conseqüente redução do metabolismo de primeira passagem (LIEBER, 1994). Foi demonstrado, em experimentos, que animais mais velhos apresentavam um consumo de oxigênio hepático diminuído em relação aos mais jovens (BRITTON et al., 1984). Como as enzimas hepáticas (MEOS) participam do metabolismo (LIEBER, 1990) e são passíveis de indução enzimática causando tolerância ao etanol e outras drogas (LIEBER, 1993), é pressuposto que no sexo feminino, em pessoas idosas e na presença de patologias hepáticas, haja uma menor capacidade de se tornar tolerante do que indivíduos do sexo masculino, ou jovens ou sadios, respectivamente.

1.3.2 Tolerância farmacodinâmica

A tolerância funcional ou farmacodinâmica é resultante da diminuição na sensibilidade do tecido alvo, isto é, a mesma concentração da droga não produz o efeito observado anteriormente. Este tipo de tolerância envolve processos neurais adaptativos. Assim, a exposição continuada a uma droga pode afetar mecanismos de segundos mensageiros, mecanismos pós-traducionais (TABAKOFF e HOFFMAN, 1992) e alterar o número e a sensibilidade dos receptores sobre os quais ela atua como agonista (PORTENOY, 1994; GRAEFF, 1999).

1.3.3 Classificação da tolerância sob o ponto de vista temporal

A tolerância, sob o ponto de vista temporal, é classificada em aguda, rápida e crônica. A aguda é observada durante o curso de uma única exposição à droga (KHANNA et al., 1992a), tendo sido inicialmente descrita, em 1919, por Mellanby (KALANT, 1998). É evidenciado

que diferenças genéticas interferem na tolerância aguda ao etanol, havendo relação com a sensibilidade inicial (DEITRICH et al., 2000), aquisição da tolerância e tolerância funcional (REED et al., 2001).

A tolerância rápida ocorre após uma segunda dose da droga, administrada 8 a 24 horas após a dose ter sido metabolizada (CRABBE et al., 1979). Tem sido mencionado que o componente funcional seja mais importante do que o disposicional neste tipo de tolerância (KHANNA et al., 1992b, 1996).

A tolerância crônica é a mais estudada, desenvolve-se gradualmente, alcançando o seu efeito após vários dias ou semanas de administração repetida da droga, podendo incluir tanto componentes disposicionais quanto funcionais (KALANT et al., 1971; KHANNA et al., 1991a e 1992a; LITTLETON, 1980). A exposição crônica ao etanol parece estar associada com o transporte de adenosina para o interior das células, com a diminuição da produção de AMPc, atividade aumentada de canais de cálcio dependentes de voltagem, alterações nas funções mediadas por GABA, aumento da atividade mediada pelo receptor NMDA e expressão aumentada da proteína quinase C, receptores opióides, aumento nos níveis de RNAm de pré e pró-encefalinas e do sinal de transdução via proteína G (TABAKOFF e HOFFMAN, 1992). É considerado que a tolerância aguda possa envolver processos pós-traducionais (após a conversão do RNAm em proteínas ou polipeptídeos), enquanto que a crônica poderia também abranger alterações na expressão genética (revisto por CHANDLER et al., 1998).

A ingestão de etanol pode ainda diminuir a resposta individual a outras drogas (TABAKOFF et al., 1996). A tolerância cruzada significa que uma pessoa tolerante a uma droga pode apresentar uma diminuição da resposta a outras substâncias. Quando há tolerância ao etanol, por exemplo, pode ocorrer uma diminuição na resposta a determinados fármacos

como anestésicos, barbitúricos, benzodiazepínicos e drogas hipnótico-sedativas e vice-versa (HAN, 1969; LÊ et al., 1986a e b).

A tolerância rápida e a crônica apresentam similaridades, sendo considerado que ambas podem estar relacionadas com a aprendizagem e memória (KHANNA et al., 1996 e 1999). Além disso, tem sido proposto que a tolerância rápida possa ser usada como um modelo para prognosticar a tolerância crônica, uma vez que foram encontrados resultados semelhantes em ambos os protocolos (KHANNA et al., 1991a). No entanto, isto não permite concluir até que ponto os dois processos realmente são idênticos (KHANNA et al., 1992c), sendo necessárias provas mais consistentes para demonstrar e comparar especificamente os mecanismos de ação envolvidos (KHANNA et al., 1996).

Deve ser enfatizado ainda o aspecto ético, pois os testes de tolerância rápida, ao contrário da crônica, abreviam o tempo de exposição à droga e permitem ensaios com animais em melhores condições para testes comportamentais, menos estressados pelo tratamento e manipulação, além de reduzirem o consumo e gastos com drogas e fármacos. Contudo, os propósitos devem ser examinados com critério, porque, para estudar e compreender aspectos da dependência ao etanol, pode haver a necessidade de protocolos mais prolongados.

1.3.4 A tolerância influenciada pelo comportamento e pelo aprendizado

O conceito de tolerância tem evoluído, sendo julgado um processo complexo, que pode ser influenciado pela aprendizagem e pelo comportamento (TABAKOFF et al., 1986; ALTMAN et al., 1996). Assim, a tolerância ao etanol pode ser acelerada pelo comportamento, sob a influência de fatores de treinamento ambientais e cognitivos, e não somente através da exposição à droga (VOGEL-SPROTT et al., 1984).

A prática de um teste ou de uma tarefa sob a influência do etanol pode resultar em alguma aprendizagem e aumentar a tolerância (MELLANBY, 1919; GOLDBERG, 1943). Neste caso, também é denominada de tolerância influenciada pela prática intoxicada (LÊ e KALANT, 1992). Chen (1968) testou esta hipótese desenvolvendo ensaios em que o etanol era administrado antes ou depois do teste no labirinto circular para obter alimento e concluiu que o aprendizado ocorrido durante a prática da tarefa sob a influência da droga contribuía para o desenvolvimento da tolerância. Apesar de os dois grupos estarem igualmente treinados e receberem a mesma proporção de etanol, os ratos nos quais esta droga foi administrada antes dos testes manifestaram maior tolerância, indicada por um melhor desempenho em relação aos animais do outro grupo (VOGEL-SPROTT e SDAO-JARVIE, 1989).

Quanto à relevância dos fatores ambientais, foi demonstrado que os animais podem apresentar maior tolerância quando a droga é administrada sempre no mesmo compartimento, do que quando é administrada em locais diferentes (VOGEL-SPROTT et al., 1984; BITRAN e KALANT, 1991; VOGEL-SPROTT, 1997; KHANNA et al., 1999).

1.3.5 Tolerância ao etanol, receptor NMDA e óxido nítrico

Considerando as ações do etanol nas vias glutamatérgicas (particularmente no receptor NMDA) e nas vias dependentes de NO, bem como a interação entre as mesmas, vários estudos verificaram a participação desses circuitos na tolerância ao etanol. Por exemplo, foi percebido que antagonistas competitivos do receptor NMDA, como a quetamina e o ⁽⁺⁾MK-801, administrados por via sistêmica, bloquearam o desenvolvimento da tolerância ao etanol, em testes de coordenação motora, avaliado no plano inclinado, e de temperatura em ratos (KHANNA et al., 1991b, 1992b, 1993c).

A injeção por via i.p., do agonista do receptor NMDA, D-cicloserina, facilitou a tolerância rápida ao etanol em ratos (KHANNA et al., 1993a e 1995a) e camundongos (ZALESKI, 1998). Além disso, estudos anteriores constataram que a glicina reverte a inibição do receptor NMDA induzida pelo etanol em neurônios cerebelares e a liberação de dopamina em fatias de cérebro de rato (RABE e TABAKOFF, 1990; WOODWARD e GONZALES, 1990).

A administração intraperitoneal do inibidor não seletivo da NOS, L-nitroarginina, inibiu a tolerância rápida ao etanol no teste do plano inclinado. Este efeito não ocorreu quando os ratos receberam um tratamento prévio com o precursor da síntese de NO, L-arginina (KHANNA et al., 1993c). Em outro estudo, a injeção sistêmica de L-nitroarginina metil éster, L-NAME, bloqueou a ação facilitatória no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol induzida por D-cicloserina, sugerindo que a ativação do receptor NMDA poderia ser contrabalançada pelo bloqueio da síntese de NO na modulação da tolerância rápida (KHANNA et al., 1995b). A administração intraperitoneal do inibidor preferencial de nNOS 7-nitroindazol (ALABADÍ et al., 1999; KOROS et al., 1999), em camundongos, no modelo do rota-rod, bloqueou a tolerância rápida à incoordenação motora do etanol, o que, todavia, não ocorreu quando os animais foram injetados previamente com L-arginina (BARRETO, 1997), reforçando a sugestão sobre a participação do NO nesse fenômeno.

Como observado, os dados referentes à tolerância rápida ao etanol envolveram a administração sistêmica de diferentes fármacos, e a possibilidade de efeitos periféricos não pode ser descartada. Assim, neste estudo, inicialmente questionou-se se os efeitos da ativação ou do bloqueio do receptor NMDA na tolerância rápida à incoordenação motora seriam semelhantes quando agonista e antagonistas deste receptor fossem administrados diretamente no sistema nervoso central. Outra questão era verificar se o efeito encontrado no modelo de incoordenação motora se estenderia para a tolerância a um efeito fisiológico, como a

hipotermia induzida pelo etanol, já que existem similaridades e diferenças nos mecanismos moleculares e locais de ação do etanol nesses efeitos (KHANNA et al., 1997, 1999).

Nos modelos envolvendo a tolerância rápida, foi constatado que a inibição não seletiva da NOS em ratos (KHANNA et al., 1993c e 1995b) e a inibição preferencial da nNOS com 7-nitroindazol em camundongos (BARRETO, 1997) resultavam em bloqueio da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol. Entretanto, era desconhecido se o bloqueio preferencial da nNOS em ratos também interferiria na tolerância à incoordenação motora do etanol, e qual seria seu efeito na tolerância ao efeito hipotérmico do etanol.

Como enfatizado anteriormente, vários estudos mostram que o NO ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) que catalisa a formação de GMPc no cérebro (BREDT e SNYDER, 1990; DAWSON e SNYDER, 1994; EAST e GARTHWAITE, 1991; GARTHWAITE, 1991; SOUTHAM e GARTHWAITE, 1993) e tecidos periféricos (RAND e LI, 1995), sendo possivelmente esta via a maior efetora das ações do NO no sistema nervoso central (PRAST e PHILIPPU, 2001; SHOUTHAM e GARTHWAITE, 1993). Deste modo, uma outra questão a ser respondida seria se a inibição da enzima GCs teria um efeito semelhante ao produzido pela inibição da síntese do NO na tolerância rápida ao etanol, ou seja, o bloqueio da tolerância. Além disso, não se sabia se o aumento dos níveis centrais de NO interferiria na tolerância e quais seriam esses efeitos. Com esse objetivo, foram estudados os efeitos de inibidores da GCs, de doadores de NO e de um análogo do GMPc na tolerância rápida ao etanol.

Em relação aos efeitos crônicos do etanol, há evidências de que esta droga aumenta a formação de NO no cerebelo de ratos (XIA et al., 1999) e em cultura de neurônios corticais (CHANDLER et al., 1997), ações que positivamente envolvem a nNOS via L-arginina (NAASSILA et al., 1997). Outros estudos, porém, demonstraram que o consumo crônico de etanol diminui a síntese de NO nas camadas superficiais do colículo superior (ZIMA et al., 1998). Ademais, o tratamento crônico com etanol na dieta líquida por 16 dias não alterou o

imunoconteúdo da nNOS hipocampal de ratos adultos (FERREIRA, 2000). A inexistência de dados referentes ao efeito do bloqueio crônico da nNOS na tolerância à incoordenação motora induzida pelo etanol motivou a avaliação dos efeitos do tratamento crônico com etanol e o inibidor da síntese de NO, 7-nitroindazol, paralelamente na tolerância e no imunoconteúdo das três isoformas da enzima, no hipocampo e em outra região, rica em NO, como o cerebelo (VICENT, 1996).

3 OBJETIVOS

GERAL:

O presente estudo teve como objetivo geral estudar a interferência de vias que envolvem o óxido nítrico em dois modelos de tolerância ao etanol.

ESPECÍFICOS:

- Determinar quais doses de etanol seriam utilizadas nos ensaios envolvendo a tolerância rápida à incoordenação motora e à hipotermia;
- Verificar o efeito de um agonista e dois antagonistas do receptor NMDA, administrados por via intracerebroventricular (i.c.v.), na tolerância rápida ao etanol, nos testes do plano inclinado e da temperatura corporal;
- Observar os efeitos do inibidor preferencial da nNOS (via intraperitoneal - i.p. - e i.c.v.) na tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, na presença ou ausência de L-arginina, precursora do NO, e de seu enantiômero, D-arginina (i.p. e i.c.v.), no teste do plano inclinado;
- Verificar o efeito do inibidor de NOS (i.c.v.), na tolerância rápida ao etanol, no teste da temperatura;
- Testar o efeito de fármacos que atuam em vias dependentes de NO (doadores de NO, bloqueadores da via do GMPc e análogo ao GMPc), por via i.c.v., no modelo do plano inclinado;
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com etanol e inibidor de NOS em ratos submetidos à avaliação da coordenação motora;
- Analisar se o bloqueio da tolerância rápida e crônica ao etanol exercido pelo inibidor de NO apresenta interferência farmacocinética;

- Investigar o imunocnteúdo das isoformas neuronal, induzida e endotelial da NOS no hipocampo e cerebelo de ratos tratados cronicamente com etanol, inibidor de NOS e com a associação de ambos, através da metodologia de *Western blotting*.

2 HIPÓTESES

O uso continuado de etanol causa tolerância com intensidade variável conforme as características peculiares dos indivíduos. Estudos demonstraram a interferência de fármacos que interagem com o receptor NMDA, aumentando ou diminuindo a tolerância ao etanol. Também em animais experimentais, com a inibição da atividade de NOS, houve bloqueio da tolerância rápida ao etanol, sendo possível a participação de uma interação entre receptor NMDA e NO.

Sabendo-se que os fármacos agonista e antagonistas do receptor NMDA e inibidores da síntese de NO interferem na tolerância aos efeitos do etanol, quando administrados por via sistêmica, seria necessário verificar se estes fármacos causariam um padrão similar de respostas quando injetados centralmente. Se isso fosse confirmado, a tolerância ao etanol poderia ser afetada pelo uso de fármacos que atuam em outras etapas da neurotransmissão mediada por NO.

Além disso, como no uso crônico do etanol ocorrem mecanismos compensatórios que podem alterar a neuromodulação e o funcionamento de receptores, poderia haver, paralelamente ao efeito comportamental, uma alteração no imunoconteúdo das isoformas da NOS em regiões do cérebro ricas em NO.

Esquema I: Hipóteses.



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos machos com dois e meio a três meses de idade, pesando entre 250 e 300 g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, transferidos para o Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, CCB, UFSC, alojados em um número de 6 a 8 indivíduos em gaiolas plásticas (42 cm x 34 cm x 17 cm) e mantidos em temperatura ambiente controlada (23 ± 1 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam dieta comercial e água *ad libitum* até momentos antes das condições experimentais. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Guia de Uso e Cuidados com Animais Laboratoriais do Instituto Nacional de Saúde, dos Estados Unidos, e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA N^o 058).

4.2 Drogas e reagentes

O etanol absoluto P.A., hidrato de cloral e azul de metileno foram provenientes da Merck (Hawthorne, NY, USA). O etanol foi preparado através de diluição com salina para obter uma concentração de 20% p/v. 7-nitroindazol (7-NI); L-arginina; D-arginina; (+)MK-801; (-)MK-801; 3',5'-monofosfato sódico de 8-bromoguanosina cíclico (8-Br-GMPc); D-cicloserina (DCS) e 6-(fenilamino)-5,8-quinolidiona (LY83583); e ácido 7-cloro quinurênico (7-Cl) foram obtidos da Research Biochemicals International (Natick, MA, USA). O pentobarbital sódico foi proveniente do Laboratório Abbott (São Paulo, Brasil).

Propilenoglicol, nitroprussiato de sódio (NPS), dimetil sulfóxido (DMSO), hidróxido de sódio (NaOH), monolaurato de polietileno sorbitano (Tween 80), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 1H-(1,2,4)-oxodiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-ona (ODQ), 4H-8-Bromo-1,2,4-oxadiazolo(3,4-d)benz(b)(1,4)oxazin-1-ona (NS2028) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) foi sintetizado (FIELD et al., 1978) e doado pelo Dr. J. Assreuy (Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil). L-arginina, D-arginina, azul de metileno e NPS foram diluídos em salina estéril. 8-Br-GMPc, LY83583 NS2028 e ODQ foram diluídos em uma solução de 0,01% de DMSO e salina estéril. As drogas ou seus veículos foram injetados por via intraperitoneal (i.p.) ou nos ventrículos laterais.

Foram utilizados os seguintes reagentes: acrilamida, bis-acrilamida e BSA (albumina sérica bovina) de Sigma; SDS (dodecil sulfato de sódio), Tris (tris hidroximetil aminometano), glicina, ácido bórico e kit ECL (quimiluminescência), de Amersham Pharmacia Biotech; EDTA e NaCl, da Merck.

Destaca-se que, no decorrer do presente estudo, a palavra droga às vezes é utilizada como sinônimo de etanol. O termo fármaco aqui é utilizado para as outras substâncias administradas nos animais por via intraperitoneal ou intracerebroventricular.

4.3 Estereotaxia

4.3.1 Cirurgia e métodos de microinjeção

Os animais foram anestesiados com Equitesin (0,3 mL/100 g, i.p.). Este anestésico foi preparado misturando-se vigorosamente duas soluções (A e B). A solução A continha hidrato

de cloral (8,5 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (4,252 g) e H_2O (91,40 mL). A solução B continha pentobarbital sódico (1,94 g), etanol (13,0 mL) e propileno glicol (85,6 mL).

Após a perda total dos reflexos, foi feita a tricotomia na parte superior da cabeça do animal, com posterior adaptação ao aparelho estereotáxico (Stoelting mod. 300, USA). Após a assepsia da área com álcool iodado, foi administrada, subcutaneamente, uma solução de lidocaína com adrenalina a 2%. A calota craniana foi exposta através da remoção de uma área ovalada e, o periósteo, de toda a região, foi raspado com uma espátula. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico, ficando o bregma e o lambda em um mesmo plano horizontal. A calota craniana foi seca e perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula guia. Para o implante de cânulas nos ventrículos laterais, as seguintes coordenadas foram obedecidas: AP (ântero-posterior) – 0,8; MD (médio-lateral) \pm 1,5; DV (dorso-ventral) – 3,5 mm, segundo o Atlas de Paxinos e Watson (1997) (Figura 2). Depois da adaptação dos parafusos e da cânula, o osso foi novamente seco e a área aberta preenchida com cimento de acrílico, que, ao endurecer, agrupou todas as peças em uma sólida prótese.

Ao final da cirurgia, cada animal foi mantido numa caixa, em ambiente aquecido, até o despertar. Posteriormente, os animais foram removidos para caixas num número total de quatro, onde receberam água e ração à vontade, permanecendo por um período de cinco a sete dias, até serem utilizados em protocolos específicos.

Em ensaios preliminares, foi verificado que não houve diferenças com as drogas administradas em animais implantados com cânulas no lado esquerdo ou direito. Assim, em cada estudo, metade dos animais teve as cânulas implantadas no lado esquerdo e a outra parte no lado direito do cérebro.

4.3.2 Cânulas e microinjeções

Foram confeccionadas cânulas-guias de 10 mm de comprimento, a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm. Um fio de aço foi introduzido nas cânulas-guias para prevenir a obstrução. Conforme já descrito, após a implantação das cânulas, os animais permaneciam 5 a 7 dias para recuperação cirúrgica.

Para as microinjeções das drogas, foram utilizadas agulhas de 11 mm de comprimento (1 mm mais longas que as cânulas-guias, 0,3 mm de diâmetro), adaptadas de agulhas odontológicas, conectadas a micro-seringas (Hamilton), por um tubo de polietileno. Para nos certificarmos do fluxo de injeção da droga, uma bolha de ar foi produzida dentro do tubo de polietileno adaptado à micro-seringa (o movimento anterógrado da bolha indicava haver fluxo da injeção da droga). Antes das injeções i.c.v., cada rato foi imobilizado com auxílio de um pano, e retirado o mandril adaptado à cânula com a utilização de um alicate. As cânulas-guias foram desobstruídas com uma lima odontológica. O volume de fármacos injetado foi de 0,5 ou 1 μ L (1 μ L: veículo ou 7-Cl + salina, veículo ou 7-Cl + DCS; veículo ou L-Arg ou D-Arg + 7-NI; 7-NI - 80 nmol - ; azul de metileno) por animal. Ao final da microinjeção, a agulha foi mantida no local por aproximadamente 30 segundos adicionais. Após as injeções por via intracerebroventricular, os animais foram colocados nas respectivas caixas até o início dos testes.

4.3.3 Confirmação da posição das cânulas i.c.v.

Após os testes comportamentais, cada animal foi novamente anestesiado com Equitesin, sendo, após a perda de reflexos, perfundido transcárdicamente com NaCl 0,9%, seguido da solução de formalina a 10%. Após a perfusão, uma microinjeção de 0,5 μ L de azul de Evans

foi aplicada através da cânula-guia para marcar exatamente a localização das microinjeções. Os cérebros foram removidos e mantidos em solução de formalina a 10% por cerca de 5 dias. Os cortes cerebrais foram obtidos com o uso de bisturi, considerando-se, na avaliação dos procedimentos experimentais, apenas aqueles cujas cânulas estavam implantadas corretamente nos ventrículos cerebrais, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1997).

Os ventrículos laterais têm a forma aproximada de um C, sendo constituídos por ponta anterior ou frontal, um corpo com pontas posterior (occipital) e inferior (temporal). A ponta anterior do ventrículo lateral é a parte situada anteriormente ao foramen interventricular. Sua parede lateral é a cabeça do núcleo caudado e seu teto é o corpo caloso. O corpo do ventrículo lateral se estende para trás do foramen interventricular, sendo o tálamo e a cauda do núcleo caudado o seu assoalho. No assoalho da ponta inferior fica o hipocampo, enquanto em seu teto passa a cauda, muito atenuada, do núcleo caudado (CROSSMAN e NEARY, 1997).

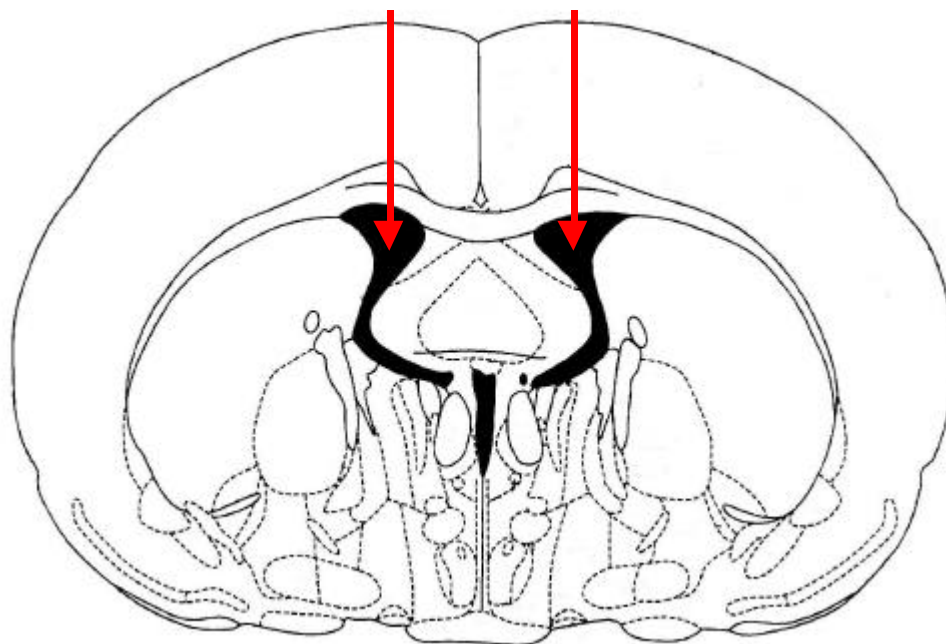
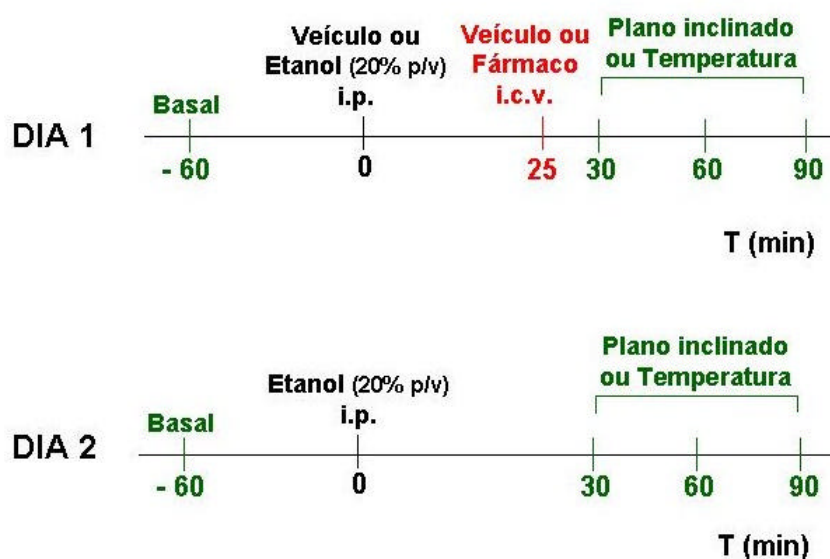


Figura 2: Secção frontal de cérebro de rato do Atlas Paxinos e Watson (1997), na coordenada (ântero-posterior) -0,8 a partir do bregma. A seta indica o local de injeção dos fármacos nos ventrículos laterais.

4.4 Procedimento experimental para avaliação do comportamento

A maioria dos ensaios envolveu a tolerância rápida ao etanol, com ratos submetidos à cirurgia estereotáxica. Os testes comportamentais envolvendo a tolerância rápida, realizados no modelo do plano inclinado ou no da temperatura, ocorreram durante dois dias com avaliação em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções com veículo ou etanol, por via i.p. Além disso, os animais submetidos à implantação de cânulas nos ventrículos laterais receberam, no dia 1 (25 min após as injeções com veículo ou etanol por via i.p. e 5 min antes dos testes), veículo ou fármacos por via i.c.v. Após os testes, os animais retornaram às suas gaiolas moradia. No dia 2, todos os animais receberam a mesma dose de etanol e foram testados como no dia anterior (Esquema II).



Esquema II: Exemplificação de procedimento experimental da maioria dos ensaios comportamentais relacionados à tolerância rápida ao etanol.

4.4.1 Avaliação da coordenação motora no plano inclinado

O prejuízo motor foi mensurado no plano inclinado ou *tilt plane* (ARVOLA et al., 1958), modificado por QUINTANILLA e TAMPIER (2000). O aparelho consiste de um

plano inclinado e é constituído por uma caixa retangular (58,5 cm de comprimento, 20,5 cm de largura e 25 cm de altura) de acrílico com o piso recoberto por uma grade metálica, que gira de 0 a 90 graus em relação ao plano horizontal em 5 segundos (Figura 3). Quando um animal caiu da grade metálica, o ângulo, no instante da queda, foi registrado (ângulo de queda) e relacionado com o respectivo grau de queda de prejuízo motor (por exemplo: ângulo de 90^o correspondente ao grau de queda zero; o ângulo de 89^o, ao grau 1, e assim sucessivamente até chegar aos 36^o).

Um rato que permaneceu no plano inclinado sem queda até o ângulo de 90^o, obviamente, não apresentou prejuízo motor, enquanto que um prejuízo motor de 100% significou um ângulo de queda de 36^o (valor obtido com a queda de um animal profundamente anestesiado, no nosso laboratório). O prejuízo motor foi calculado de acordo com a fórmula:

Prejuízo motor (%): grau de queda X 100

90 – 36

grau de queda = correspondente ao ângulo de queda

90^o = 0% de prejuízo motor

36^o = 100% de prejuízo motor (ângulo de queda de animal anestesiado)

O ângulo de queda foi avaliado antes e após 30, 60 e 90 min das injeções com etanol ou salina (i.p.). O grau de ataxia após a droga foi considerado como a alteração percentual no ângulo da queda, comparado ao basal do mesmo animal antes da administração das drogas. O prejuízo máximo foi considerado para avaliar os efeitos do etanol, o qual, na maioria dos animais, ocorria aos 30 min após as injeções com etanol.

Os grupos experimentais e seus respectivos controles foram comparados tanto no peso corporal quanto no desempenho durante os valores basais no plano inclinado, no primeiro dia. Com este procedimento, os animais apresentaram valores basais similares em todos os grupos.

O mais baixo valor no teste de cada animal, obtido em cada sessão, foi utilizado para calcular o percentual de prejuízo motor máximo.



Figura 3: Plano inclinado para avaliar a coordenação motora.

4.4.2 Avaliação da temperatura corporal

Para a avaliação da temperatura corporal, foi utilizado um termômetro digital, modelo 8402-00, da Cole-Parmer Instrument Company (Illinois, EUA). Neste procedimento, cada animal foi imobilizado com o auxílio de um pano, e a sonda do termômetro, lubrificada com vaselina, foi inserida 5 cm no reto, permanecendo até a obtenção da estabilização do registro da temperatura (pelo menos 30 segundos). A medição da temperatura ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções, por via i.p., com salina ou etanol. Destaca-se que a temperatura da sala era rigorosamente controlada ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), uma vez que a temperatura ambiente pode interferir nos resultados.

Durante o período de três dias, os animais foram previamente habituados com o equipamento, sem qualquer tratamento, com a finalidade de minimizar a ocorrência de

estresse. Os animais foram comparados tanto em relação ao peso corporal quanto à temperatura basal nestes dias de manipulação, para depois separá-los em grupos com valores basais semelhantes. O efeito hipotérmico foi expresso como a queda máxima da temperatura no período dos testes, que ocorria aos 60 ou 90 min após as injeções com etanol. Graficamente, foi registrada a diferença máxima da temperatura em relação ao basal, em graus Celsius, obtida pela maior variação da temperatura em relação aos valores basais.

4.5 Tratamento crônico com etanol

A princípio, foram formados dois grupos de ratos, que receberam veículo ou 7-NI (12 mg/Kg, i.p.) e que, divididos novamente, receberam, após 30 min, salina ou etanol (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.). As doses foram selecionadas em experimentos prévios (experimentos: 1 e 6). Em condições basais e decorridos 30, 60 e 90 min destas últimas injeções, os animais foram avaliados no plano inclinado, retornando após às suas gaiolas moradia. Estes procedimentos foram realizados durante 16 dias, e, no último (16^o), todos os animais receberam apenas salina ou etanol, sendo mensurados conforme anteriormente descrito. Posteriormente, os animais foram destinados para os ensaios de imunodeteccção (*Western blotting*) e para dosagem alcoólica.

4.5.1 *Western blotting*

Os procedimentos específicos referentes ao *Western blotting* foram realizados em parceria com o Laboratório de Bioquímica Celular e Molecular desta Universidade, pelo pós-graduando Fabiano Cordova, sob supervisão e orientação do Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal.

Os principais equipamentos utilizados para o *Western blotting* foram: agitador orbital BIOMIXER[®] modelo MOS-1; aparato de gel gradiente BIO-RAD[®]; cuba de eletrotransferência HOEFER[®] modelo TE 22; fonte para eletroforese Amersham Pharmacia Biotech[®] modelo EPS 301.

4.5.1.1 Preparação das amostras para eletroforese

No 16^o dia, após o tratamento crônico com etanol, associado ou não com 7-NI, os animais receberam apenas salina ou etanol por via i.p. e, 6 horas após este procedimento, foram sacrificados.

Os cérebros dos animais foram retirados e os seus hipocampos e cerebelos dissecados em meio refrigerado e homogeneizados numa relação de p/v de 1/10 em tampão contendo: 100 mM EDTA, 200 mM PMSF e 50 mM Tris, pH 7,0. Em seguida, foram centrifugados 1000x g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e as proteínas dosadas para a preparação das amostras para eletroforese.

4.5.1.2 Separação de proteínas

As amostras foram diluídas em tampão (SDS 8%, Tris 50 mM, EDTA 100 mM e β-mercaptoetanol 8%, pH 6,8, numa proporção 1:1 (v/v), sendo imediatamente fervidas por 3 min. Em seguida, foi adicionada a solução tampão de diluição da amostra (glicerol 40%, pH 6,8, Tris e Bromofenol Blue 25 mM) numa proporção de 25:100 (v/v). As proteínas (100 µg/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), usando gel de separação em gradiente de 7,5 a 15% e gel de entrada 4% (BUNN et al., 1995; LEAL et al., 2002). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 5mA por placa

e voltagem máxima de 130 V durante a noite (aproximadamente 14 horas), em temperatura ambiente, utilizando-se os tampões superior (190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% de SDS) e inferior (50 mM de Tris; pH 8.3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

4.5.1.3 Eletrotransferência e imunodeteção

Posteriormente à eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose utilizando um “sanduíche” compreendido de espuma de suporte, papel filtro Whatman[®] 3 MM, gel, nitrocelulose, novamente papel filtro e espuma de suporte. A transferência foi realizada a 4°C usando corrente de 300 mA por 3 horas em uma cuba contendo tampão de transferência. Depois da eletrotransferência, os géis foram corados com Coomassie Blue (metanol 50%, ácido acético 8% e Coomassie Blue 0,05%) e as membranas foram coradas com solução de Ponceau (Ponceau 0,5% e ácido acético 1%) para verificar a qualidade da eletroforese e da transferência, localização da região onde se encontra a proteína alvo.

Após a eletrotransferência, as membranas foram lavadas com TBS (Tris 10mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), para retirar o Ponceau, e a seguir foram bloqueadas por 1 hora com 5% de leite desnatado (Molico[®]) em TBS em temperatura ambiente. Posteriormente a esse primeiro bloqueio, as membranas foram lavadas com TBS-T (Tween-20 0,05%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) e submetidas a um segundo bloqueio de 1 hora usando uma solução de 2,5% de gelatina (Royal[®] sem sabor) em TBS (BALDO, 1994; COLLINS e SIM, 1998; BOBROVSKAYA et al., 2001; LEAL et al., 2002). As membranas foram novamente lavadas, para, finalmente, serem incubadas com os anticorpos primários anti-iNOS, anti-nNOS, anti-eNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA) por um período de 2 horas à temperatura

ambiente. Após as incubações, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpo secundário específico, de coelho (Calbiochem, EUA), ligado à peroxidase. As membranas foram lavadas, para a detecção dos complexos imunes, sendo as bandas correspondentes às respectivas proteínas reveladas através de kit ECL (quimiluminescência) conforme as recomendações do fabricante (Figura 4). As medidas de imunoconteúdo das proteínas foram realizadas através de densitometria (Scion Image®, Scion Corporation).

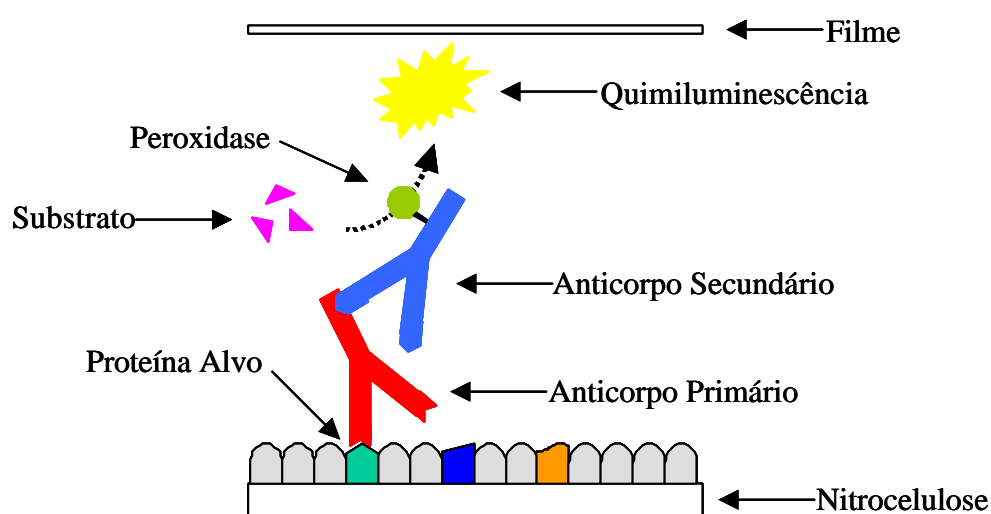


Figura 4: Imunodeteção através de quimiluminescência de um polipeptídeo, usando anticorpo específico.

4.5.1.4 Dosagem de proteínas

As proteínas foram dosadas através do método de Lowry modificado por Peterson (1977). Sobre alíquotas de 2 μL das amostras foram adicionados 398 μL de água e 400 μL do reagente de Lowry (0,2 N de NaOH, 2,5% de SDS, 5% de Na_2CO_3 , 0,2% de CuSO_4 e 0,1% de tartarato duplo de sódio e potássio). Em seguida, foram adicionados 200 μL do reagente de Folin 0,4 N e as amostras foram incubadas por 30 min. A leitura foi realizada em 750 nm e as

concentrações foram obtidas por meio de uma curva padrão, utilizando albumina sérica bovina (BSA).

4.6 Dosagem alcoólica

A dosagem alcoólica foi realizada no Instituto de Análises Laboratoriais da Polícia Técnica Científica do Estado de Santa Catarina, em Florianópolis, pela bioquímica Sandra Rachadel Torres. A alcoolemia foi determinada pelo método cromatográfico usando o “Head Space”, que é baseado na geração de vapor na amostra, mantida a uma temperatura constante, sendo então a amostra injetada diretamente no cromatógrafo a gás, nas seguintes condições:

- Cromatógrafo Trace GC 2000 e Head Space Tecmar 7000;
- Detector: FID – Ionização de chama;
- Fase estacionária: Coluna Poropack Q 6 pés de níquel, diâmetro interno 0,2 cm;
- Fase móvel: Hélio 25 mL/min;
- Temperaturas: injetor 230⁰C; coluna 200⁰C; detector 230⁰C.

Solução de n-propanol: O n-propanol utilizado foi da “Merck P.A”, como padrão interno na concentração de 1,6 g/L.

4.6.1 Coleta de sangue

As amostras de sangue dos animais foram colhidas por punção intracardíaca (2-3 mL), 30 min após as injeções, por via i.p., com etanol. Para este procedimento, foram utilizadas agulhas descartáveis 25 x 7 mm e seringas de 5 mL. O sangue foi então transferido para um tubo de ensaio contendo EDTA e mantido sob refrigeração até a realização das análises.

4.6.2 Preparo das amostras

Foi colocado 1,0 mL de solução de padrão interno de n-propanol na concentração de 1,6 g/L, em um frasco de vidro, após adição de 1,0 mL da amostra (sangue total), lavando a pipeta nessa solução e, ao mesmo tempo, homogeneizando a mistura. Posteriormente, o frasco foi fechado com lacre de alumínio e septo de borracha. Um procedimento similar ao descrito foi realizado com a solução controle, que, neste caso, foi uma solução de etanol de concentração conhecida. Após 40 a 80 segundos surgiram, respectivamente, os picos de etanol e de n-propanol. A quantificação foi efetuada pela medida das relações entre as alturas dos picos comparando-as a uma curva padrão em cada bateria de análises.

4.7 Análise estatística

Nos experimentos para a padronização do etanol, foi usado o teste “t” de Student. Para os outros testes, foi utilizada a ANOVA de uma, duas ou três vias, com variáveis independentes (tratamentos) e variável dependente (prejuízo máximo ou variação da temperatura) e a análise de variância de medidas repetidas. O teste “post hoc” empregado foi o de Tukey. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), e a probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de * $p < 0,05$. Software: Statistica for Windows 5.0 (Stasoft Inc. – 1985-1995).

Tabela I: Fármacos utilizados nos testes com as respectivas doses de etanol

PLANO INCLINADO		
Fármacos i.c.v.	Dose (nmol)	Etanol via i.p. (g/Kg)
D-cicloserina (DCS)	10; 20	2,3; 2,5; 2,7
DCS	40	2,7
Dizocilpina (⁽⁺⁾ MK-801)	1; 2; 4	2,7
⁽⁻⁾ MK-801	4	2,7
Ácido 7-cloro quinurênico (7-Cl)	40	2,7
7-nitroindazol (7-NI)	40	2,7
L-arginina (L-Arg); D-arginina (D-Arg)	600	2,7
SNAP	40; 80	2,7
Nitroprussiato de sódio (NPS)	40; 80	2,3; 2,7
Azul de metileno	30	2,7
LY83583	10	2,7
NS2028	10	2,7
ODQ	1	2,7
8-Br-GMPc	40; 80	2,7
Fármacos via i.p.	Dose (mg/Kg)	Etanol via i.p. (g/Kg)
7-NI	3; 6; 9; 12	2,7
L-Arg; D-Arg	200	2,7
TEMPERATURA		
Fármacos via i.c.v.	Dose (nmol)	Etanol via i.p. (g/Kg)
DCS	20; 40	
4 – dia 1 do teste 2; 3 – dia 2 do teste ⁽⁺⁾ MK-801	2	
7-NI	40; 80	

5 PROCEDIMENTOS E RESULTADOS

Considerando-se a classificação temporal da tolerância, a maior parte dos experimentos apresentados neste trabalho envolveu a tolerância rápida ao etanol, utilizando como modelo o plano inclinado. Foram também realizados ensaios avaliando a temperatura corporal, utilizando alguns dos fármacos já testados no plano inclinado.

Como a tolerância se desenvolve independentemente para cada efeito do etanol considerado, era de interesse estudar, em alguns casos, como determinado tratamento interferiria em dois efeitos envolvendo avaliações e circuitos neurais diferentes. O modelo do plano inclinado e a avaliação da temperatura corporal envolvem o controle motor e o controle fisiológico da temperatura, respectivamente. É possível que possam estar relacionados, apesar dos seus mecanismos de ação não estarem plenamente esclarecidos (Khanna et al., 1997 e 1999).

A participação das vias dependentes do óxido nítrico na tolerância também foi estudada pelo tratamento prolongado com etanol em ratos avaliados no plano inclinado, na ausência e na presença de um inibidor de NOS. Além disso, a alcoolemia, assim como o imunoconteúdo das 3 isoformas de NOS (nNOS, eNOS e iNOS), foram analisados no hipocampo e cerebelo desses animais.

PLANO INCLINADO

Experimento 1: Indução da tolerância rápida ao etanol com o emprego de doses únicas e de uma dose com reforço no teste do plano inclinado.

Em estudos anteriores, usando o paradigma da tolerância rápida, Khanna e colaboradores (1992, 1993b, 1995a) utilizaram, no primeiro dia do experimento, doses de etanol divididas. Este protocolo poderia causar dificuldades experimentais, principalmente quando utilizados outros tratamentos. O presente experimento teve por objetivo obter a tolerância rápida com uma dose única de etanol no dia 1. Oito grupos de ratos, quatro dos quais receberam etanol (A: 2,3; B: 2,5; C: 2,7 e E: 3,0 g/Kg, 20% p/v, i.p.) e quatro salina (i.p.), foram testados no plano inclinado em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções i.p no dia 1. Após os testes, os animais retornaram para as suas gaiolas moradia. No dia 2, todos os ratos, inclusive os que receberam salina, foram tratados com as mesmas doses de etanol do dia 1 (A: 2,3; B: 2,5; C: 2,7 e E: 3,0 g/Kg), sendo os procedimentos experimentais semelhantes aos do dia anterior.

Para comparação, outros grupos tratados com salina ou doses divididas de etanol, 2,7 g/Kg (i.p.), foram testados, conforme anteriormente descrito. A diferença em relação aos que receberam uma dose única (2,7 g/Kg de etanol) foi que, no dia 1, aos 120 min de experimento, administrou-se a dose de reforço adicional de 1,3 g/Kg (i.p.), totalizando 4,0 g/Kg. No segundo dia dos experimentos, todos os animais receberam apenas 2,7 g/Kg de etanol antes dos testes e foram avaliados em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções.

O valor referente ao maior prejuízo motor obtido em ambos os dias dos testes, que tipicamente ocorria aos 30 min (Figura 7), foi utilizado para calcular o percentual de prejuízo motor máximo.

Resultados

Os resultados destes experimentos estão representados na Figura 5: A, B, C, D e E e indicam que os ratos tratados com etanol no dia 1 tiveram prejuízo motor significativo (A: 38,68%; B: 64,90; C: 73,65%; D: 77%; E: 71%) em relação aos grupos controles. No segundo dia (até 24 horas após), foi verificado que os animais tratados com etanol nas doses de 2,3 (Figura 5A) ou 3,0 g/Kg (Figura 5E) não apresentaram tolerância, enquanto que, nos grupos que receberam etanol nas doses de 2,5 g/Kg (Figura 5B) [$t_{(1,18)} = 4,184$; $p < 0,001$] e 2,7 g/Kg (Figura 5C) [$t_{(1,18)} = 4,653$; $p < 0,001$], pode ser observado o desenvolvimento da tolerância rápida. A dose de 2,7 g/Kg de etanol, seguida pela dose reforço de 1,3 g/Kg de etanol no dia 1 (Figura 5D), promoveu o desenvolvimento da tolerância rápida: [$t_{(1,18)} = 2,937$; $p < 0,001$].

Considerando que a dose única de 2,7 g/Kg, i.p. promoveu tolerância rápida ao etanol mais evidente, esta dose foi a escolhida para ser utilizada nos experimentos posteriores (Figura 6). Em alguns ensaios, utilizando a D-cicloserina e o nitroprussiato de sódio, também foi utilizada a dose de 2,3 g/Kg i.p. de etanol, que não causa tolerância rápida.

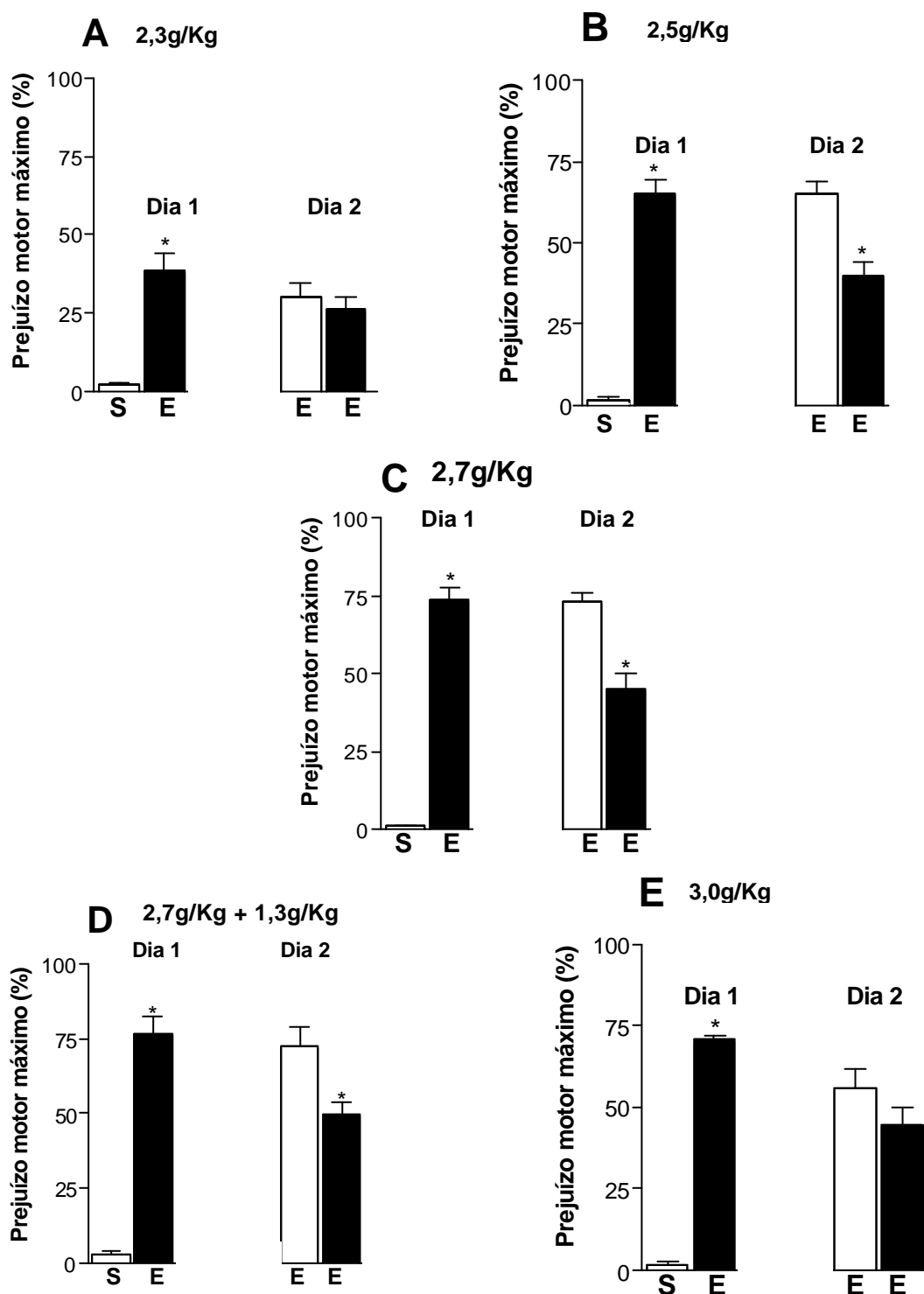


Figura 5: Desenvolvimento da **tolerância rápida à incoordenação motora** induzida pelo etanol (E), nas doses de **2,3 (A); 2,5 (B); 2,7 (C); 2,7 + 1,3 (D) e 3,0 g/Kg** (gráfico E) (20% p/v, i.p.), no teste do plano inclinado. No dia 1, os grupos controles receberam salina (S, i.p.) e os experimentais, etanol. A avaliação da coordenação motora dos ratos ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções. Após o término dos testes, o grupo D recebeu a dose adicional de 1,3 g/Kg (20% p/v, i.p.) de E. No dia 2, todos os animais receberam as doses de E administradas no dia anterior, sendo que o grupo D não recebeu a dose de reforço adicional. Os procedimentos de avaliação no plano inclinado sucederam-se como no dia anterior. Os resultados representam as médias \pm o EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado em relação ao seu respectivo grupo controle (teste "t" de Student).

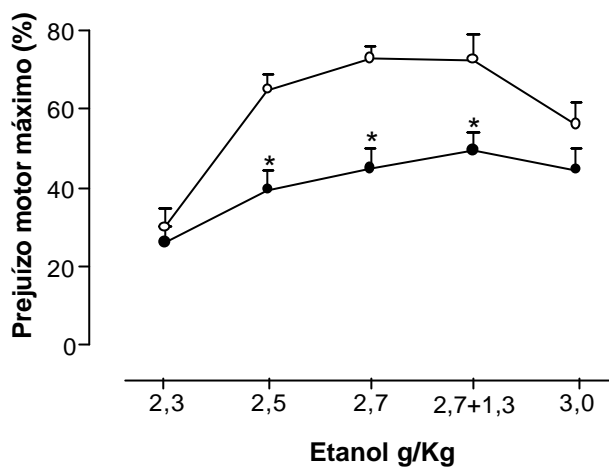


Figura 6: Efeito de diferentes doses de etanol sobre a incoordenação motora e o desenvolvimento da tolerância rápida no dia 2, em ratos submetidos ao teste do plano inclinado. No dia 1, os grupos controle ou experimental receberam, respectivamente, injeções i.p. de salina (○) ou etanol (●). No dia 2, todos os animais receberam etanol. Os resultados representam a média \pm EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle (teste “t” de Student).

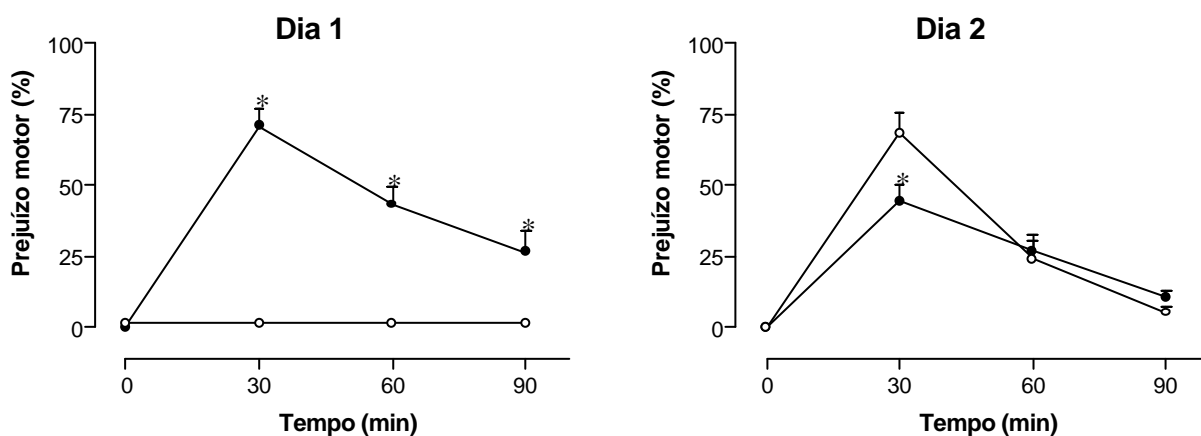


Figura 7: Efeito da dose única de 2,7 g/Kg de etanol nos dias 1 e 2 em todos os tempos nos quais os ratos foram avaliados no plano inclinado. No dia 1, os grupos controle ou experimental receberam, respectivamente, injeções i.p. de salina (○) ou etanol (●). No dia 2, todos receberam etanol. Os resultados representam a média \pm EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle (teste “t” de Student).

Experimento 2: Efeito de D-cicloserina (DCS) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

Para testar a interferência do agonista parcial ao sítio da glicina no receptor NMDA, foram utilizadas as doses de 10, 20 ou 40 nmol de DCS, injetadas por via i.c.v., após a administração de 2,3; 2,5 ou 2,7 g/Kg de etanol por via i.p.

Conforme esquematizado na Figura 3 (Material e Métodos) deste trabalho, no dia 1, o veículo ou fármaco foi administrado por via i.c.v. 25 min após as injeções i.p. com salina ou etanol. Os ratos foram avaliados no plano inclinado em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções i.p., retornando às suas gaiolas moradia ao término dos testes. No dia 2, foi administrada a todos a mesma dose de etanol do dia anterior, sendo os animais avaliados como no dia 1.

Para cada dose de etanol testada neste experimento (2,3, 2,5 ou 2,7 g/Kg, i.p.), os animais foram divididos em grupos que receberam salina ou etanol. Cada grupo foi subdividido recebendo, decorridos 25 min, por via i.c.v., salina ou DCS nas doses de 10 ou 20 nmol. Um grupo adicional de ratos, e respectivos controles, foi testado com a dose de etanol 2,7 g/Kg e DCS 40 nmol. A coordenação motora dos animais foi avaliada e, no dia 2, todos receberam a mesma dose de etanol e foram testados como no dia anterior.

Resultados

A Figura 8 demonstra o efeito de 10 (painel A) e 20 nmol (painel B) de DCS por via i.c.v., após a administração prévia de 2,3 g/Kg de etanol.

No dia 1 dos testes, os ratos tratados previamente com 2,3 g/Kg de etanol apresentaram um prejuízo motor que não ocorreu com os grupos que receberam salina. A ANOVA de duas

vias demonstrou o efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 8A: $F_{(1,40)} = 108,455$; $p < 0,001$; Fig 8B: $F_{(1,40)} = 159,784$; $p < 0,001$].

No dia 2, a ANOVA mostrou o efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 8B: $F_{(1,40)} = 5,553$; $p < 0,023$]. Conforme já observado anteriormente, nos testes de padronização de doses de etanol, 2,3 g/Kg não promoveu desenvolvimento da tolerância rápida no modelo do plano inclinado. Este resultado não foi alterado com a administração do agonista parcial do sítio da glicina, a DCS.

A Figura 9 representa o efeito de 10 (painel A) e de 20 nmol (painel B) de DCS por via i.c.v. após a administração de 2,5 g/Kg, i.p. de etanol.

No dia 1 dos testes, os ratos tratados previamente com etanol manifestaram um prejuízo motor que não ocorreu com os grupos que receberam salina. A ANOVA demonstrou o efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 9A: $F_{(1,32)} = 643,488$; $p < 0,001$; Fig 9B: $F_{(1,32)} = 1935,49$; $p < 0,001$].

A dose de 2,5 g/Kg, i.p. de etanol confirmou o desenvolvimento da tolerância rápida no modelo do plano inclinado, entretanto, as doses de 10 e 20 nmol de DCS não interferiram nesse resultado. Houve significância no dia 2 para os fatores de tratamento prévio i.p. [Fig 9A: $F_{(1,32)} = 50,804$, $p < 0,001$; Fig 9B: $F_{(1,32)} = 36,070$, $p < 0,001$] e para o tratamento i.c.v. [Fig 9A: $F_{(1,32)} = 5,047$, $p < 0,032$]. Ambas as doses de DCS não interferiram no desenvolvimento da tolerância rápida, após a administração prévia de 2,5 g/Kg de etanol.

A Figura 10 representa o efeito de 10 (painel A), 20 (painel B) e 40 nmol (painel C) de DCS por via i.c.v., após a administração prévia de 2,7 g/Kg i.p. de etanol.

No dia 1 dos testes, os ratos tratados com etanol manifestaram um prejuízo motor significativo que não ocorreu com os grupos tratados com salina. A ANOVA demonstrou o efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 10A: $F_{(1,36)} = 1330,792$, $p < 0,001$; Fig 10B: $F_{(1,36)} = 874,454$, $p < 0,001$; Fig 10C: $F_{(1,28)} = 1116,475$, $p < 0,001$].

A dose de 2,7 g/Kg i.p. de etanol confirmou o desenvolvimento de tolerância rápida, no modelo do plano inclinado, sendo que as doses de 10 e 40 nmol de DCS não interferiram nesse resultado. A ANOVA mostrou efeito significativo no dia 2 para o efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 10A: $F_{(1,36)} = 24,484$, $p < 0,001$; Fig 10C: $F_{(1,28)} = 11,117$, $p < 0,002$].

A dose de 20 nmol de DCS (Figura 10B), após o tratamento prévio com 2,7 g/Kg de etanol, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida. Houve significância do tratamento prévio i.p. [$F_{(1,36)} = 874,452$, $p < 0,001$] no dia 1.

No dia 2, o grupo que recebeu etanol em ambos os dias do experimento, sem qualquer outro tratamento, como esperado, apresentou redução do prejuízo motor (61%), indicando o desenvolvimento da tolerância rápida. Além disso, o grupo tratado com etanol nos dois dias e com 20 nmol de DCS no dia 1 exibiu um prejuízo motor de 34%. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o tratamento prévio i.p. [$F_{(1,36)} = 35,185$, $p < 0,001$]; para o tratamento i.c.v. [$F_{(1,36)} = 13,412$, $p < 0,001$]; e para a interação entre o tratamento prévio i.p. e o tratamento i.c.v. [$F_{(1,36)} = 4,12$, $p < 0,049$]. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou a facilitação de tolerância rápida com a dose de 20 nmol de DCS após o tratamento prévio com 2,7 g/Kg de etanol.

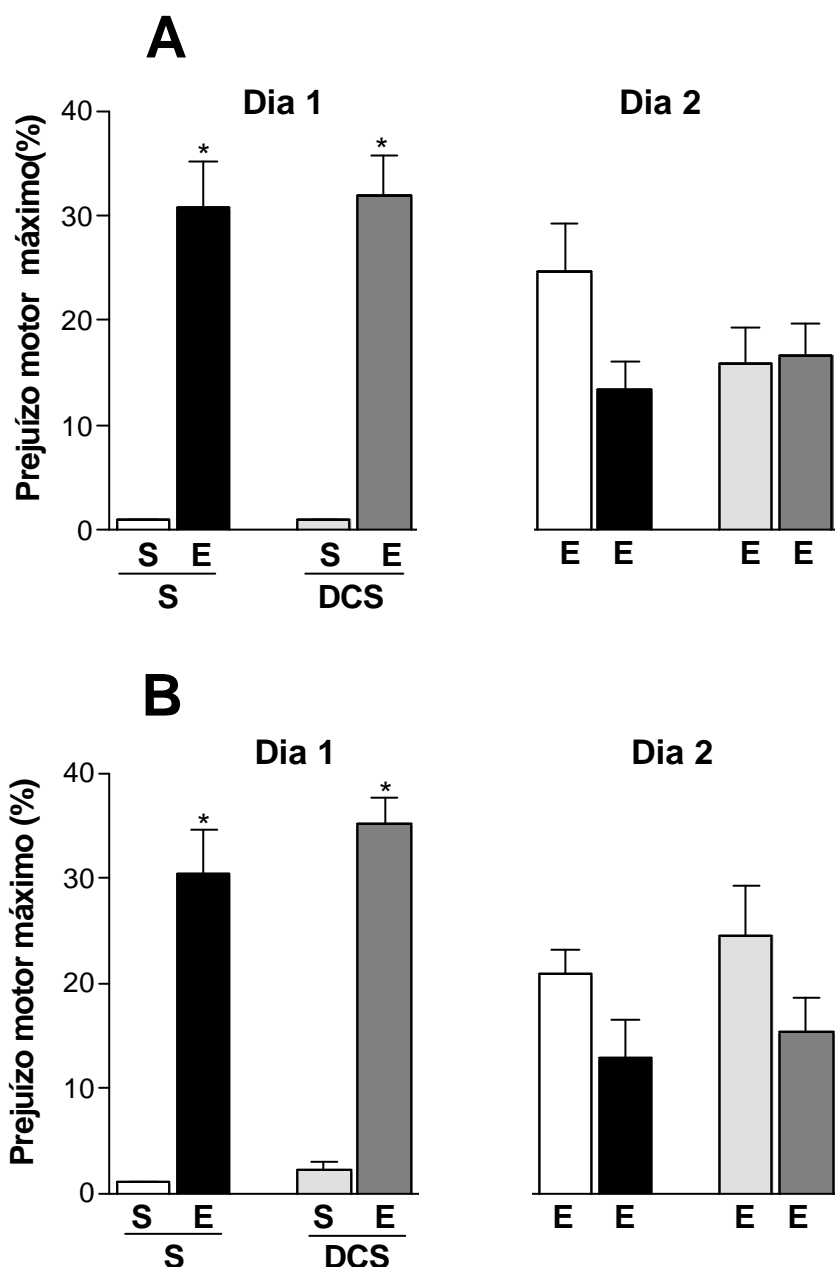
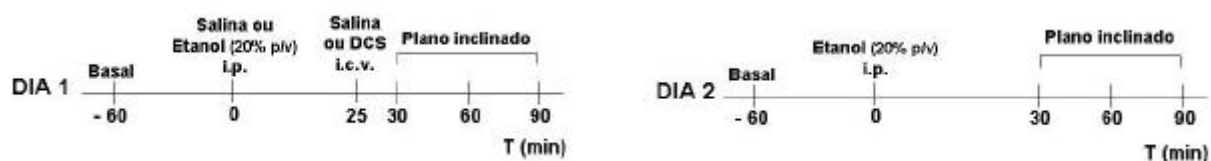


Figura 8: Efeito de D-cicloserina (DCS) nas doses de 10 nmol (painel A) e 20 nmol (painel B) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam a dose de 2,3 g/Kg de E (20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v. com salina (S) ou DCS. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 11 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

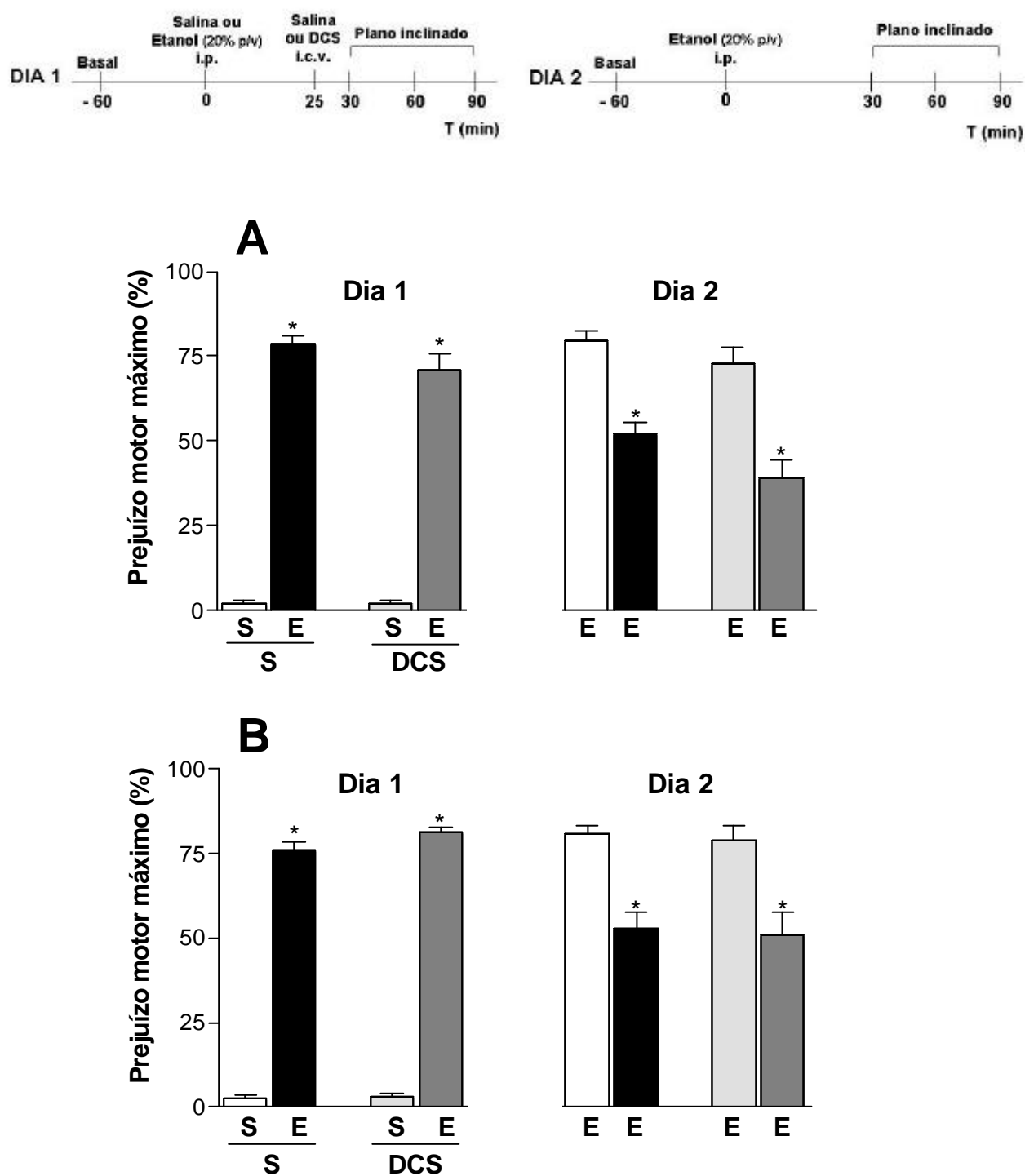


Figura 9: Efeito de D-cicloserina (DCS) nas doses de 10 nmol (painel A) e 20 nmol (painel B) no desenvolvimento da tolerância rápida do etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam a dose de 2,5 g/Kg de E (20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v. com salina (S) ou DCS. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 9 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

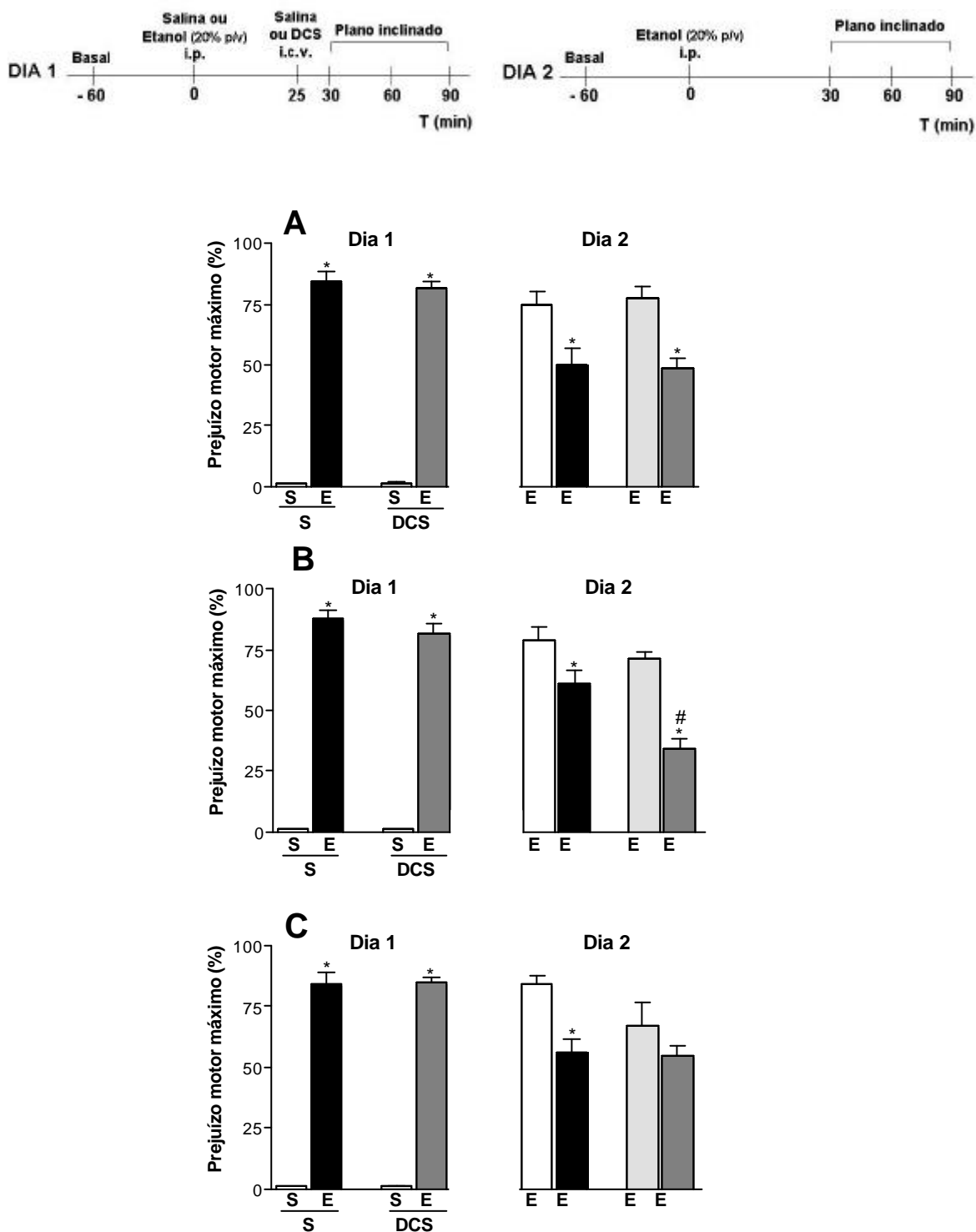


Figura 10: Efeito de D-cicloserina (DCS) nas doses de 10 nmol (painel A), 20 nmol (painel B) e 40 nmol (painel C) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam a dose de 2,7 g/Kg de E (20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v com salina (S) ou DCS. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 10 animais por grupo (painéis A e B) e 8 animais por grupo (painel C). * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1; # $p < 0,05$ comparado aos injetados com E nos 2 dias (ANOVA + Tukey).

Experimento 3: Efeito de ⁽⁺⁾MK-801 sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliado no plano inclinado.

Para investigar a interferência do antagonista não competitivo do receptor NMDA, ⁽⁺⁾MK-801, por via i.c.v., no modelo do plano inclinado, foram formados três grupos de ratos: A, B e C. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam, por via i.p., salina ou etanol (2,7 g/Kg). Estes foram divididos novamente e receberam, decorridos 25 min das injeções anteriores, por via i.c.v., salina ou ⁽⁺⁾MK-801 nas doses de 1, 2 ou 4 nmol.

Um grupo adicional de ratos, e seus respectivos controles, foram testados com a mesma dose de etanol e ⁽⁻⁾MK-801, por via i.c.v., administrados na dose de 4 nmol, uma ou três vezes durante o experimento, para verificar se o isômero óptico menos ativo interferiria no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Cada grupo recebeu, por via i.c.v., 25 min após as injeções por via i.p., salina ou ⁽⁻⁾MK-801 na dose de 4 nmol. Aos animais pertinentes ao grupo A foi administrada apenas esta injeção por via i.c.v., enquanto que os do grupo B receberam as outras injeções idênticas aos 55 e aos 85 min após as injeções por via i.p., totalizando três injeções por via i.c.v.

Resultados

A Figura 11 representa o efeito de 1 nmol (painel A), 2 nmol (painel B) e 4 nmol (painel C) de ⁽⁺⁾MK-801 administrados no dia 1 por via i.c.v. após o tratamento prévio com 2,7 g/Kg de etanol. No dia 1, a ANOVA de duas vias demonstrou o efeito significativo do tratamento prévio i.p. [Fig 11A: $F_{(1,28)} = 1602,291$, $p < 0,001$; Fig 11B: $F_{(1,28)} = 971,411$, $p < 0,001$; Fig 11C: $F_{(1,36)} = 1059,094$, $p < 0,001$].

No dia 2 do experimento, houve redução do prejuízo motor de forma significativa nos grupos controle que receberam etanol nos dois dias (sem a administração do fármaco i.c.v.)

manifestando o desenvolvimento da tolerância rápida. A ANOVA de duas vias demonstrou o efeito significativo do tratamento prévio i.p. [Fig 11A: $F_{(1,28)} = 58,220$, $p < 0,001$; Fig 11B: $F_{(1,28)} = 19,445$, $p < 0,001$; Fig 11C: $F_{(1,36)} = 5,651$, $p < 0,022$]; e da interação entre o tratamento prévio i.p. e o tratamento i.c.v. [Fig 11A: $F_{(1,28)} = 5,98$; $p < 0,021$; Fig 11C: $F_{(1,36)} = 7,788$, $p < 0,001$].

A análise *post hoc* indicou que o $(+)$ MK-801, nas doses de 2 ou 4 nmol, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, enquanto a dose de 1 nmol de $(+)$ MK-801, no dia 1, não produziu efeito na tolerância (teste de Tukey).

A Figura 12 representa o efeito da dose de 4 nmol de $(-)$ MK-801, administrada no dia 1, uma vez (painel A) ou três vezes (painel B) durante o experimento, após o tratamento prévio com etanol (2,7 g/Kg, i.p.). No dia 1, a ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 12A: $F_{(1,36)} = 1173,865$, $p < 0,001$; Fig 12B: $F_{(1,36)} = 808,126$, $p < 0,001$].

No dia 2 do experimento, não houve diferença dos grupos tratados com etanol e $(-)$ MK-801 em relação aos controles que receberam etanol nos dois dias, sem a presença do fármaco no dia 1. A ANOVA de duas vias mostrou o efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 12A: $F_{(1,36)} = 14,971$, $p < 0,0004$; Fig 12B: $F_{(1,36)} = 18,782$, $p < 0,001$]. O $(-)$ MK-801 na dose de 4 nmol, administrado uma ou três vezes durante o experimento, não interferiu na tolerância rápida ao etanol.

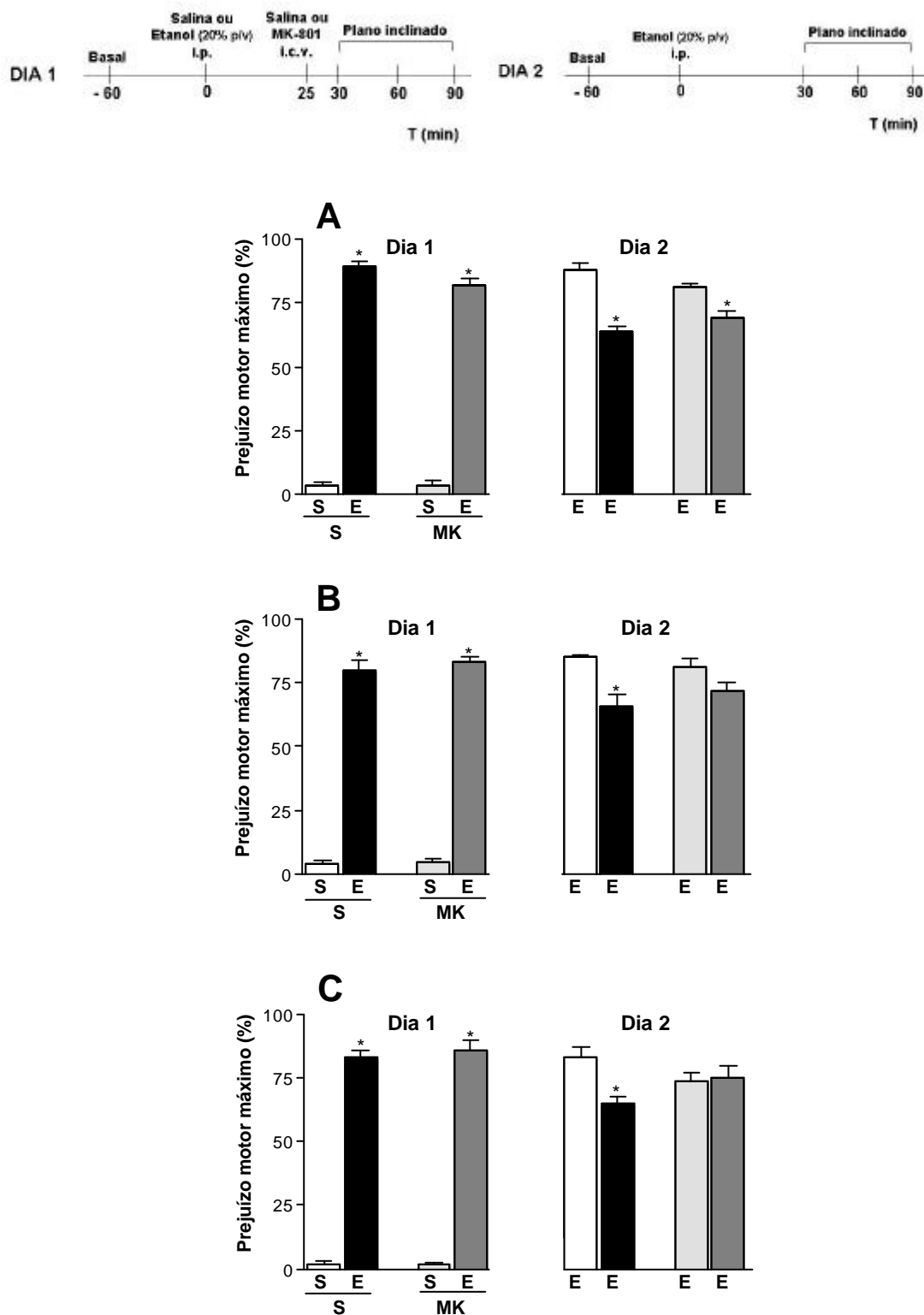


Figura 11: Efeito de ⁽⁺⁾MK-801 (MK) nas doses de 1 nmol (painel A), 2 nmol (painel B) e 4 nmol (painel C) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam E (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v com salina (S) ou MK. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média ± EPM de 8 animais (painel A e B) e 10 animais (painel C) por grupo. * p < 0,05 comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

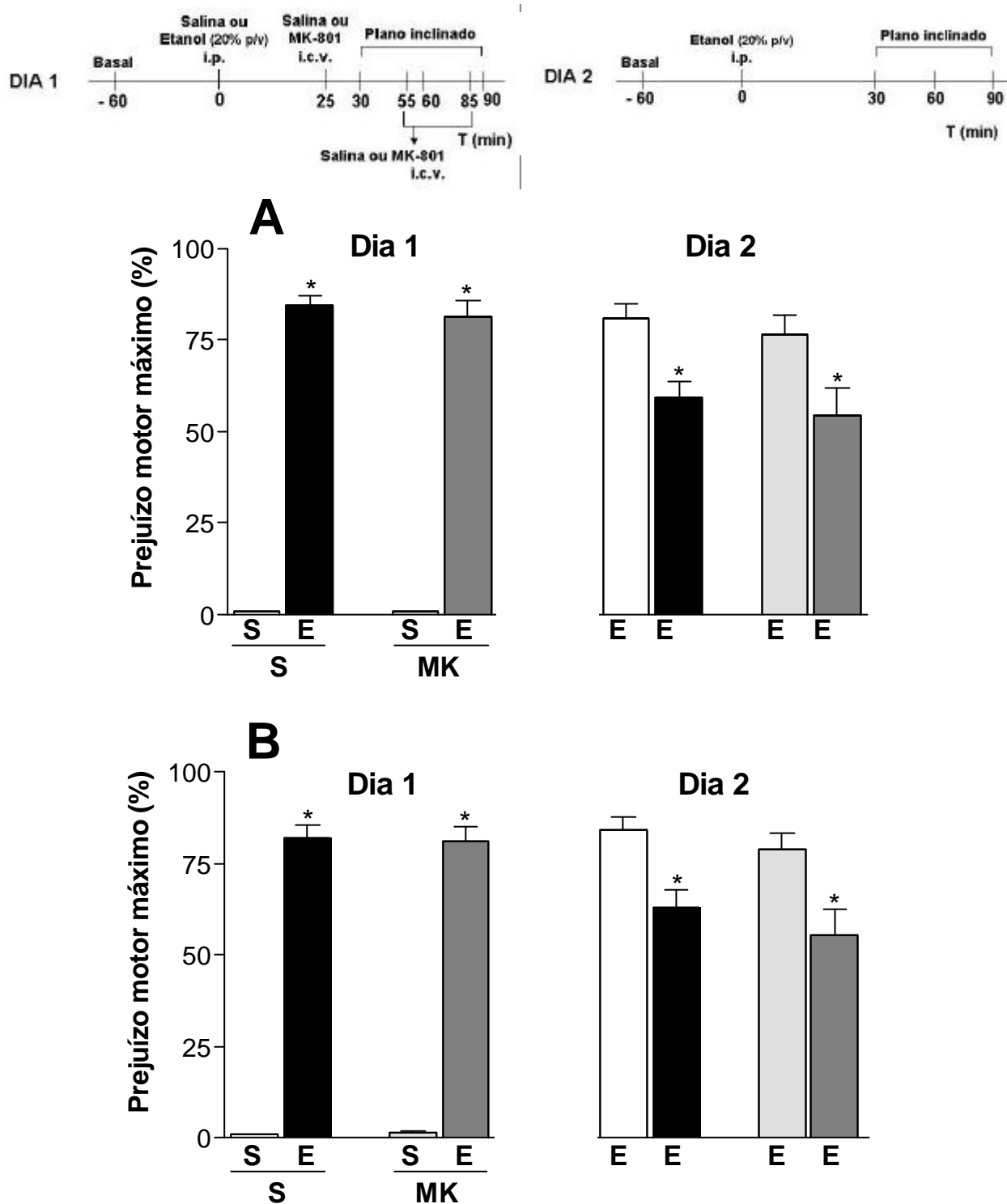


Figura 12: Efeito da administração de 1 (painel A) e 3 (painel B) injeções de ⁽¹⁾MK 801 (MK) na dose de 4 nmol no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam E (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v. com salina (S) ou MK. Os que receberam 3 injeções foram tratados por via i.c.v., também aos 55 e 85 min após as injeções i.p. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as administrações por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos em média ± EPM de 10 animais por grupo. * p < 0,05 comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

Experimento 4: Interferência do ⁽⁺⁾MK-801 no efeito de DCS na facilitação da tolerância rápida ao etanol, no plano inclinado.

Este experimento verificou a interferência do antagonista não competitivo do receptor NMDA, ⁽⁺⁾MK-801, na facilitação da tolerância rápida ao etanol induzida por DCS. Foram formados os grupos de ratos A e B, sendo cada um subdividido em dois, os quais receberam salina ou etanol (2,7 g/Kg) por via i.p. Cada grupo foi dividido novamente e recebeu, decorridos 25 min das injeções anteriores, salina ou ⁽⁺⁾MK-801, por via i.c.v., nas doses de 1 (Figura 13, painel A), ou 4 nmol (Figura 13, painel B). Após este último procedimento, os animais nos quais foi administrado ⁽⁺⁾MK-801 foram injetados (i.c.v.) com 20 nmol de DCS e os demais com salina. A coordenação motora foi avaliada, e no dia 2, todos receberam a mesma dose de etanol e foram testados como no dia anterior.

Resultados

A Figura 13 representa a interação do antagonista ⁽⁺⁾MK-801 nas doses de 1 (painel A) ou 4 nmol (painel B) injetado antes do agonista parcial DCS, na dose de 20 nmol.

Ao contrário do que aconteceu com os animais tratados com salina, os que receberam etanol apresentaram prejuízo motor no dia 1. Neste dia, a ANOVA de duas vias mostrou o efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 13A: $F_{(1,28)} = 404,861$, $p < 0,001$; Fig 13B: $F_{(1,28)} = 1375,186$, $p < 0,001$].

No dia 2 do experimento, houve redução significativa do prejuízo motor nos grupos controles tratados com etanol nos dois dias, sugerindo o desenvolvimento da tolerância rápida. A ANOVA demonstrou o efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 13A: $F_{(1,28)} = 24,728$, $p < 0,001$; Fig 13B: $F_{(1,28)} = 29,156$, $p < 0,001$]. Foi significativo o tratamento i.c.v. [Fig 13B: $F_{(1,28)} = 34,191$, $p < 0,001$], como também a interação entre o tratamento prévio i.p. e o

tratamento i.c.v. [B: $F_{(1,28)} = 16,005$, $p < 0,001$]. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o $(+)$ MK-801, na dose de 4 nmol associado com 20 nmol de DCS, bloqueou o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol. A dose de 1 nmol de $(+)$ MK-801 associada com DCS não interferiu no desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol.

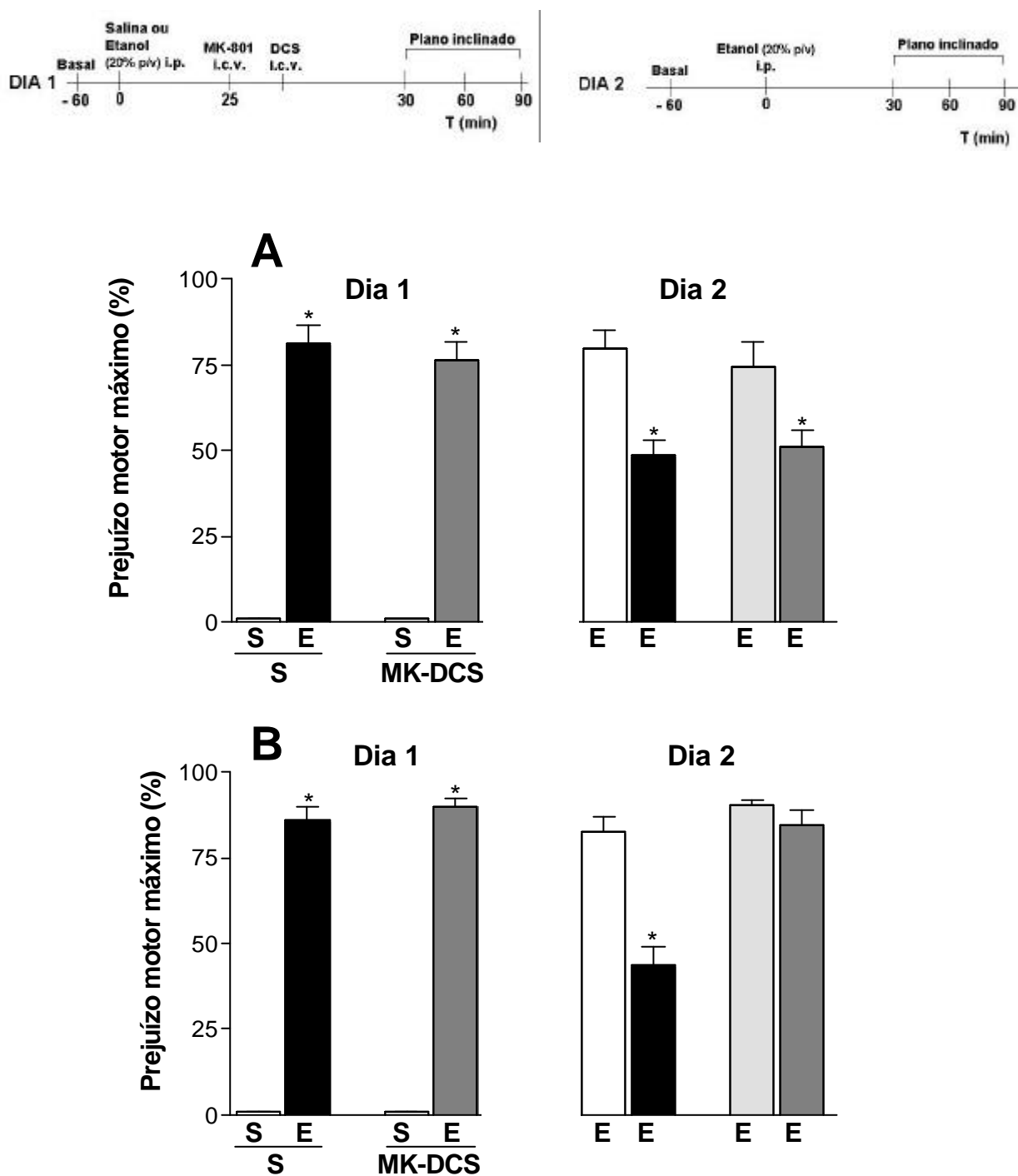


Figura 13: Efeito da interação de ⁽⁺⁾MK-801 (MK) nas doses de 1 nmol (painel A) ou 4 nmol (painel B) com 20 nmol de D-cicloserina (DCS) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam E (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da primeira injeção por via i.c.v, com salina (S) ou MK. Após esta última injeção, os animais receberam um segundo tratamento com salina ou DCS (i.c.v). A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os testes realizados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

Experimento 5: Influência da administração de ácido 7-cloro quinurênico (7-Cl) na facilitação da tolerância rápida ao etanol induzida por D-cicloserina (DCS), no modelo do plano inclinado.

Este experimento teve como objetivo testar o efeito do antagonista seletivo do sítio da glicina no receptor NMDA, ácido 7-cloro quinurênico, na facilitação da tolerância rápida ao etanol induzida pelo agonista parcial do mesmo sítio, DCS (20 nmol). Foram formados oito grupos de ratos, dos quais quatro receberam salina e os outros, etanol (2,7 g/Kg, 20% p/v) por via i.p. Decorridos 25 min, por via i.c.v, dois grupos receberam veículo e dois grupos, 7-Cl. Após este procedimento, um grupo veículo e um 7-Cl receberam salina (i.c.v.), e um grupo veículo e um 7-Cl receberam DCS (i.c.v.). A coordenação motora foi avaliada, e no dia 2, todos receberam a mesma dose de etanol e foram testados como no dia anterior.

Resultados

Os resultados referentes ao efeito da administração de ácido 7-cloro quinurênico na ausência e presença de DCS no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol estão ilustrados na Figura 14. Pode ser percebido que, ao contrário do que ocorreu com os animais tratados previamente com salina, os que receberam etanol manifestaram prejuízo motor no dia 1. Os tratamentos por via i.c.v. com 7-Cl, DCS e 7-Cl+DCS não afetaram a performance dos animais tratados previamente por via i.p. com salina ou etanol. A ANOVA de três vias demonstrou significância para o tratamento prévio i.p. [$F_{(1,72)} = 1595,917$; $p < 0,001$].

No dia 2, o resultado apresentado pelo grupo controle que recebeu etanol nos dois dias, sem administração de fármacos no dia 1, confirma o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora. A ANOVA demonstrou significativa o tratamento prévio i.p. [$F_{(1,72)} =$

32,901, $p < 0,001$]; o 1^o tratamento i.c.v. [$F_{(1,72)} = 17,508$, $p < 0,001$]; o 2^o tratamento i.c.v. [$F_{(1,72)} = 12,59$, $p < 0,001$]; a interação entre o tratamento prévio i.p. e o 1^o tratamento i.c.v. [$F_{(1,72)} = 6,797$, $p < 0,011$]. A interação entre o 1^o e o 2^o tratamento i.c.v. indicou: $F_{(1,72)} = 3,786$, $p < 0,055$.

A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou a facilitação de tolerância rápida ao etanol nos animais que receberam, como fármaco, no dia 1, apenas a DCS, bem como o bloqueio da tolerância rápida naqueles que receberam como fármaco apenas o 7-Cl. Além disso, os resultados obtidos demonstram que o 7-Cl também impediu a facilitação de tolerância rápida, induzida pela DCS.

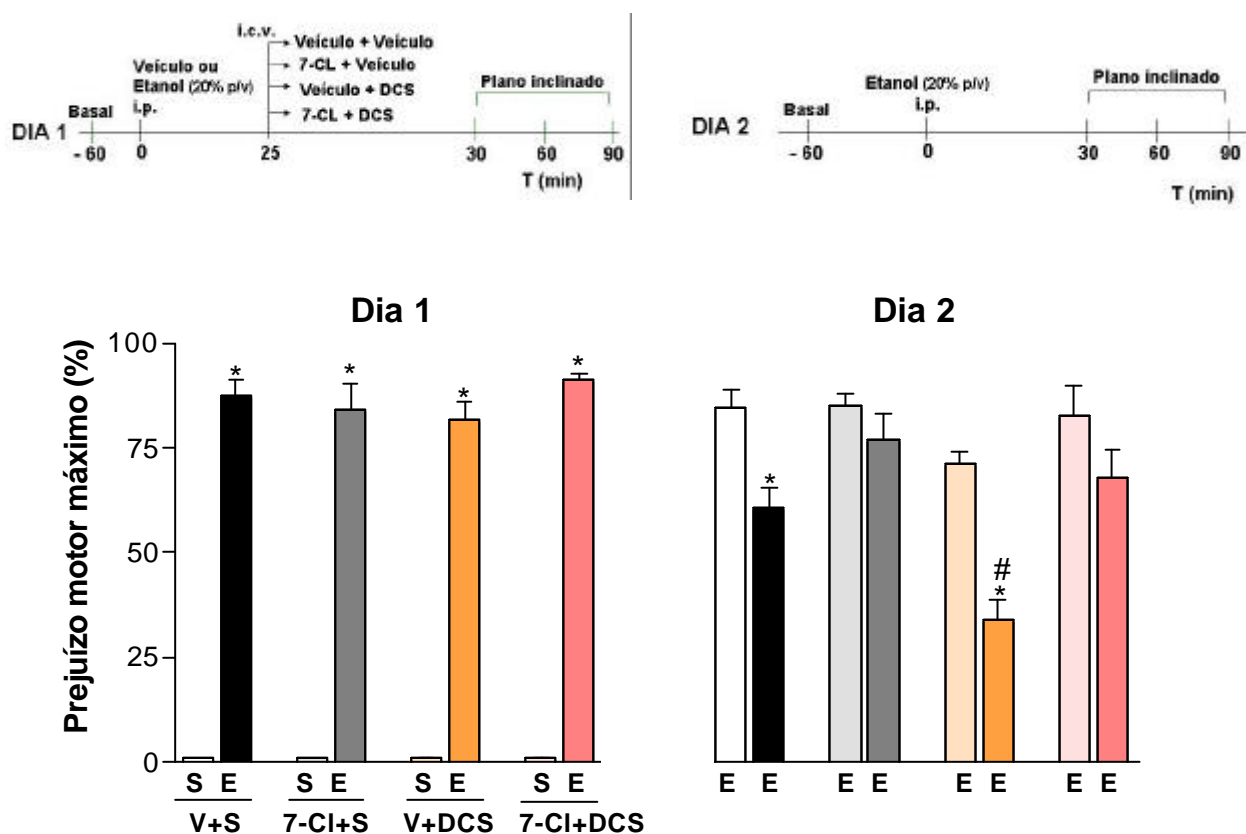


Figura 14: Efeito do ácido 7-cloro quinurênico (7-Cl) na dose de 40 nmol e de D-cicloserina (DCS) na dose de 20 nmol no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam E (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.) e após 25 min, por via i.c.v., veículo (V) ou 7-Cl. A seguir, foi administrado um segundo tratamento, também por via i.c.v., com salina ou DCS. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle que recebeu S (i.p.) no dia 1; # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle injetado com E nos 2 dias (ANOVA + Tukey).

Experimento 6: Efeito de 7-nitroindazol (7-NI) administrado por via i.p. sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no plano inclinado.

Considerando que a literatura demonstrou que inibidores não seletivos da NOS bloqueiam a tolerância rápida, este experimento teve como objetivo estudar se o efeito do inibidor preferencial da NOS neuronal, 7-NI, administrado por via i.p., afetaria o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Foram formados quatro grupos de ratos: A, B, C e D, sendo cada um dividido em dois, os quais receberam como tratamento prévio veículo ou 7-NI por via i.p. nas doses de 3 mg/Kg (Figura 15, painel A), 6 mg/Kg (Figura 15, painel B), 9 mg/Kg (Figura 15, painel C) ou 12 mg/Kg (Figura 15, painel D). Cada grupo foi dividido em dois novamente, e após 30 min, foram tratados por via i.p. com salina ou etanol (2,7 g/Kg). A coordenação motora foi avaliada em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as últimas injeções por via i.p. Após os testes, os animais retornaram às suas gaiolas moradia. No dia 2, todos receberam 2,7 g/Kg de etanol e foram testados como no dia 1.

Resultados

Os resultados referentes ao efeito de 7-NI administrado por via i.p. estão exibidos na Figura 15, painéis A, B, C e D, e apontam que os animais que receberam etanol (2,7 g/Kg) apresentaram prejuízo motor no dia 1. A ANOVA de duas vias demonstrou significância para o tratamento [Fig 15A: $F_{(1,24)} = 714,014$, $p < 0,001$; Fig 15B: $F_{(1,36)} = 1386,655$, $p < 0,001$; Fig 15C: $F_{(1,36)} = 1977,872$, $p < 0,001$; Fig 15D: $F_{(1,36)} = 783,755$, $p < 0,001$]. O tratamento prévio por via i.p., com 7-NI, não afetou o desempenho dos animais tratados com salina ou etanol.

No dia 2, o resultado apresentado pelo grupo controle que recebeu etanol, nos dois dias, confirma o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora. Houve significância para o efeito do tratamento prévio [Fig 15C: $F_{(1,36)} = 17,123$, $p < 0,001$]; para o efeito do tratamento [Fig 15A: $F_{(1,24)} = 75,309$, $p < 0,001$; Fig 15B: $F_{(1,36)} = 52,604$, $p < 0,001$];

Fig 15C: $F_{(1,36)} = 96,338$, $p < 0,001$; Fig 15D: $F_{(1,36)} = 13,776$, $p < 0,001$]; e para a interação entre o tratamento prévio e o tratamento [Fig 15C: $F_{(1,36)} = 26,667$, $p < 0,001$; Fig 15D: $F_{(1,36)} = 13,448$, $p < 0,001$]. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que a dose de 12 mg/Kg de 7-NI bloqueou a tolerância rápida ao etanol.

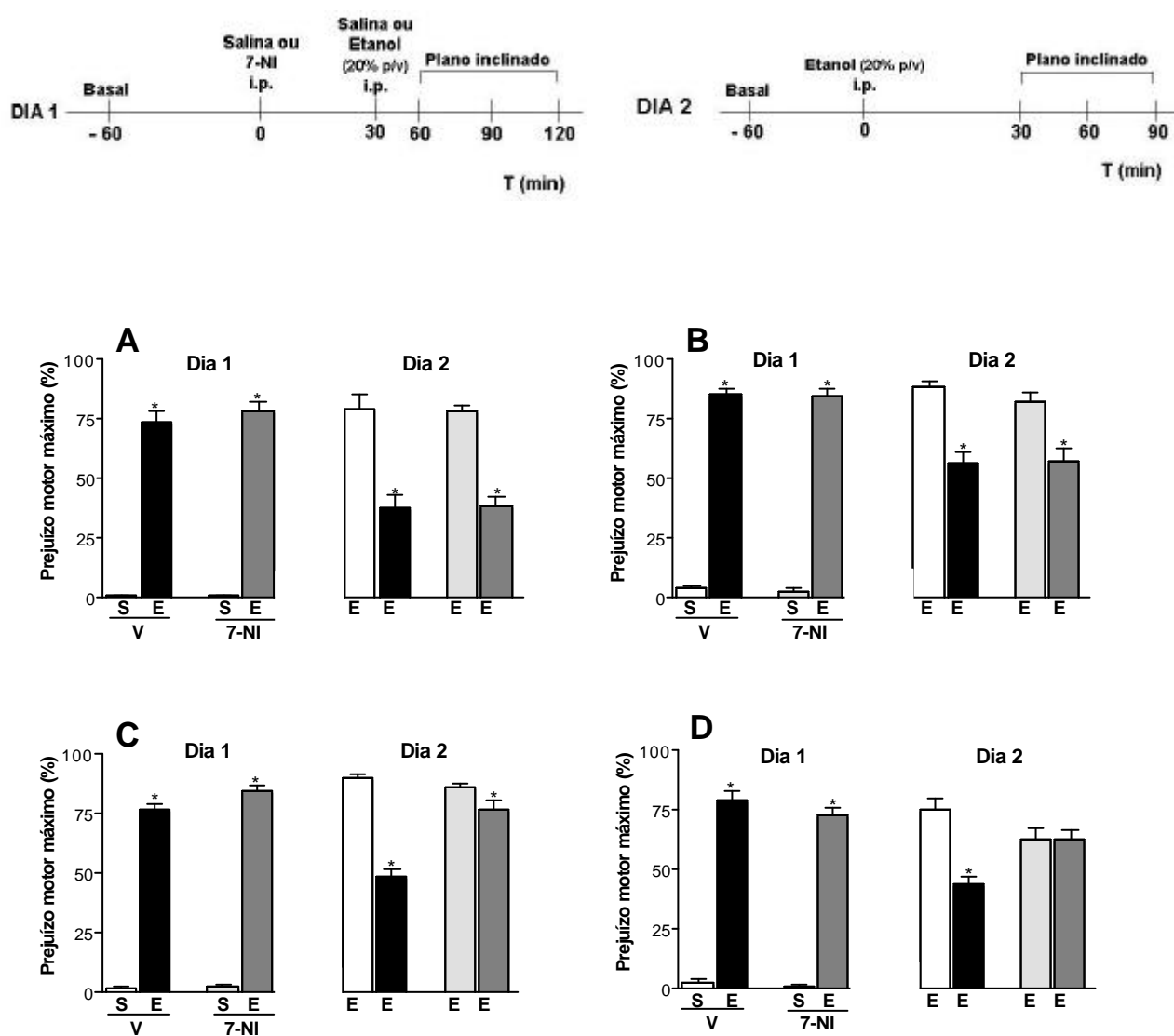


Figura 15: Efeito da administração por **via i.p.** de **7-nitroindazol (7-NI)** nas doses de: **3 mg/Kg** (painel A), **6 mg/Kg** (painel B); **9 mg/Kg** (painel C) e de **12 mg/Kg** (painel D) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos foram previamente tratados com salina (S, i.p.) ou com 7-NI (i.p.), 30 min antes da administração de S ou E (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.). A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções com S ou E. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 7 (painel A) e 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

Experimento 7: Efeito da administração prévia, por via i.p., de L-arginina (L-Arg) ou D-arginina (D-Arg) sobre o bloqueio de tolerância rápida ao etanol pelo 7-NI (i.p.), no plano inclinado.

Para investigar se o precursor de NO, L-Arg (figura 16, painel A), e seu enantiômero inativo, D-Arg (figura 16, painel B), interfeririam no bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo 7-NI, foram formados dois grupos de ratos: A e B. Cada grupo foi subdividido em dois e recebeu salina ou 200 mg/Kg de L-Arg ou D-Arg (i.p.). Foi realizada uma nova divisão e os ratos foram tratados 15 min após com veículo ou 7-NI (12 mg/Kg, i.p.). Transcorridos 30 min após este último procedimento, a metade de cada grupo recebeu um segundo tratamento com salina ou etanol (2,7 g/Kg, i.p.). Em condições basais e após 30, 60 e 90 min do último tratamento, os animais foram avaliados no plano inclinado, retornando posteriormente às suas gaiolas moradia. No dia 2, todos receberam a mesma dose de etanol e foram testados como no dia anterior.

Resultados

Na Figura 16, estão representados os resultados referentes ao tratamento com 7-NI, na ausência e presença de L-Arg (painel A) e D-Arg (painel B) administrados por via i.p., e testados no plano inclinado.

Como esperado, os animais que receberam etanol apresentaram prejuízo motor no dia 1, comparados aos controles. A ANOVA de três vias demonstrou significância para o 2^o tratamento [Fig 16A: $F_{(1,72)} = 6309,687$, $p < 0,001$; Fig 16B: $F_{(1,72)} = 2550,08$, $p < 0,001$]. O tratamento prévio com L-Arg ou D-Arg e/ou o tratamento com 7-NI não afetaram a performance dos animais tratados com salina ou etanol.

No dia 2, os resultados apresentados pelos grupos controles que receberam etanol nos dois dias (sem fármacos no dia 1) confirmam o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora. A ANOVA mostrou efeito significativo para os fatores: tratamento prévio [Fig A: $F_{(1,72)} = 16,131$, $p < 0,001$]; 1^o tratamento [Fig A: $F_{(1,72)} = 20,989$, $p < 0,001$; Fig B: $F_{(1,72)} = 35,986$, $p < 0,001$]; 2^o tratamento [Fig A: $F_{(1,72)} = 167,792$, $p < 0,001$; Fig B: $F_{(1,72)} = 26,272$, $p < 0,001$]; a interação entre o tratamento prévio e o 1^o tratamento [Fig A: $F_{(1,72)} = 28,474$, $p < 0,001$]; a interação entre o tratamento prévio e o 2^o tratamento [Fig A: $F_{(1,72)} = 16,743$, $p < 0,001$]; a interação entre o 1^o tratamento e o 2^o tratamento [Fig A: $F_{(1,72)} = 14,076$, $p < 0,001$; Fig B: $F_{(1,72)} = 35,599$, $p < 0,001$]; e a interação entre o tratamento prévio e o 1^o e o 2^o tratamento [Fig A: $F_{(1,72)} = 20,993$, $p < 0,001$].

A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com L-Arg reverteu o bloqueio de 7-NI sobre a tolerância rápida. O mesmo não ocorreu quando L-Arg foi substituído por D-Arg. Os tratamentos prévios com L-Arg ou D-Arg, na ausência de 7-NI, não interferiram no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

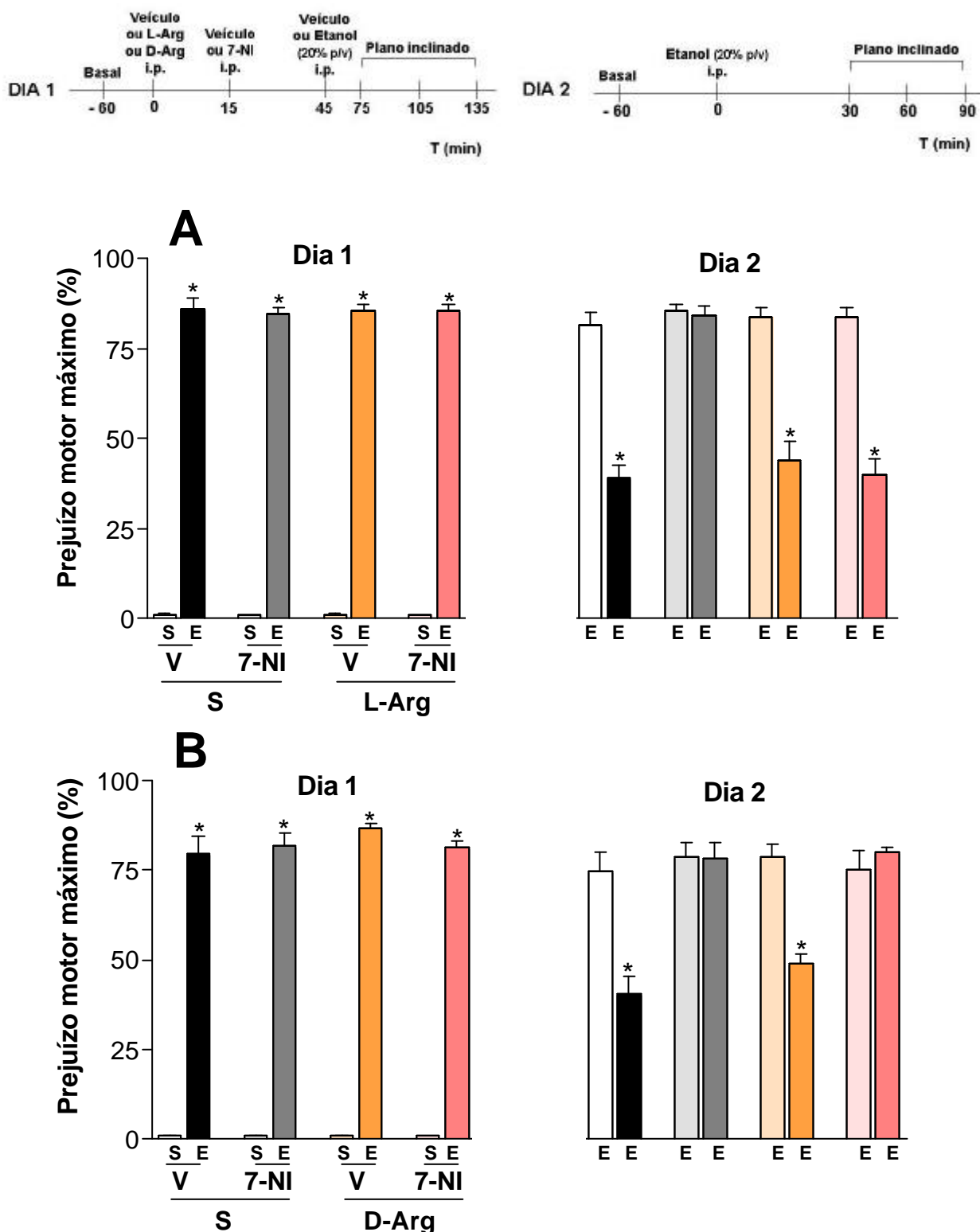


Figura 16: Efeito da administração, por via i.p., de 200 mg/Kg de: L-arginina (L-Arg, painel A) ou D-arginina (D-Arg, painel B), sobre o bloqueio de 12 mg/Kg de 7-NI, via i.p., no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E) no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam L-Arg (painel A), D-Arg (painel B) ou salina (S), 15 min antes de 7-NI, ou de veículo (V). Decorridos 30 min, todos os animais receberam E (2,7 g/kg, 20% p/v, i.p.) ou S. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as últimas injeções. No dia 2, todos os grupos receberam apenas E, sendo testados como no dia anterior. Os resultados são demonstrados como as médias \pm EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

Experimento 8: Efeito da administração, por via i.c.v., de L-Arg , D-Arg e 7-NI na tolerância rápida ao etanol, no plano inclinado.

Com o intuito de verificar a ação dos fármacos anteriormente administrados por via i.p., foram desenvolvidos experimentos testando, por injeção i.c.v., a ação de 7-NI (40 nmol), L-Arg (600 nmol), e D-Arg (600 nmol), representados, respectivamente, nos painéis A e B da Figura 17.

No dia 1, foram formados dezesseis grupos de ratos, os quais receberam salina ou etanol (2,7 g/Kg, 20% p/v) por via i.p. Decorridos 25 min, dois grupos de cada receberam, por via i.c.v.: veículo; veículo + 7-NI; e um grupo de cada (salina e etanol) recebeu: L-Arg + veículo; L-Arg + 7-NI ; D-Arg + veículo; D-Arg + 7-NI. A coordenação motora foi avaliada, e no dia 2, todos receberam a mesma dose de etanol e foram testados como no dia anterior.

Resultados

Na Figura 17, estão representados os resultados referentes ao tratamento com 7-NI, na ausência e presença de L-Arg (painel A) e D-Arg (painel B), administrados por via i.c.v. e testados no plano inclinado.

Como esperado, os animais que receberam etanol apresentaram prejuízo motor no dia 1, comparados aos controles. A ANOVA de três vias demonstrou significância para o tratamento prévio i.p. [Fig 17A: $F_{(1,56)} = 1661,302$, $p < 0,001$; Fig 17B: $F_{(1,48)} = 1407,089$, $p < 0,001$]. O tratamento com 7-NI, associado ou não com L-Arg ou com D-Arg, no dia 1, não afetou a performance dos animais que receberam salina ou etanol.

No dia 2, o resultado exibido pelo grupo controle que recebeu etanol nos dois dias (sem fármacos no dia 1) confirma o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora.

A ANOVA mostrou efeito significativo para os fatores: tratamento prévio i.p. [Fig 17A: $F_{(1,56)} = 43,239$, $p < 0,001$; Fig 17B: $F_{(1,48)} = 12,804$, $p < 0,001$]; 1^o tratamento i.c.v. [Fig 17A: $F_{(1,56)} = 4,074$, $p < 0,048$]; 2^o tratamento i.c.v. [Fig 17B: $F_{(1,48)} = 6,764$, $p < 0,012$]; interação entre o tratamento prévio i.p. e o 1^o tratamento i.c.v. [Fig 17A: $F_{(1,56)} = 5,456$, $p < 0,023$]; interação entre o tratamento prévio i.p. e o 2^o tratamento i.c.v. [Fig 17B: $F_{(1,48)} = 12,356$, $p < 0,001$]; interação entre o 1^o e o 2^o tratamento i.c.v. [Fig 17A: $F_{(1,56)} = 7,34$, $p < 0,001$]; e a interação entre o tratamento prévio i.p. com o 1^o e o 2^o tratamento i.c.v. [Fig 17A: $F_{(1,56)} = 9,170$, $p < 0,005$].

A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento com L-Arg reverteu o bloqueio de 7-NI sobre a tolerância rápida. Os tratamentos com L-Arg ou D-Arg, na ausência de 7-NI, não interferiram no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

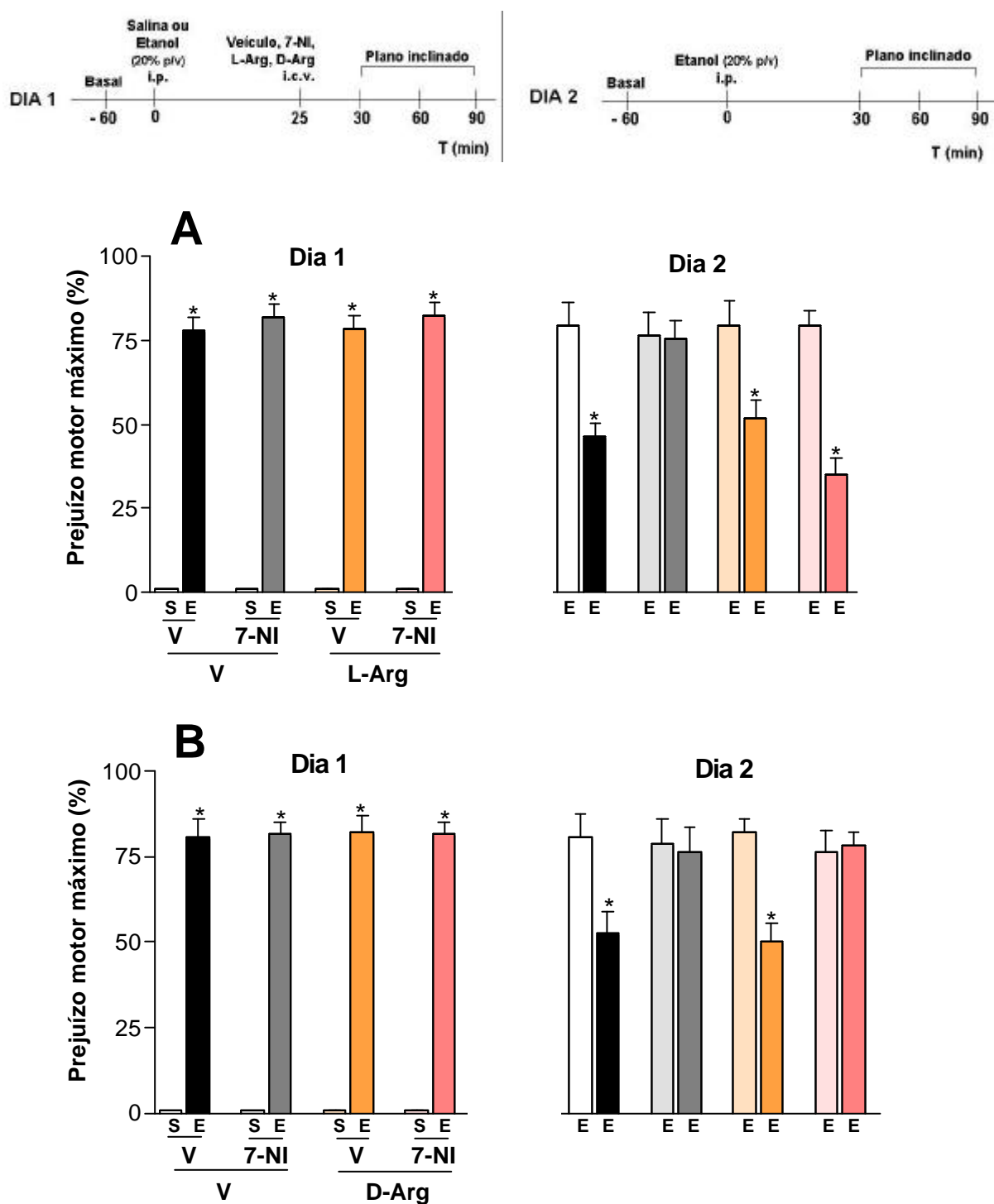


Figura 17: Efeito da administração, por via *i.c.v.*, de **600 nmol** de **L-arginina (L-Arg, painel A)** ou de **D-arginina (D-Arg, painel B)** e de **40 nmol** de **7-NI** sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam E (2,7 g/Kg, 20% p/v, *i.p.*) ou salina (S, *i.p.*), 25 min antes das injeções *i.c.v.* com veículo (V) ou V + 7-NI, ou V + L-Arg ou L-Arg + 7-NI, ou V + D-Arg, ou D-Arg + 7-NI. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via *i.p.* No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados representam as médias \pm EPM de 7 (painel B) e 8 (painel A) animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (*i.p.*) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

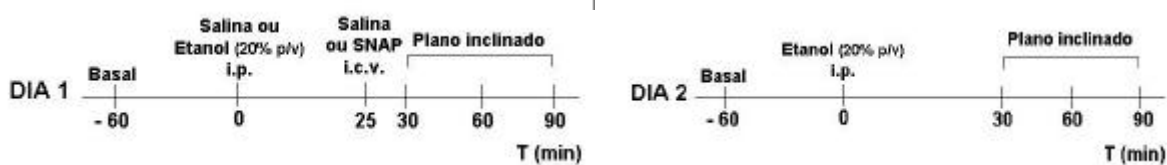
Experimento 9: Efeito de SNAP sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no plano inclinado.

Este experimento objetivou analisar o efeito do doador de NO, SNAP, via i.c.v., nas doses de 40 nmol (Figura 18, painel A) e de 80 nmol (Figura 18, painel B) sobre a tolerância rápida ao etanol. Foram formados dois grupos de ratos: A e B, os quais foram subdivididos em dois e receberam salina ou etanol (2,7 g/Kg, i.p.). Cada grupo foi dividido novamente e recebeu, após 25 min, por via i.c.v., salina ou SNAP (40 ou 80 nmol). A coordenação motora foi avaliada, e no dia 2, todos receberam a mesma dose de etanol e foram testados como no dia anterior.

Resultados

Os resultados referentes aos efeitos de SNAP 40 nmol (figura 18, painel A) e 80 nmol (Figura 18, painel B) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol revelaram que os ratos tratados com etanol mostraram a esperada incoordenação motora no dia 1. Houve significância para o efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 18A: $F_{(1,24)} = 670,073$, $p < 0,001$; Fig 18B: $F_{(1,28)} = 2589,748$, $p < 0,001$]. O tratamento i.c.v. com o referido fármaco não interferiu no desempenho dos animais que receberam salina ou etanol no dia 1.

No dia 2, o grupo controle que recebeu etanol nos dois dias demonstrou tolerância à incoordenação motora. A ANOVA de duas vias apresentou significância para o tratamento prévio i.p. [Fig 18A: $F_{(1,24)} = 34,808$, $p < 0,001$; Fig 18B: $F_{(1,28)} = 26,159$, $p < 0,001$]. O tratamento com 40 ou 80 nmol de SNAP não interferiu na tolerância rápida ao etanol.



A

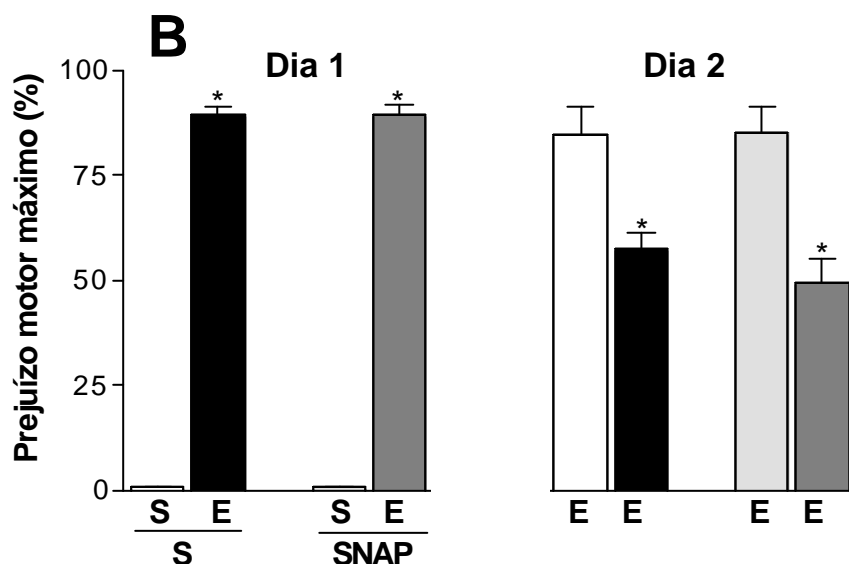
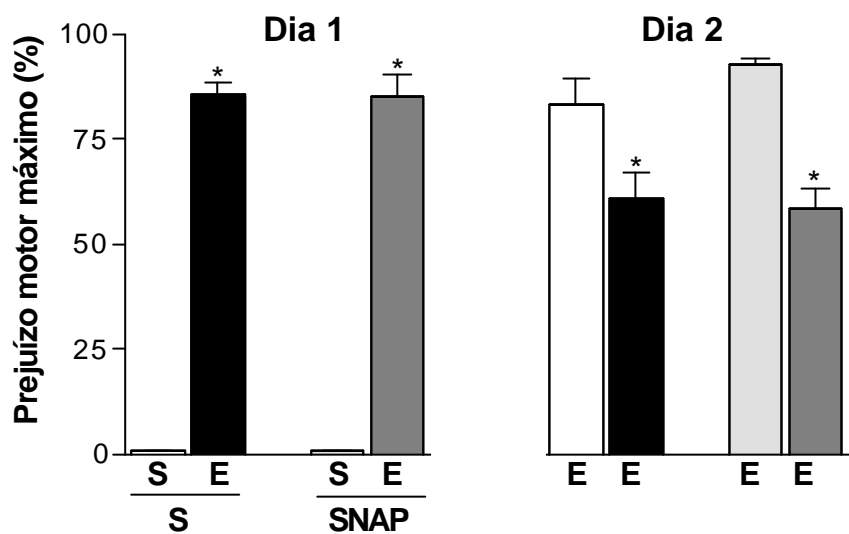


Figura 18: Efeito de SNAP nas doses de 40 nmol (painel A) e 80 nmol (painel B) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam E (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção, via i.c.v., com salina (S) ou SNAP. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 6-8 (painel A) e 6-10 (painel B) animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

Experimento 10: Efeito do nitroprussiato de sódio sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no plano inclinado.

Para investigar o efeito do gerador de NO, nitroprussiato de sódio (NPS), foram utilizadas as doses de 40 nmol e 80 nmol injetadas após a administração de 2,7 e 2,3 g/Kg de etanol por via i.p.

Para cada dose de etanol testada neste experimento (2,7 ou 2,3 g/Kg, i.p.), os animais foram divididos em grupos A e B que receberam salina ou etanol. Cada grupo foi subdividido recebendo, decorridos 25 min, por via i.c.v., salina ou NPS nas doses de 40 ou 80 nmol. A coordenação motora dos animais foi avaliada, e no dia 2, todos os animais receberam a mesma dose de etanol e foram testados como no dia anterior.

Resultados

A Figura 19 apresenta o efeito de 40 nmol (painel A) e 80 nmol (painel B) de NPS após a administração prévia de 2,7 g/Kg de etanol.

Como esperado, os ratos tratados previamente com etanol mostraram um prejuízo motor no dia 1 que não ocorreu com os que receberam salina. A ANOVA de duas vias demonstrou efeito para o tratamento prévio i.p. [Fig 19A: $F_{(1,28)} = 1979,653$, $p < 0,001$, Fig 19B: $F_{(1,24)} = 1568,418$, $p < 0,001$]. O tratamento com 40 ou 80 nmol de NPS não interferiu na performance dos animais que receberam salina ou etanol no dia 1.

No dia 2, os grupos que receberam etanol em ambos os dias do experimento, sem qualquer outro tratamento, como esperado, manifestaram uma redução significativa do prejuízo motor, com valores em torno de 55%, salientando o desenvolvimento da tolerância rápida. Além disso, o grupo tratado com etanol nos dois dias e com 40 nmol de NPS no dia 1

revelou um prejuízo motor de 31%. Houve significância do tratamento prévio i.p. [Fig 19A: $F_{(1,28)} = 47,183$, $p < 0,001$; Fig 19B: $F_{(1,24)} = 21,908$, $p < 0,001$]; tratamento i.c.v. [Fig 19A: $F_{(1,28)} = 5,302$, $p < 0,028$]; e da interação entre o tratamento prévio i.p. e o tratamento i.c.v. [Fig 19A: $F_{(1,28)} = 4,261$, $p < 0,048$]. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) sustentou que o tratamento com 40 nmol de NPS facilitou o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol.

A Figura 20 apresenta o efeito de 40 nmol (painel A) e 80 nmol (painel B) de NPS após a administração prévia da dose não efetiva em promover o desenvolvimento da tolerância rápida, de 2,3 g/Kg de etanol.

A ANOVA indicou efeito para o tratamento prévio i.p. [Fig 20A: $F_{(1,36)} = 84,296$, $p < 0,001$, Fig 20B: $F_{(1,36)} = 42,359$, $p < 0,001$]. O tratamento com NPS não interferiu no desempenho dos ratos que receberam salina ou etanol no dia 1.

No dia 2, os grupos que receberam etanol em ambos os dias do experimento, sem qualquer outro tratamento, evidenciaram um prejuízo motor em torno de 20%, enquanto que o grupo tratado com etanol nos dois dias e com 80 nmol de NPS no dia 1 apresentou um prejuízo motor de 11%. A ANOVA mostrou significância apenas para o tratamento prévio i.p. [Fig 20A: $F_{(1,36)} = 5,451$, $p < 0,025$; Fig 20B: $F_{(1,36)} = 9,947$, $p < 0,005$].

Após o tratamento prévio com 2,3 g/Kg de etanol, o tratamento com NPS não interferiu na tolerância rápida ao etanol. No entanto, a maior diferença no prejuízo motor, no segundo dia dos testes, entre os dois grupos tratados com 80 nmol de NPS (painel B) no dia 1, pode reforçar a hipótese de que o NO interfira nos efeitos referentes à tolerância rápida ao etanol.

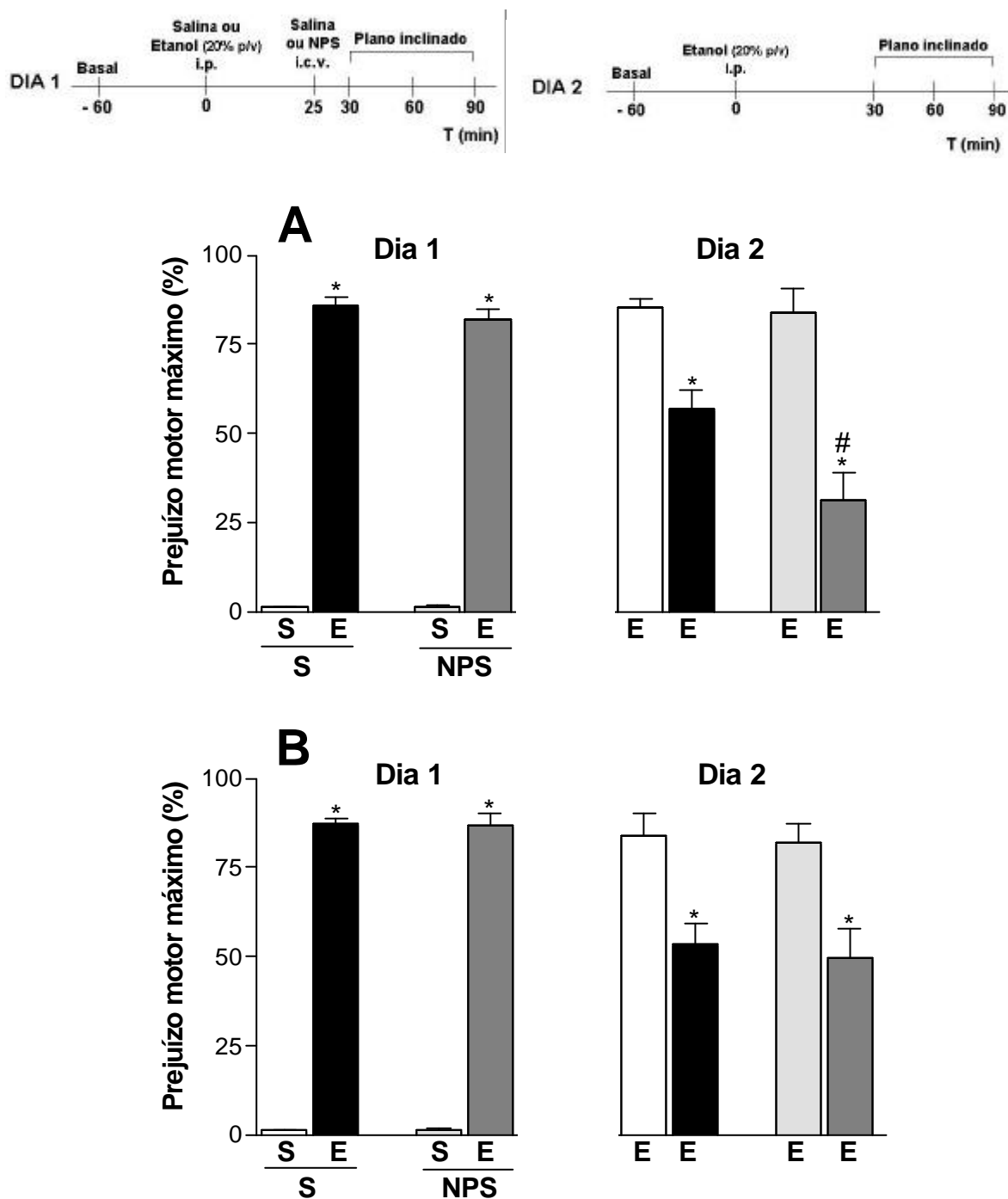


Figura 19: Efeito de **nitroprussiato de sódio (NPS)** nas doses de **40 nmol** (painel **A**) e **80 nmol** (painel **B**) no desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam **E** na dose de **2,7 g/Kg** (20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v. com salina (S) ou NPS. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 8 (painel A) e 6-8 (painel B) animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1; # $p < 0,05$ comparado aos injetados com E nos 2 dias (ANOVA + Tukey).

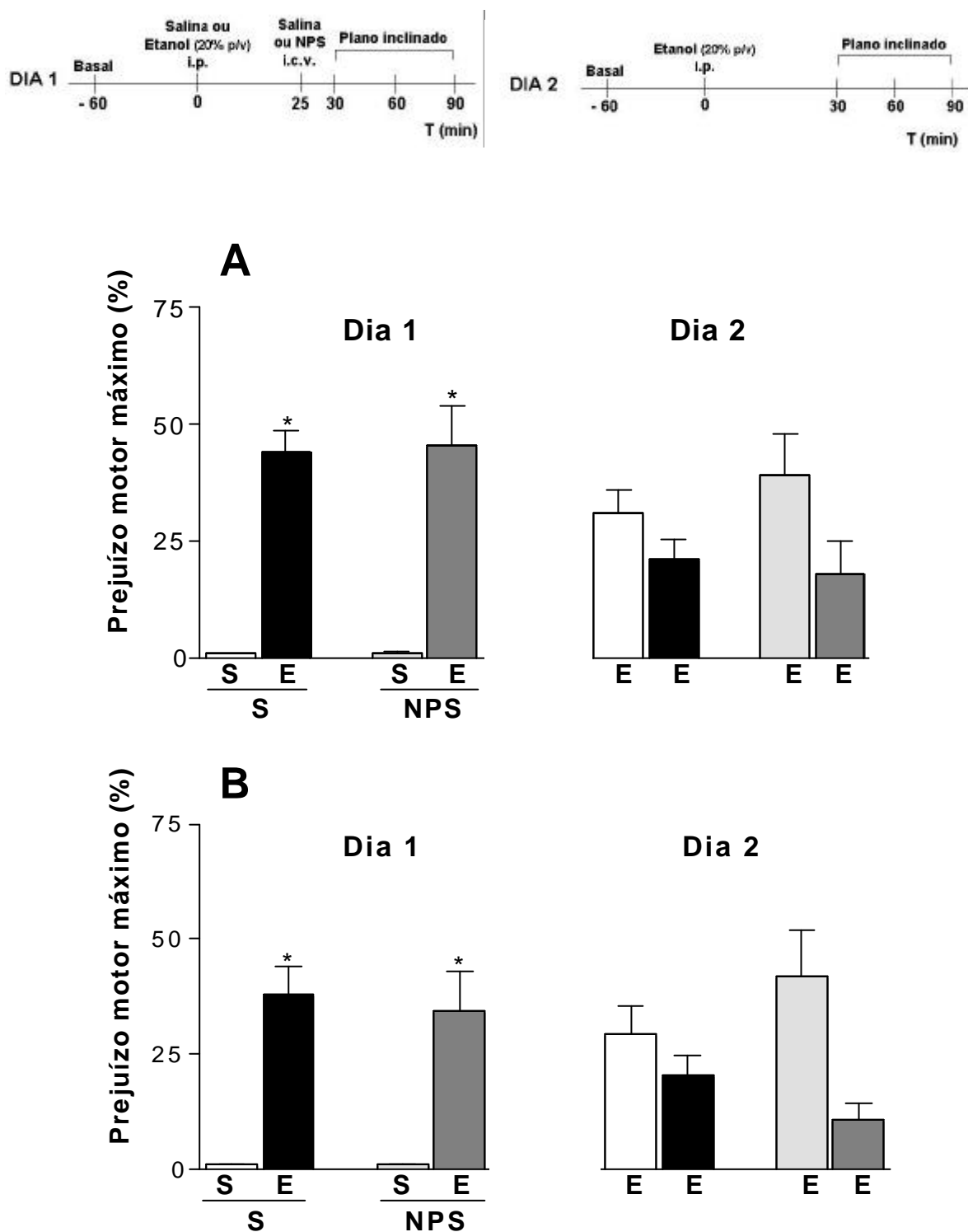


Figura 20: Efeito do **nitroprussiato de sódio (NPS)** nas doses de **40 nmol** (painel **A**) e **80 nmol** (painel **B**) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam **E** na dose de **2,3 g/Kg** (20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v. com salina (S) ou NPS. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

Experimento 11: Efeito de inibidores da guanilato ciclase solúvel sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no plano inclinado.

Para investigar o efeito dos inibidores da guanilato ciclase solúvel: azul de metileno, seu derivado LY83583 e de NS2028 e ODQ, foram formados grupos de ratos que receberam salina ou etanol (2,7 g/Kg, i.p.). Cada grupo foi dividido e recebeu, decorridos 25 min, por via i.c.v., salina ou veículo e 30 nmol de azul de metileno (Figura 21, painel A), ou 10 nmol de LY83583 (Figura 21, painel B), ou 10 nmol de NS2028 (Figura 22, painel A), ou 1 nmol de ODQ (Figura 22, painel B). A coordenação motora foi avaliada, e no dia 2, todos receberam a mesma dose de etanol e foram testados como no dia anterior.

Resultados

Os resultados referentes aos efeitos de azul de metileno (Figura 21, painel A), LY83583 (Figura 21, painel B), NS2028 (Figura 22, painel A), ODQ (Figura 22, painel B) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol demonstraram que os animais tratados previamente com etanol revelaram prejuízo motor no dia 1. A ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo do tratamento prévio i.p. [Fig 21A: $F_{(1,24)} = 480,877$, $p < 0,001$; Fig 21B: $F_{(1,28)} = 1312,909$, $p < 0,001$; Fig 22A: $F_{(1,28)} = 776,210$, $p < 0,001$; Fig 22B: $F_{(1,24)} = 847,732$, $p < 0,001$]. O tratamento i.c.v. com os inibidores da guanilato ciclase solúvel não afetou o desempenho dos animais que receberam salina ou etanol no dia 1.

No dia 2, os resultados apresentados pelos grupos controles que receberam etanol nos dois dias confirmam o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora. A ANOVA mostrou significância para efeito do tratamento prévio i.p. [Fig 21A: $F_{(1,24)} = 14,419$,

$p < 0,001$; Fig 21B: $F_{(1,28)} = 13,053$, $p < 0,001$; Fig 22A: $F_{(1,28)} = 9,697$, $p < 0,004$; Fig 22B: $F_{(1,24)} = 8,176$, $p < 0,001$]; do tratamento i.c.v. [Fig 21A: $F_{(1,24)} = 11,054$, $p < 0,003$; Fig 21B: $F_{(1,28)} = 20,573$, $p < 0,001$; Fig 22A: $F_{(1,28)} = 6,058$, $p < 0,020$]; a interação entre o tratamento prévio i.p. e o tratamento i.c.v. [Fig 21A: $F_{(1,24)} = 6,981$, $p < 0,014$; Fig 21B: $F_{(1,28)} = 6,934$, $p < 0,014$; Fig 22A: $F_{(1,28)} = 9,066$, $p < 0,005$; Fig 22B: $F_{(1,24)} = 4,513$, $p < 0,044$]. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que os tratamentos com os inibidores da guanilato ciclase solúvel bloquearam a tolerância rápida ao etanol.

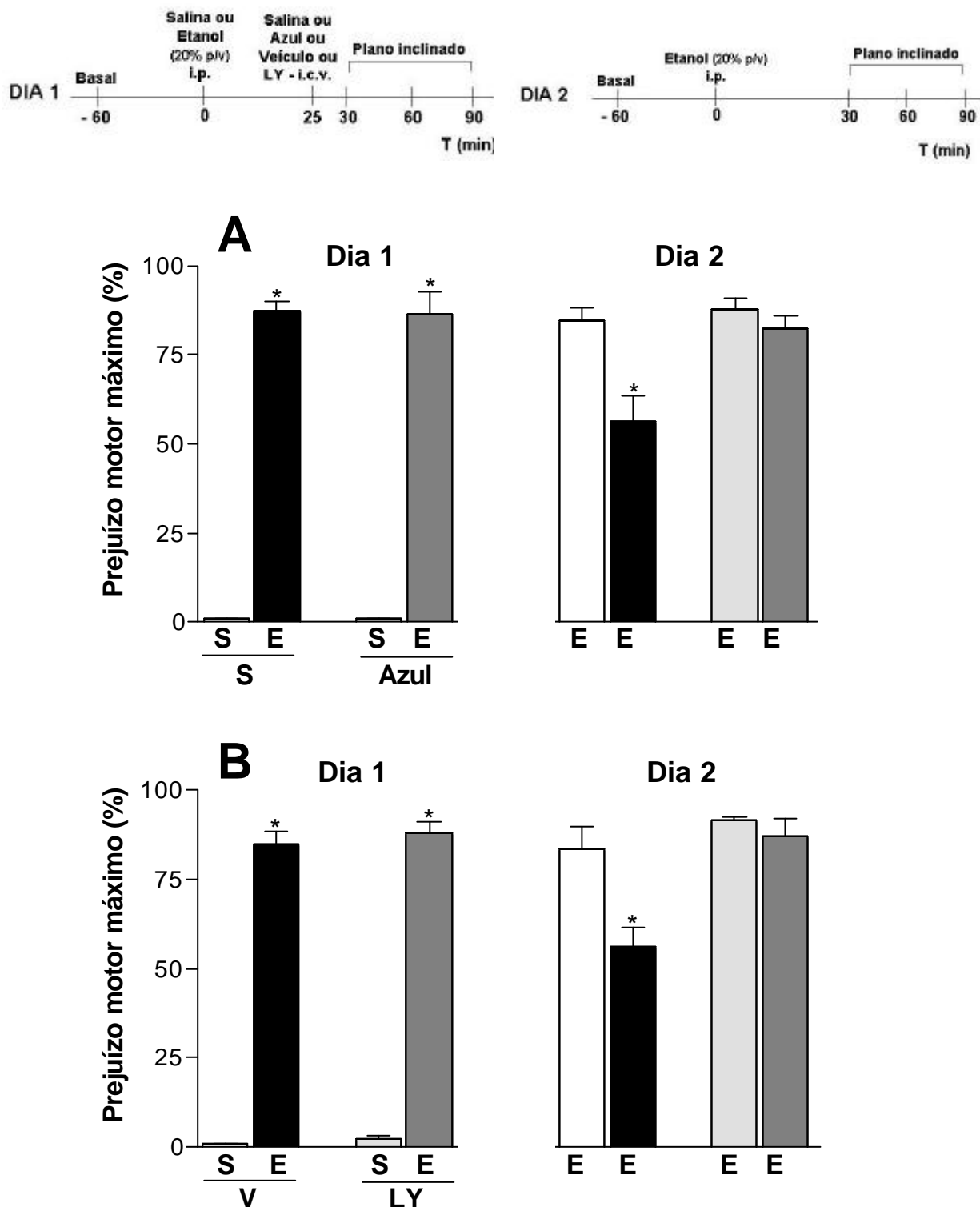


Figura 21: Efeito de 30 nmol de azul de metileno (Azul, painel A) e de 10 nmol de LY83583 (LY, painel B) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam E (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v. com S, ou azul, ou veículo (V), ou LY. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 6-8 (painel A) e 6-10 (painel B) animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

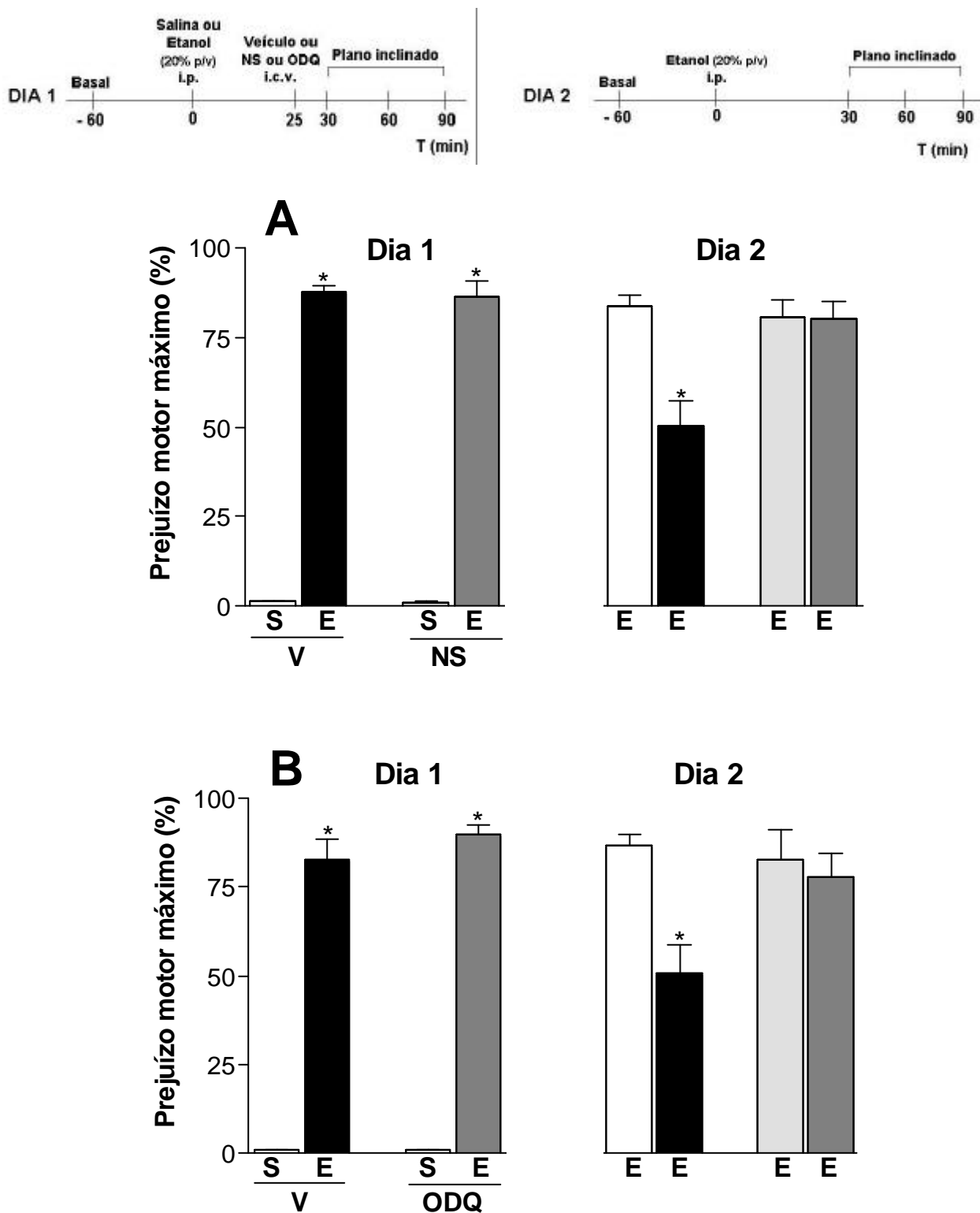


Figura 22: Efeito de 10 nmol de NS2028 (NS, painel A) e de 1 nmol de ODQ (painel B) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam E (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v. com veículo (V), ou NS, ou ODQ. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 6-10 (painel A) e 6-8 (painel B) animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

Experimento 12: Efeito de 8-Bromo-GMPc sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no plano inclinado.

Neste ensaio foi avaliado o efeito do análogo de GMPc, 8-Bromo-GMPc (8-Br-GMPc), nas doses de 40 nmol (figura 23, painel A) e 80 nmol (figura 23, painel B), na tolerância rápida ao etanol. Foram formados os grupos de ratos, que receberam salina ou etanol (2,7 g/Kg,) por via i.p. Cada grupo foi dividido novamente e recebeu, transcorridos 25 min, por via i.c.v., salina ou 8- Br-GMPc (40 nmol, painel A, ou 80 nmol, painel B). A coordenação motora foi avaliada, e no dia 2, todos receberam a mesma dose de etanol e foram testados como no dia anterior.

Resultados

Os resultados pertinentes aos efeitos de 40 e 80 nmol de 8-Br-GMPc (Figura 23, painel A e B, respectivamente) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol indicam que os ratos tratados previamente com etanol manifestaram prejuízo motor no dia 1. A ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo para o tratamento prévio i.p. [Fig 23A: $F_{(1,28)} = 4077,914$, $p < 0,001$, Fig 23B: $F_{(1,28)} = 1001,620$, $p < 0,001$]. O tratamento com 40 ou 80 nmol de 8-Br-GMPc não interferiu na performance dos animais que receberam salina ou etanol no dia 1.

No dia 2, os grupos controles, que receberam etanol nos dois dias do teste, demonstraram o desenvolvimento da tolerância rápida. A ANOVA indicou significância no dia 2 para os fatores: tratamento prévio i.p. [Fig 23A: $F_{(1,28)} = 95,028$, $p < 0,001$; Fig 23B: $F_{(1,28)} = 59,683$, $p < 0,001$]; tratamento i.c.v. [Fig 23B: $F_{(1,28)} = 4,294$, $p < 0,047$]; e a interação entre o tratamento prévio i.p. e o tratamento i.c.v. [Fig 23B: $F_{(1,28)} = 5,39$, $p < 0,027$]. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) comprovou que o tratamento com 80 nmol de 8-Br-GMPc

facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, enquanto que a dose de 40 nmol não interferiu nos resultados em relação ao grupo controle tratado com etanol nos dois dias dos testes.

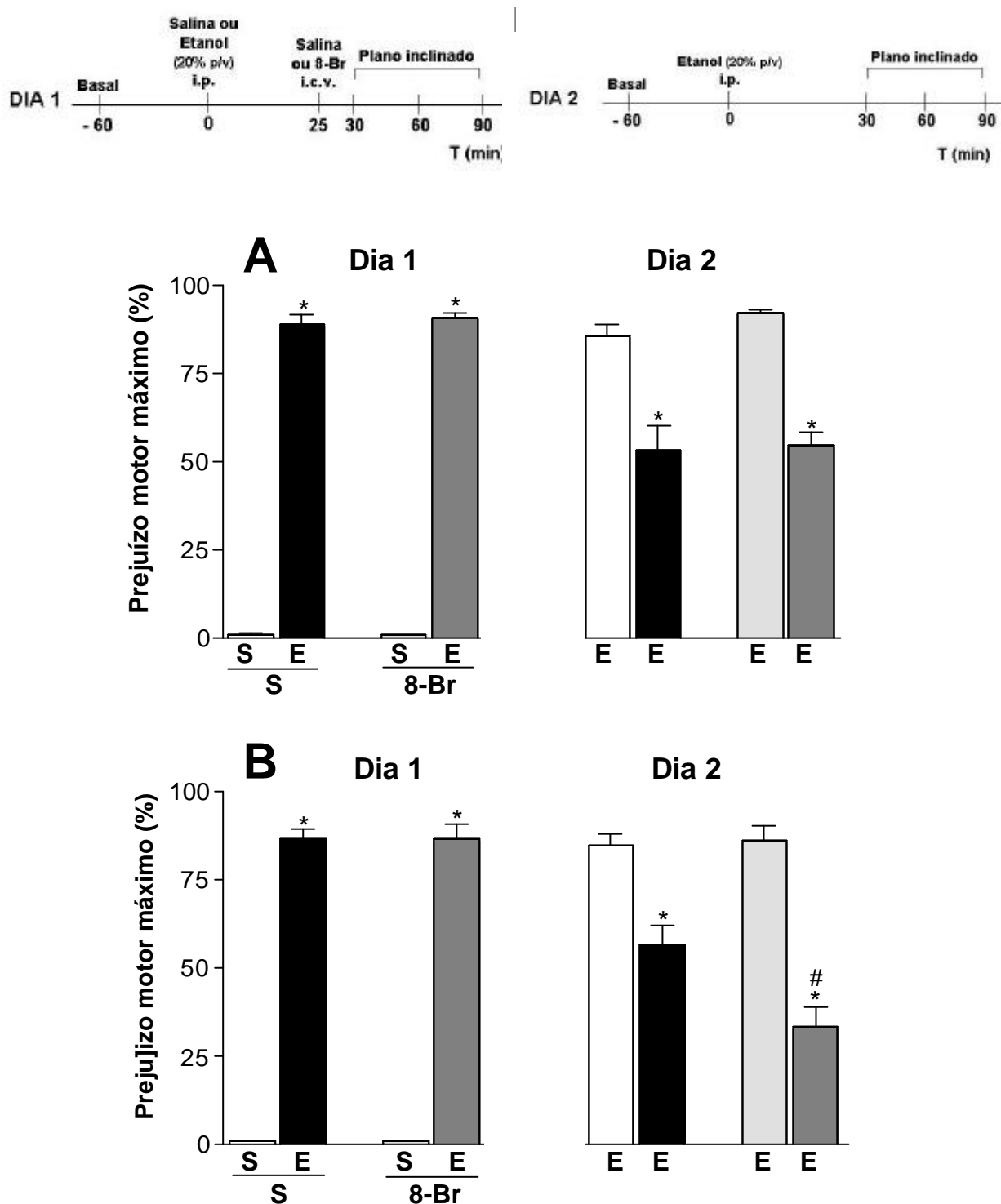


Figura 23: Efeito de 8-Br-GMPc (8-Br) nas doses de 40 nmol (painel A) e 80 nmol (painel B) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste do plano inclinado. No dia 1, os ratos receberam E (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v. com salina (S) ou 8-Br. A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 6-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1; # $p < 0,05$ comparado aos injetados com E nos 2 dias (ANOVA + Tukey).

TEMPERATURA

Experimento 13: Indução da tolerância rápida ao etanol com a utilização de doses únicas no teste da temperatura corporal.

Pelos mesmos motivos referidos na padronização de doses para avaliar a coordenação motora dos animais, este experimento teve como objetivo verificar a tolerância rápida ao efeito hipotérmico, com uma dose única de etanol no dia 1. Os ratos previamente habituados com a sonda do termômetro digital foram divididos em dois grupos, A e B. No dia 1, cada grupo foi dividido novamente, sendo que dois grupos receberam salina i.p. e os outros dois grupos, a dose de 4 g/Kg (20% p/v) i.p. de etanol. Foi avaliada a temperatura corporal dos animais, em condições basais, e aos 30, 60 e 90 min depois das injeções. Após os testes, os animais retornaram às suas gaiolas moradia. No dia 2, dois grupos receberam a dose de 2,3 g/Kg (20% p/v) via i.p e os outros dois, a de 2,5 g/Kg (20% p/v, i.p) de etanol, sendo avaliados como no dia anterior.

Graficamente, foi registrada a diferença máxima da temperatura em relação ao basal, em graus Celsius, obtida pela maior variação aos 30, 60 e 90 min. Tipicamente, esta maior diferença ocorria aos 60 min, após as injeções por via i.p., no dia 2 (Figura 26).

Resultados

Os resultados destes experimentos estão representados na Figura 24 (painéis A e B) e indicam que os animais tratados com etanol (4 g/Kg) no dia 1 apresentaram hipotermia significativa em relação aos grupos tratados com salina. No dia 2, os grupos que receberam etanol nas doses de 2,3 g/Kg (A) [$t_{(1,16)} = 3,13$, $p < 0,006$] e de 2,5 g/Kg (B) [$t_{(1,16)} = 2,483$, $p < 0,024$] desenvolveram tolerância rápida à hipotermia.

Para avaliar a tolerância rápida à hipotermia dos experimentos posteriores deste trabalho, foi escolhida a dose de 2,3 g/Kg para o dia 2 (Figura 25).

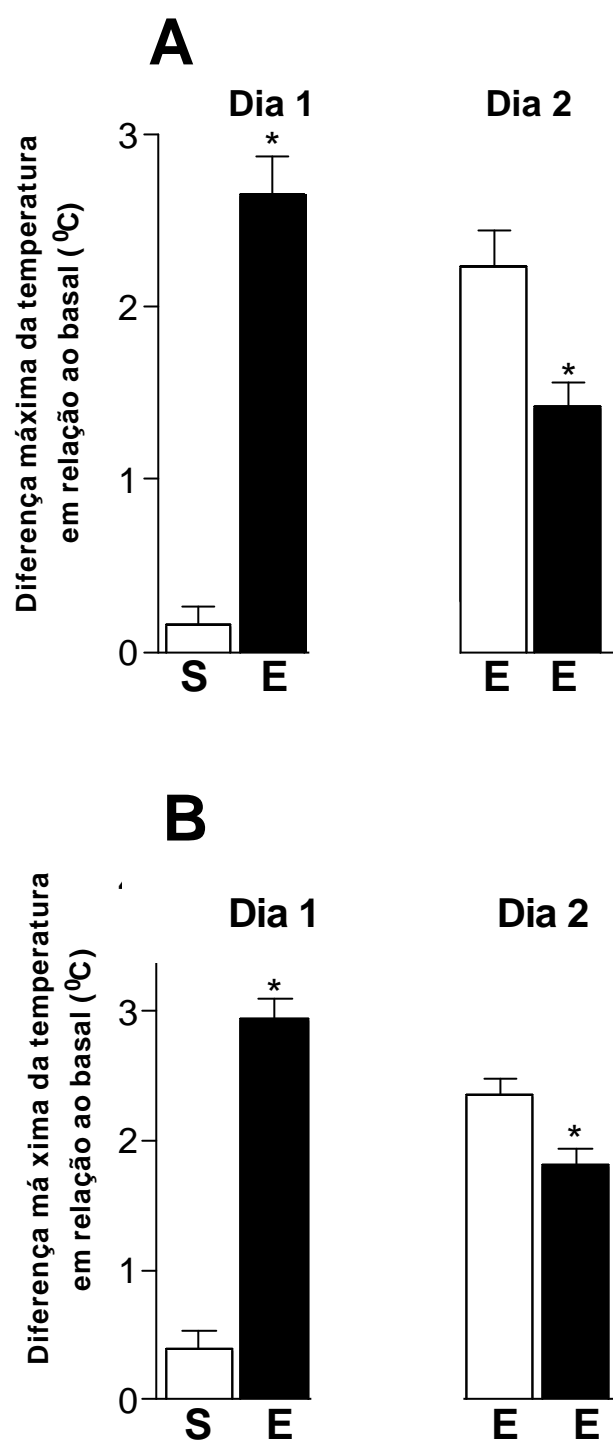


Figura 24: Desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E) nas doses de **2,3 g/Kg** (painel **A**) e **2,5 g/Kg** (painel **B**) administradas no **dia 2**, em ratos, no **teste da temperatura**. No dia 1, os grupos controles receberam salina (S, i.p.) e os experimentais E, na dose de 4,0 g/kg (20% p/v, i.p.). A temperatura dos animais foi obtida em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções. No dia 2, tanto os grupos controles quanto os experimentais foram tratados com 2,3 ou 2,5 g/Kg (20% p/v, i.p.) de E e testados como no dia anterior. Os resultados representam a média \pm EPM de 9 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle (teste “t” de Student).

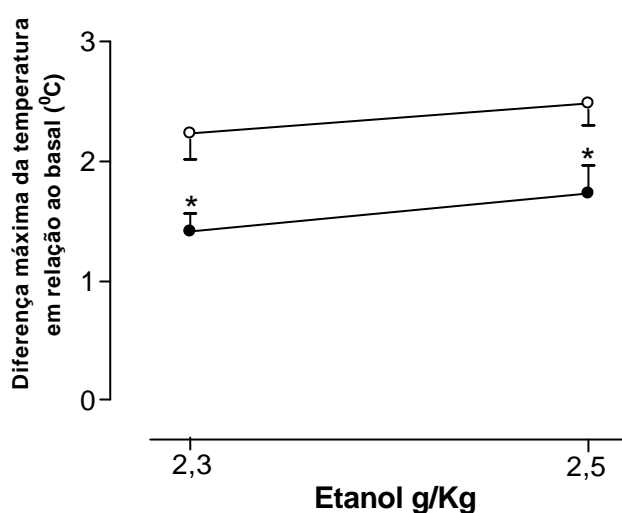


Figura 25: Efeito das doses de 2,3 e 2,5 g/Kg (20% p/v, i.p.) de etanol (E) sobre a hipotermia e o desenvolvimento da tolerância rápida no dia 2, em ratos submetidos à avaliação da temperatura corporal. No dia 1, os grupos controle ou experimentais receberam, respectivamente, injeções i.p. de salina (○) ou etanol (●) na dose de 4,0 g/Kg (20% p/v). No dia 2, todos os animais receberam etanol nas doses de 2,3 ou 2,5 g/Kg. Os resultados representam a média \pm EPM de 9 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle (teste “t” de Student).

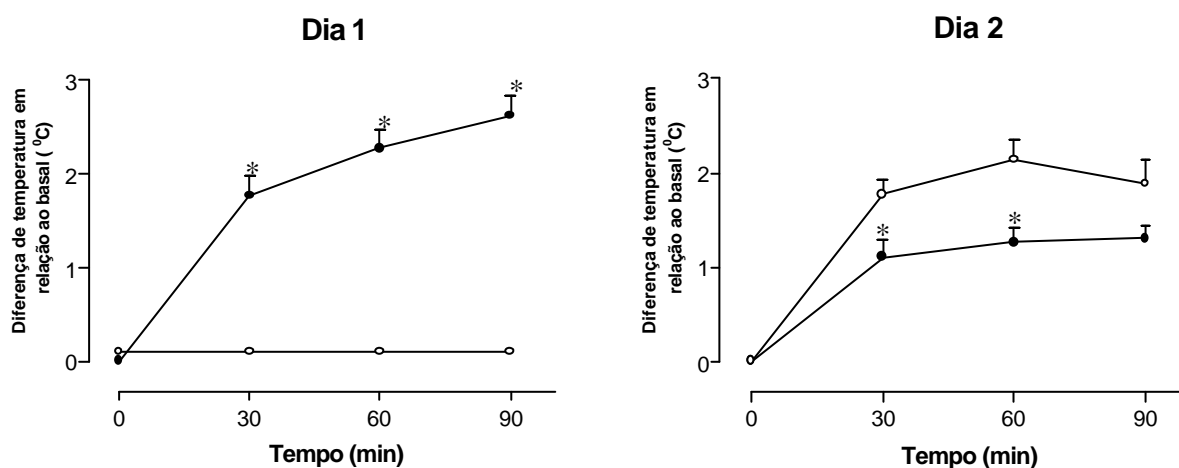


Figura 26: Efeito das doses de etanol: 4 g/Kg no dia 1 e 2,3 g/Kg no dia 2, em todos os tempos nos quais foi avaliada a temperatura dos ratos. No dia 1, os grupos controle ou experimental receberam respectivamente injeções i.p. de salina (○) ou de 4 g/Kg de etanol (●). No dia 2, todos receberam a dose de 2,3 g/Kg de etanol. Os resultados representam a média \pm EPM de 9 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle (teste “t” de Student).

Experimento 14: Efeito de DCS sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.

Este experimento teve como objetivo verificar se a DCS facilitaria a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Os ratos previamente habituados com a sonda do termômetro digital foram divididos em grupos A e B, sendo cada grupo subdividido em dois, os quais receberam, por via i.p., salina ou etanol (4g /Kg). Destes, cada grupo foi dividido novamente e recebeu, por via i.c.v., após 25 min, salina ou DCS (20 nmol, Figura 27, painel A; 40 nmol, Figura 27, painel B). A temperatura foi registrada, e no dia 2, todos receberam a dose de 2,3 g/Kg de etanol e foram avaliados como no dia anterior.

Resultados

Os resultados referentes à DCS sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol estão ilustrados na Figura 27, painéis A e B, e indicam que os animais tratados previamente com etanol apresentaram hipotermia no dia 1, que não ocorreu com os que receberam salina. Houve significância para o fator tratamento prévio i.p. [Fig 27A: $F_{(1,32)} = 213,957$, $p < 0,001$; Fig 27B: $F_{(1,40)} = 496,852$, $p < 0,001$].

No dia 2, o resultado mostrado pelos grupos controles que receberam etanol nos dois dias confirma o desenvolvimento da tolerância rápida à hipotermia. A ANOVA de duas vias revelou significância para os efeitos tratamento prévio i.p. [Fig 27A: $F_{(1,32)} = 16,946$, $p < 0,001$; Fig 27B: $F_{(1,40)} = 59,566$, $p < 0,001$]; o tratamento i.c.v. [Fig 27B: $F_{(1,40)} = 15,867$, $p < 0,001$] e a interação entre o tratamento prévio i.p. e o tratamento i.c.v. [Fig 27B: $F_{(1,40)} = 4,304$, $p < 0,044$]. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou a facilitação da tolerância rápida ao etanol no dia 2, nos animais tratados com 40 nmol de DCS no dia 1 (Figura 27, painel B).

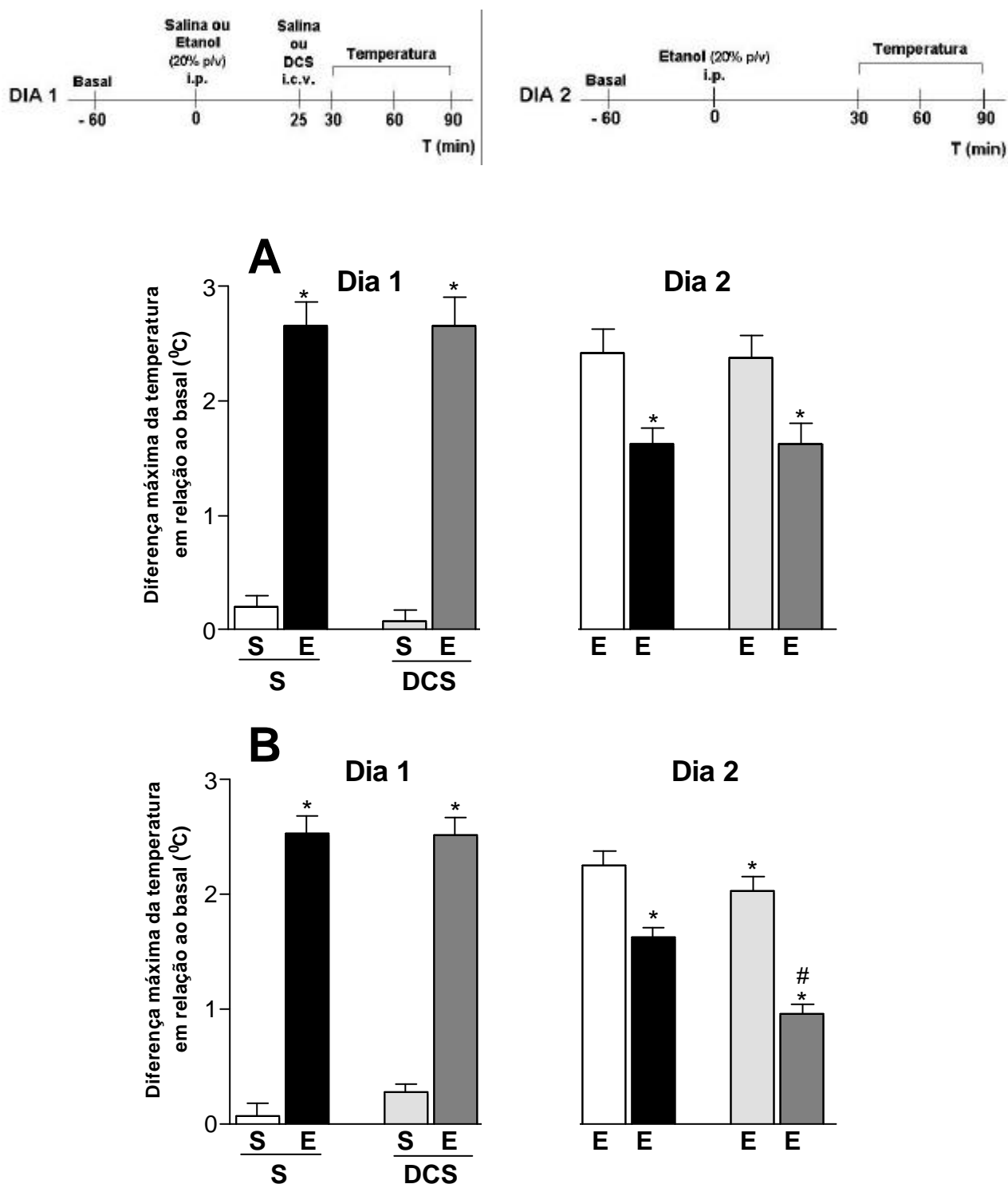


Figura 27: Efeito de D-cicloserina (DCS) nas doses de 20 nmol (painel A) e 40 nmol (painel B) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol (E), no teste da temperatura. No dia 1, os ratos receberam E (4,0 g/Kg, 20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção via i.c.v com salina (S) ou DCS. A temperatura foi mensurada em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E (2,3 g/Kg, 20% p/v, i.p.) foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 8-10 animais (painel A) e 11 animais (painel B) por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1; # $p < 0,05$ comparado aos injetados com E nos 2 dias (ANOVA + Tukey).

Experimento 15: Efeito do ⁽⁺⁾MK-801 sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.

Este experimento verificou se o ⁽⁺⁾MK-801, na dose de 2 nmol, interferiria na tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Os ratos previamente habituados com a sonda do termômetro digital foram divididos em dois grupos, os quais receberam, por via i.p., salina ou etanol (4 g/Kg). Destes grupos, cada um foi subdividido novamente e recebeu, após 25 min, salina ou ⁽⁺⁾MK-801 por via i.c.v. (Figura 28). A temperatura foi registrada, e no dia 2, todos receberam a dose de 2,3 g/Kg de etanol e foram avaliados como no dia anterior.

Resultados

Os resultados referentes ao ⁽⁺⁾MK-801 sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol estão ilustrados na Figura 28 e apontam que os animais tratados previamente com etanol apresentaram hipotermia no dia 1. A ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo para o tratamento prévio i.p. [$F_{(1,24)} = 305,356$, $p < 0,001$].

No dia 2, o resultado exibido pelo grupo controle, que recebeu etanol nos dois dias, confirma o desenvolvimento da tolerância rápida à hipotermia. Houve bloqueio da tolerância rápida ao etanol nos animais tratados com ⁽⁺⁾MK-801. A ANOVA mostrou significância para o efeito do tratamento prévio i.p. [$F_{(1,24)} = 20,083$, $p < 0,001$]; o tratamento i.c.v. [$F_{(1,24)} = 7,696$, $p < 0,010$] e a interação entre o tratamento prévio i.p. e o tratamento i.c.v. [$F_{(1,24)} = 8,299$, $p < 0,008$]. A análise *post hoc* sustentou que o ⁽⁺⁾MK-801 (2 nmol) bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

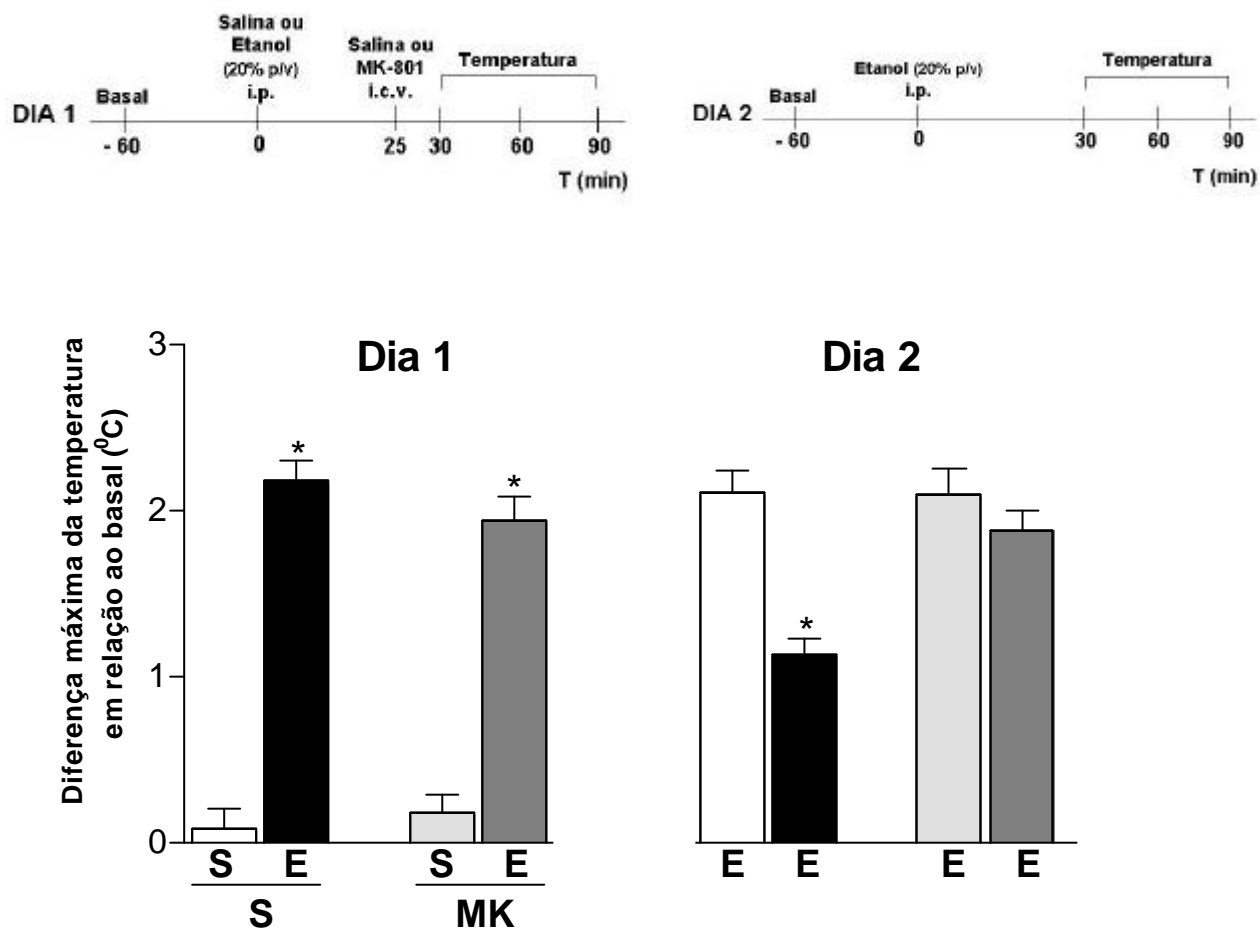


Figura 28: Efeito de ⁽⁺⁾MK-801 (MK), na dose de 2 nmol, na tolerância rápida ao etanol (E), no teste da temperatura. No dia 1, os ratos receberam E (4 g/Kg, 20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes das injeções via i.c.v com salina (S) ou MK. A temperatura foi mensurada em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E (2,3 g/Kg, 20% p/v, i.p.) foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados são expressos como média ± EPM de 7 animais por grupo. * p < 0,05 comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

Experimento 16: Efeito de 7-NI sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.

Neste experimento avaliou-se a interferência de 7-NI, nas doses de 40 nmol (Figura 29, painel A) e 80 nmol (Figura 29, painel B) i.c.v., na tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Os ratos previamente habituados com a sonda do termômetro digital foram divididos em grupos A e B. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam, por via i.p., salina ou etanol (4 g/Kg). Destes, cada grupo foi dividido novamente e recebeu, após 25 min, salina ou 7-NI. A temperatura foi registrada, e no dia 2, todos receberam a dose de 2,3 g/Kg de etanol e foram avaliados como no dia anterior.

Resultados

Os resultados referentes ao efeito de 7-NI (Figura 29, painel A: 40 nmol e Figura 29, painel B: 80 nmol) indicam que os animais tratados previamente com etanol (4 g/Kg i.p.) apresentaram hipotermia no dia 1, que não ocorreu com os que receberam salina. A ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo para o tratamento prévio i.p. [Fig 29A: $F_{(1,28)} = 201,949$, $p < 0,001$; Fig 29B: $F_{(1,32)} = 426,026$, $p < 0,001$]. O tratamento com 7-NI não afetou o desempenho dos animais que receberam salina ou etanol no dia 1.

No dia 2, o resultado manifestado pelo grupo controle, que recebeu etanol nos dois dias, confirmou o desenvolvimento da tolerância rápida à hipotermia. A ANOVA considerou significativo os fatores: tratamento prévio i.p. [Fig 29A: $F_{(1,28)} = 33,851$, $p < 0,001$; Fig 29B: $F_{(1,32)} = 6,98$, $p < 0,012$] e o tratamento i.c.v. [Fig 29B: $F_{(1,32)} = 4,926$, $p < 0,033$]. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) revelou que o tratamento com 80 nmol de 7-NI bloqueou a tolerância rápida ao etanol, enquanto que a dose de 40 nmol de 7-NI não interferiu na tolerância.

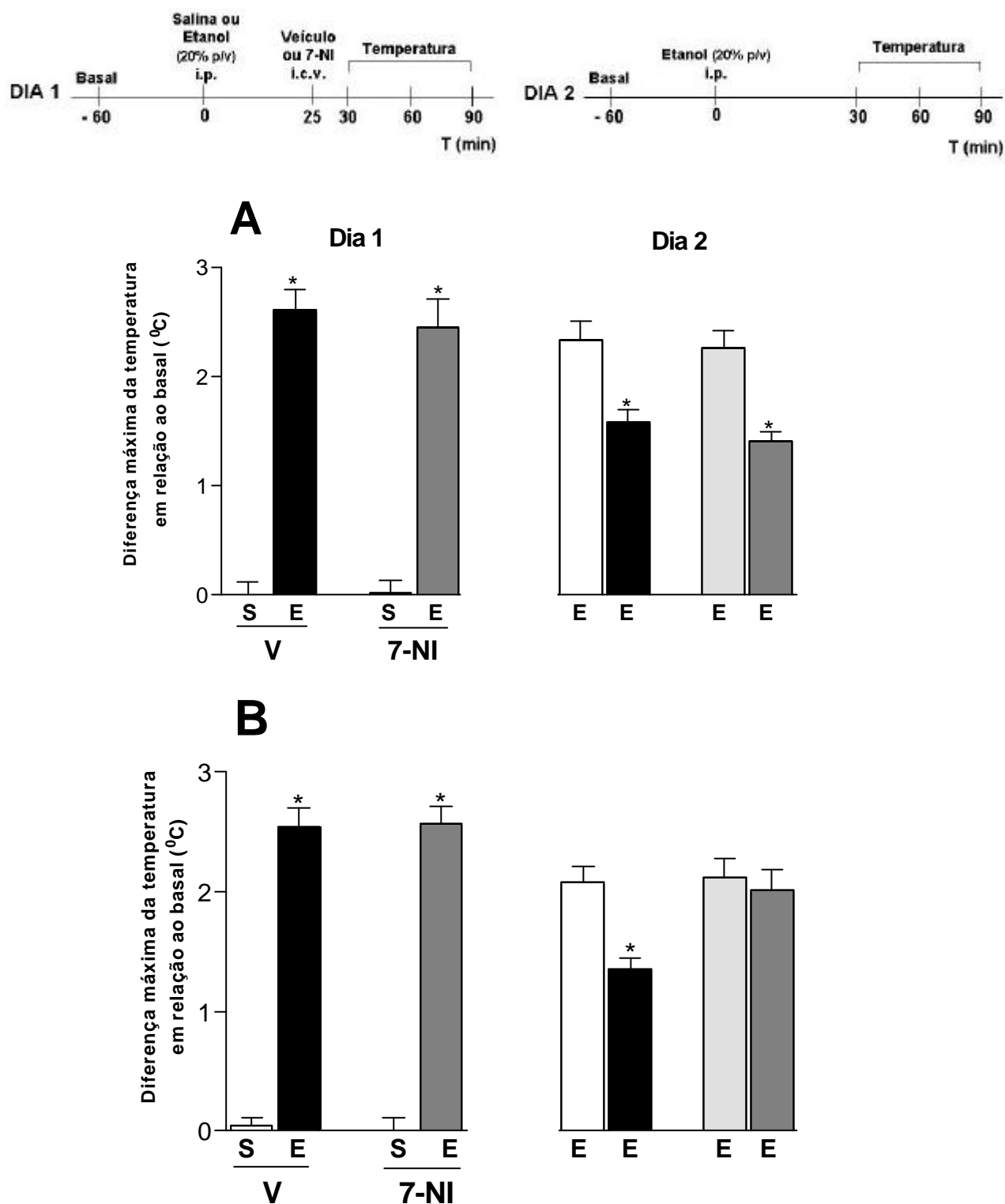


Figura 29: Efeito de 7-nitroindazol (7-NI), nas doses de 40 nmol (painel A) e 80 nmol (painel B), na tolerância rápida ao etanol (E), no teste da temperatura. No dia 1, os ratos receberam E (4,0 g/Kg, 20% p/v, i.p.) ou salina (S, i.p.), 25 min antes da injeção com veículo (V) ou 7-NI. A temperatura foi mensurada em condições basais e aos 30, 60 e 90 min após as injeções por via i.p. No dia 2, o E (2,3 g/Kg, 20% p/v, i.p.) foi administrado a todos os grupos e os animais foram testados como no dia anterior. Os resultados representam a média \pm EPM de 8 (painel A) e 8-10 animais (painel B) por grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles que receberam S (i.p.) no dia 1 (ANOVA + Tukey).

TRATAMENTO CRÔNICO

Experimento 17: Efeito da administração de etanol e de 7-NI sobre a indução da tolerância crônica, no modelo do plano inclinado.

Considerando que os experimentos agudos mostraram uma participação das vias dependentes de NO no desenvolvimento da tolerância rápida, foi avaliado o efeito do etanol e do NO no desenvolvimento da tolerância crônica. Por razões experimentais, o protocolo escolhido envolveu administrações sistêmicas e diárias de etanol, associadas ou não ao inibidor preferencial de nNOS, 7-NI.

Para observar o efeito do tratamento crônico com etanol (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.), bem como a interferência do tratamento prévio com 7-NI (12 mg/Kg, i.p.) na coordenação motora, foram formados dois grupos de ratos, os quais receberam veículo ou 7-NI. Estes dois grupos novamente divididos foram tratados, após 30 min, com salina ou etanol. Em condições basais, e decorridos 30, 60 e 90 min das últimas injeções, os animais foram avaliados no plano inclinado, retornando, após, às suas gaiolas moradia. Este procedimento foi realizado durante 15 dias, sendo que, no último dia (16^o), todos os grupos receberam apenas etanol e foram avaliados como nos dias anteriores.

Resultados

O tratamento crônico com etanol promoveu tolerância, sendo que este efeito não ocorreu nos animais tratados previamente com 7-NI (figura 30).

No dia 1, os animais que receberam etanol apresentaram prejuízo motor, que não ocorreu com os que receberam salina. A ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento ($F_{(1,36)} = 505,474$, $p < 0,001$). O tratamento prévio com 7-NI não interferiu no desempenho dos animais que foram tratados com salina ou etanol.

No dia 2, a ANOVA mostrou efeito significativo do tratamento prévio [$F_{(1,36)} = 28,066$, $p < 0,001$]; do tratamento [$F_{(1,36)} = 227,127$, $p < 0,001$]; e da interação entre o tratamento prévio e o tratamento [$F_{(1,36)} = 28,038$, $p < 0,001$].

Foi constatada uma redução do prejuízo motor nos demais dias, em relação ao dia 1, nos animais controles tratados com veículo e etanol (V+E). A ANOVA, para medidas repetidas, demonstrou efeito significativo do tratamento prévio [$F_{(1,36)} = 67,617$, $p < 0,001$]; do tratamento [$F_{(1,36)} = 973,084$, $p < 0,001$]; do fator de repetição (dias de tratamento) [$F_{(15,540)} = 21,433$, $p < 0,001$]; da interação entre o tratamento prévio e o tratamento [$F_{(1,36)} = 68,725$, $p < 0,001$]; da interação entre o tratamento e os dias de tratamento [$F_{(15,540)} = 30,343$, $p < 0,001$]. A interação entre o tratamento prévio com o tratamento e com os dias de tratamento indicou: $F_{(15,540)} = 1,679$, $p < 0,050$. A análise *post hoc* (teste de Tukey) evidenciou que, exceto no 1^o e 5^o dia, houve significância durante os outros dias entre os dois grupos tratados com etanol: controle e 7-NI. No último dia, todos os grupos apresentaram significância em relação ao controle tratado com etanol.

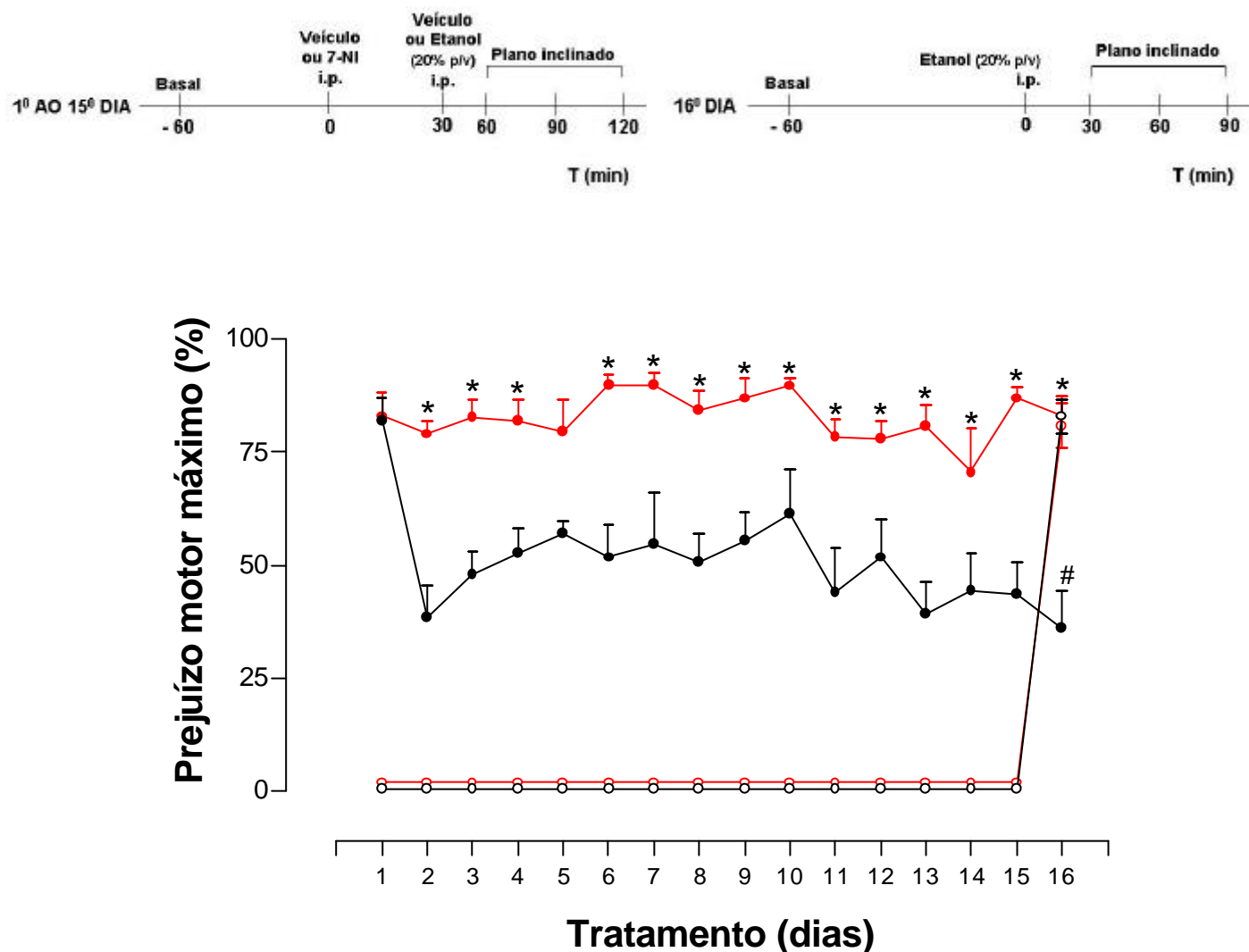


Figura 30: Efeito do **tratamento crônico com etanol** (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.) e **7-NI** (12 mg/Kg, i.p.) no desenvolvimento da tolerância crônica no plano inclinado. Durante 15 dias, 2 grupos de ratos receberam 7-NI ou veículo (V, i.p.) e, após 30 min, metade de cada grupo recebeu etanol (E) ou salina (S, i.p.). A avaliação da coordenação motora ocorreu em condições basais e aos 30, 60 e 90 min das últimas injeções. No último dia (16^o dia), apenas o E foi administrado a todos os grupos e os testes, realizados como nos dias anteriores. Os símbolos representam o desempenho dos animais que receberam, durante os 15 dias, V+S (○), V+E (●), 7-NI+S (○), 7-NI+E (●). Os resultados são expressos como média ± EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$, grupo 7-NI+E comparado em relação ao V+E. # $p < 0,05$ comparado com o dia 1 do mesmo grupo (V+E) (ANOVA + Tukey).

Experimento 18: Imunodeteção das isoformas de óxido nítrico sintase neuronal, induzida e endotelial, após o tratamento crônico com etanol e com 7-NI.

A análise de *Western blotting* para a quantificação das isoformas nNOS, iNOS e eNOS em homogenatos de hipocampo e cerebelo de ratos foi utilizada. Durante 15 dias, seis grupos de ratos receberam os tratamentos: V+S (veículo + salina) – 2 grupos, V+E (V + etanol), 7-NI+S – 2 grupos e 7-NI+E. O veículo ou 7-NI (12 mg/Kg) foi administrado por via i.p. 30 min antes das injeções com salina ou etanol (2,7g/Kg, 20% p/v, i.p.). Todos os dias os animais foram testados no plano inclinado, em condições basais, e aos 30, 60 e 90 min depois das injeções com salina ou etanol. Nas análises referentes ao cerebelo, foram acrescentados mais dois grupos: C, controle, que não recebeu qualquer tipo de tratamento e também não foi testado, e o grupo T, cujos animais foram apenas treinados ou testados diariamente, com esquema semelhante ao dos animais tratados (4 vezes por dia).

No último dia (16^o dia), um grupo V+S e um grupo 7-NI+S foram injetados com salina, e os demais com etanol (2,7 g/Kg, i.p.), sendo os ratos avaliados conforme os dias anteriores. Decorridas 6 horas das injeções, os animais foram sacrificados. O imunoconteúdo das isoformas de NOS neuronal, induzida e endotelial foram determinados, respectivamente, através de anticorpos específicos anti nNOS, anti iNOS e anti eNOS. Os gráficos representam a análise quantitativa do imunoconteúdo de NOS, sendo os valores expressos em unidades arbitrárias (densidade óptica).

Resultados

Os painéis A das Figuras 31, 32 e 33 demonstram, respectivamente, a imunodeteção das isoformas de nNOS, iNOS e eNOS em homogenatos de hipocampo de ratos. Os painéis B

das mesmas figuras representam a quantificação do imunoconteúdo das isoformas de nNOS (Figura 31), iNOS (Figura 32) e eNOS (Figura 33), através da densitometria das bandas, sendo os valores expressos em unidades arbitrárias (densidade óptica). Nos homogenatos hipocampais de ratos não foram observadas diferenças significantes em nenhuma das três isoformas analisadas.

O painel A da Figura 34 demonstra a imunodeteção da isoforma neuronal, em homogenatos de cerebelo de ratos, e o painel B da mesma figura representa a quantificação do imunoconteúdo, sendo os valores expressos em unidades arbitrárias. A análise de variância de uma via demonstrou efeito [$F_{(7,24)} = 4,288$, $p < 0,003$], e a análise *post hoc* (teste de Tukey) indicou significância do grupo 7-NI+S/S com os demais.

A imunodeteção da isoforma induzida, obtida de cerebelo de ratos, está representada na Figura 35 painel A, e o painel B demonstra a quantificação do imunoconteúdo, em unidades arbitrárias. A ANOVA apresentou efeito [$F_{(7,24)} = 4,101$, $p < 0,004$], e a análise *post hoc* indicou significância do grupo 7-NI+S/S com os grupos T, C, V+S/E e 7-NI+E/E.

A Figura 36 painel A exibe a imunodeteção da isoforma endotelial em homogenatos de cerebelo de ratos, e o painel B representa a quantificação do imunoconteúdo, sendo os valores expressos em unidades arbitrárias. A ANOVA demonstrou efeito [$F_{(7,24)} = 4,569$, $p < 0,002$], e a análise *post hoc* indicou que os grupos V+E/E e 7-NI+S/S foram significantes com os C e T.

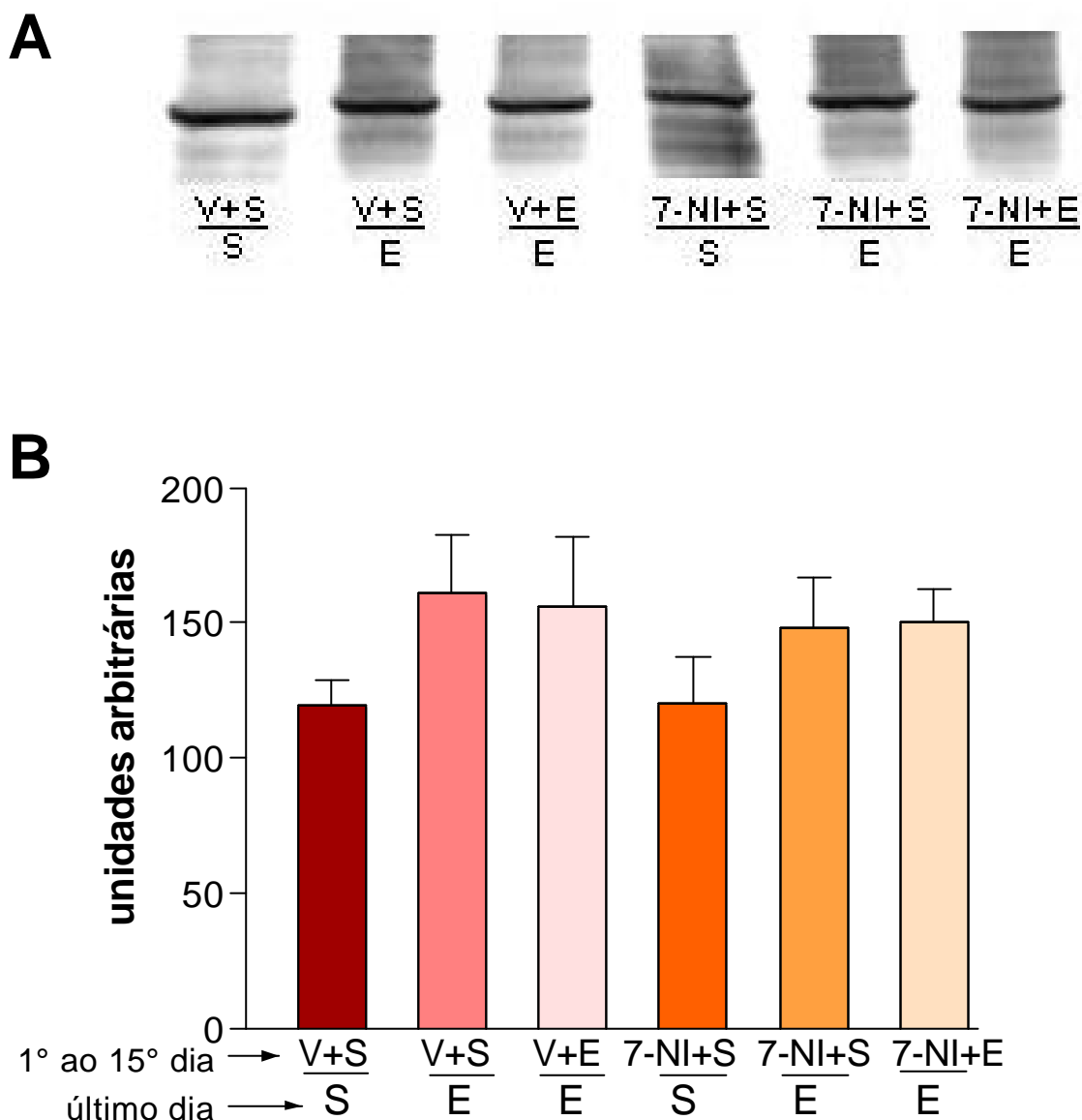


Figura 31: Imunoquantificação da nNOS em homogenatos de **hipocampo** de **ratos** tratados cronicamente com etanol (E, 2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.), na ausência e presença de 7-NI (12 mg/Kg, i.p.). Diferentes grupos de animais receberam, durante 15 dias, os tratamentos: V+S (veículo + salina), V+E, 7-NI+S, 7-NI+E. No 16^o dia, os animais foram sacrificados 6 horas após a administração de S ou E. As proteínas (100 µg/poço) foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose para a realização da imunodeteção. **A** – **Imunodeteção de nNOS**. **B** – Gráfico representativo da **análise quantitativa do imunoconteúdo de nNOS** através da densitometria das bandas. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias (densidade óptica) e se referem a 4 animais por grupo.

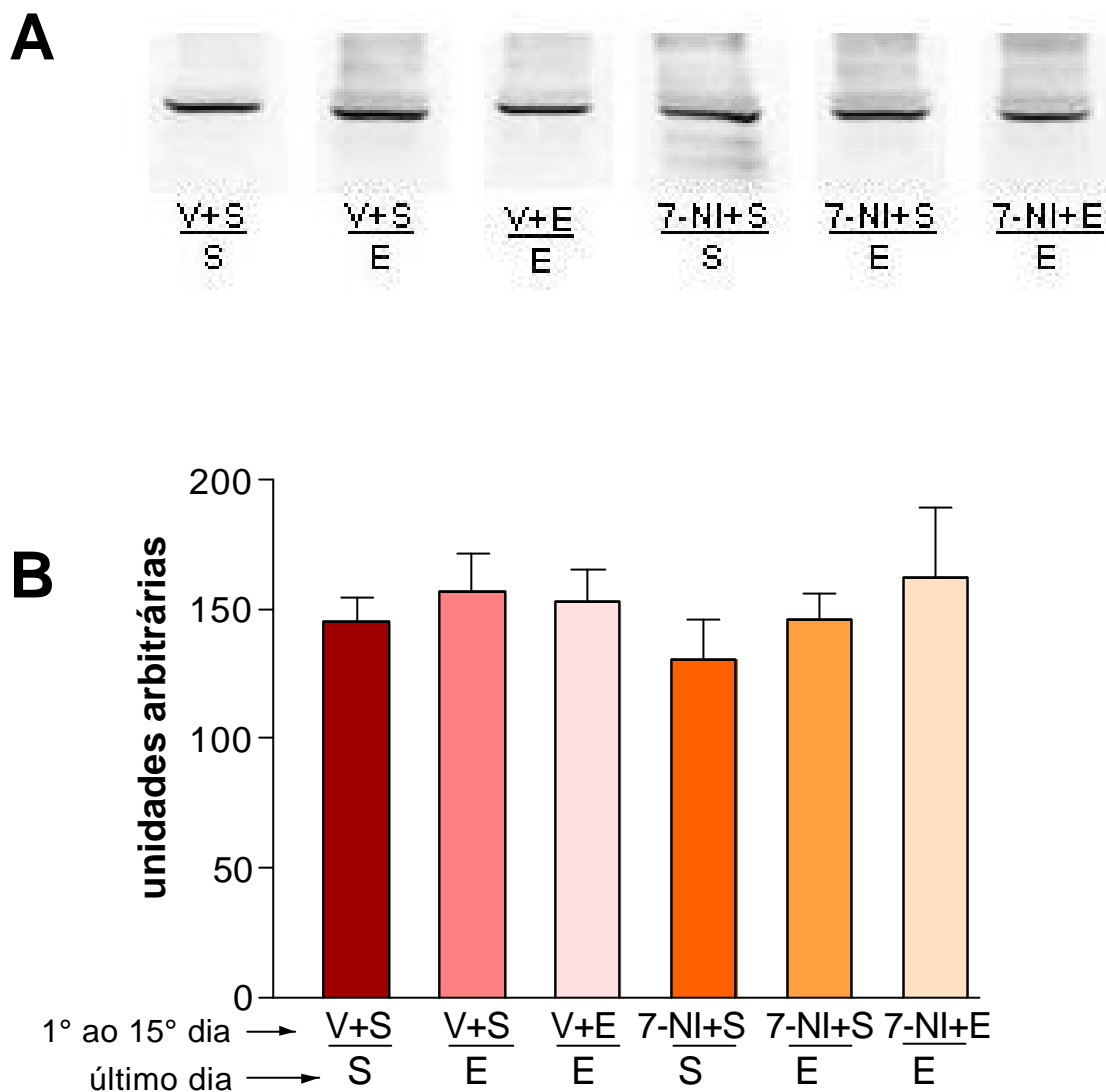


Figura 32: Imunoquantificação da iNOS em homogenatos de **hipocampo** de **ratos** tratados cronicamente com etanol (E, 2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.), na ausência e presença de 7-NI (12 mg/Kg, i.p.). Diferentes grupos de animais receberam, durante 15 dias, os tratamentos: V+S (veículo + salina), V+E, 7-NI+S, 7-NI+E. No 16^o dia, os animais foram sacrificados 6 horas após a administração de S ou E. As proteínas (100 µg/poço) foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose para a realização da imunodeteção. **A** – **Imunodeteção** de iNOS. **B** – Gráfico representativo da **análise quantitativa do imunoc conteúdo** de iNOS através da densitometria das bandas. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias (densidade óptica) e se referem a 4 animais por grupo.

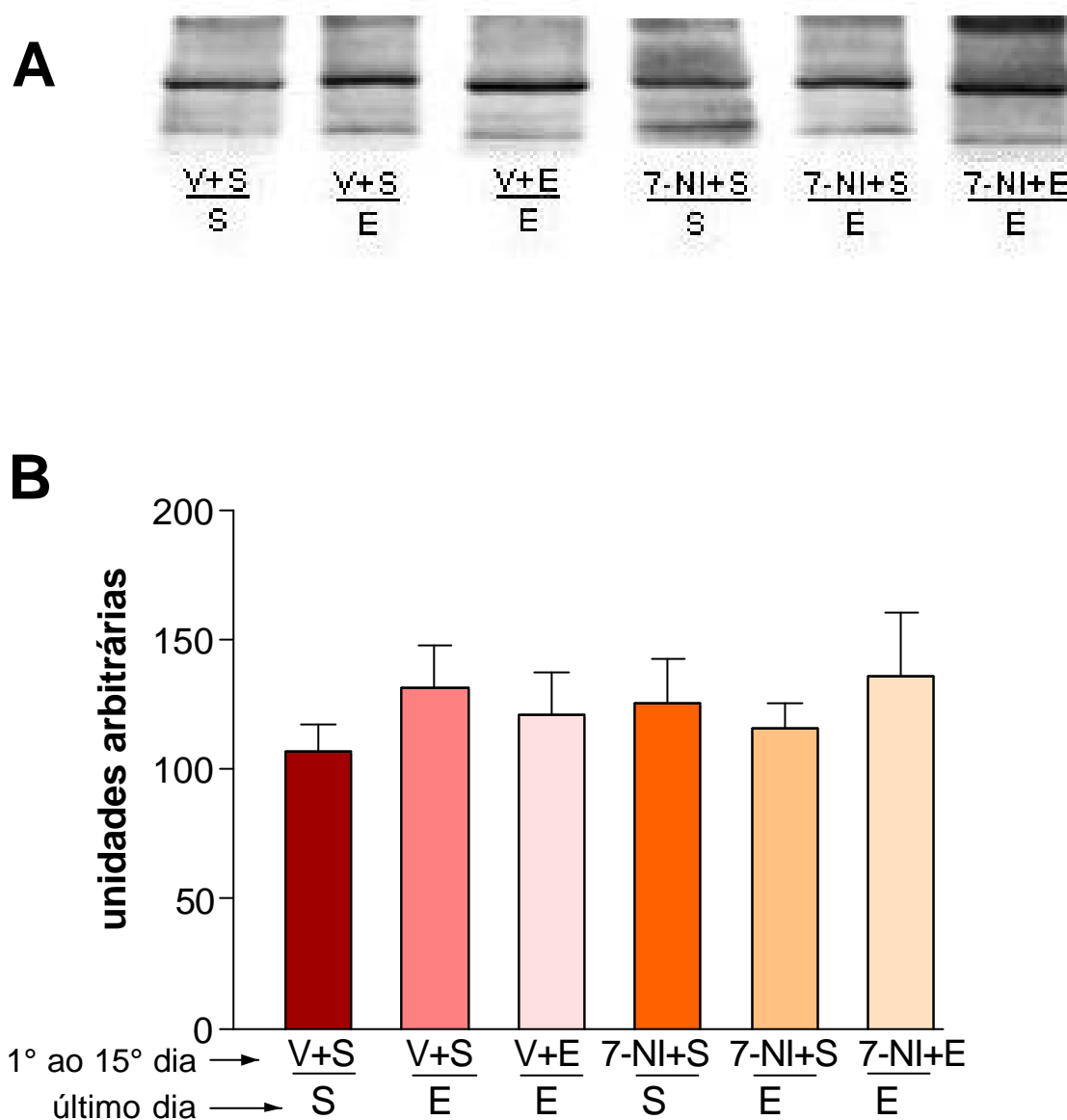


Figura 33: Imunoquantificação da eNOS em homogenatos de hipocampo de ratos tratados cronicamente com etanol (E, 2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.), na ausência e presença de 7-NI (12 mg/Kg, i.p.). Diferentes grupos de animais receberam, durante 15 dias, os tratamentos: V+S (veículo + salina), V+E, 7-NI+S, 7-NI+E. No 16^o dia, os animais foram sacrificados 6 horas após a administração de S ou E. As proteínas (100 µg/poço) foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose para a realização da imunodeteção. **A** – Imunodeteção de eNOS. **B** – Gráfico representativo da análise quantitativa do imunocónteúdo de eNOS através da densitometria das bandas. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias (densidade óptica) e se referem a 4 animais por grupo.

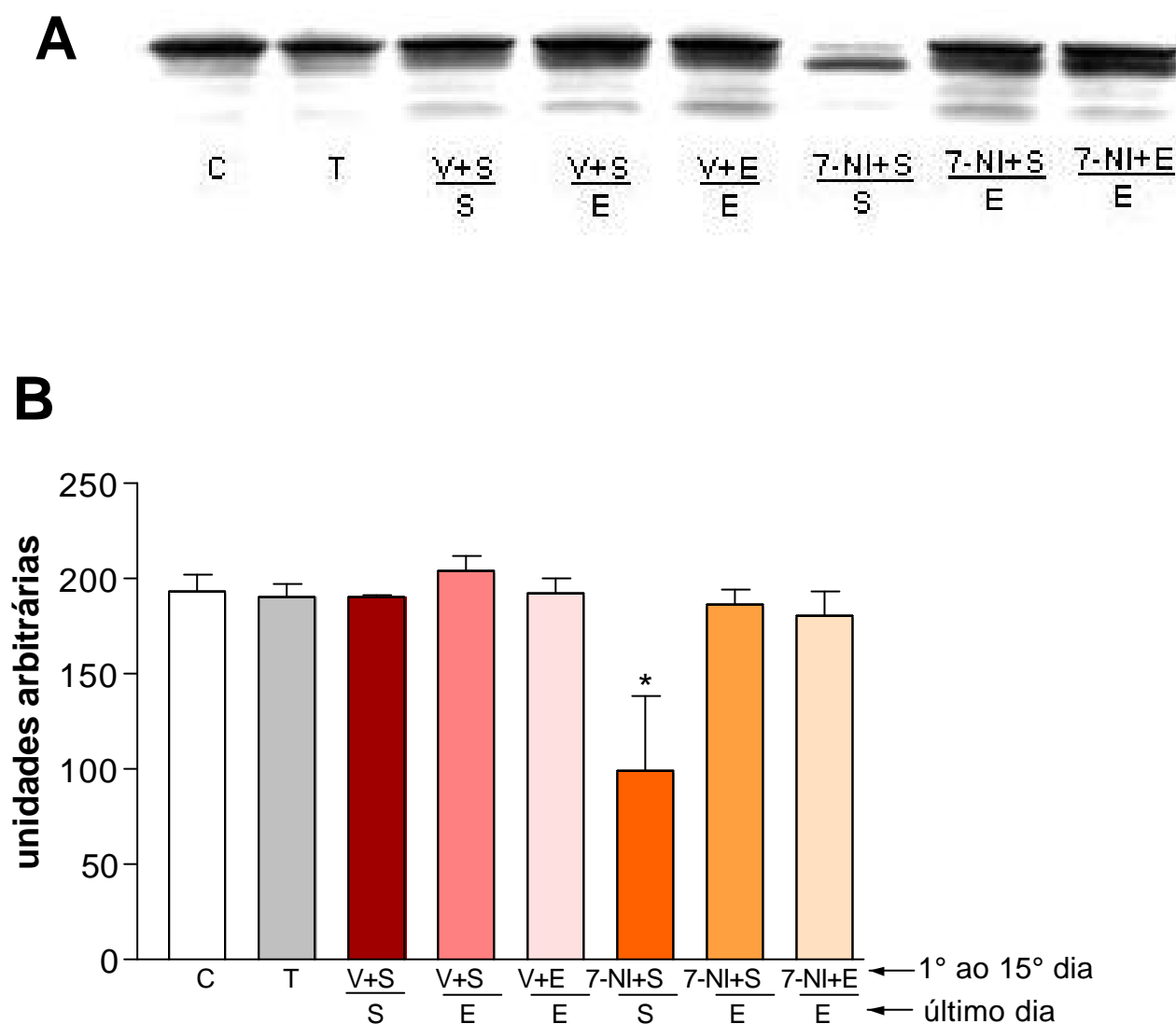


Figura 34: Imunoquantificação da nNOS em homogenatos de **cerebelo** de **ratos** tratados cronicamente com etanol (E, 2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.), na ausência e presença de 7-NI (12 mg/Kg, i.p.). Diferentes grupos de animais receberam, durante 15 dias, os tratamentos: V+S (veículo + salina), V+E, 7-NI+S, 7-NI+E. O C representa o grupo que não recebeu qualquer tipo de tratamento e que não foi testado no plano inclinado. Os animais do grupo T não receberam qualquer tipo de tratamento e apenas foram treinados (avaliados) no plano inclinado como os demais tratados. No 16^o dia, os animais foram sacrificados 6 horas após a administração de S ou E. As proteínas (100 µg/poço) foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose para a realização da imunodeteção. **A** – **Imunodeteção de nNOS**. **B** – Gráfico representativo da **análise quantitativa do imunoc conteúdo** de nNOS através da densitometria das bandas. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias (densidade óptica) e se referem a 4 animais por grupo. * p < 0,05 comparado com todos os demais grupos (ANOVA + Tukey).

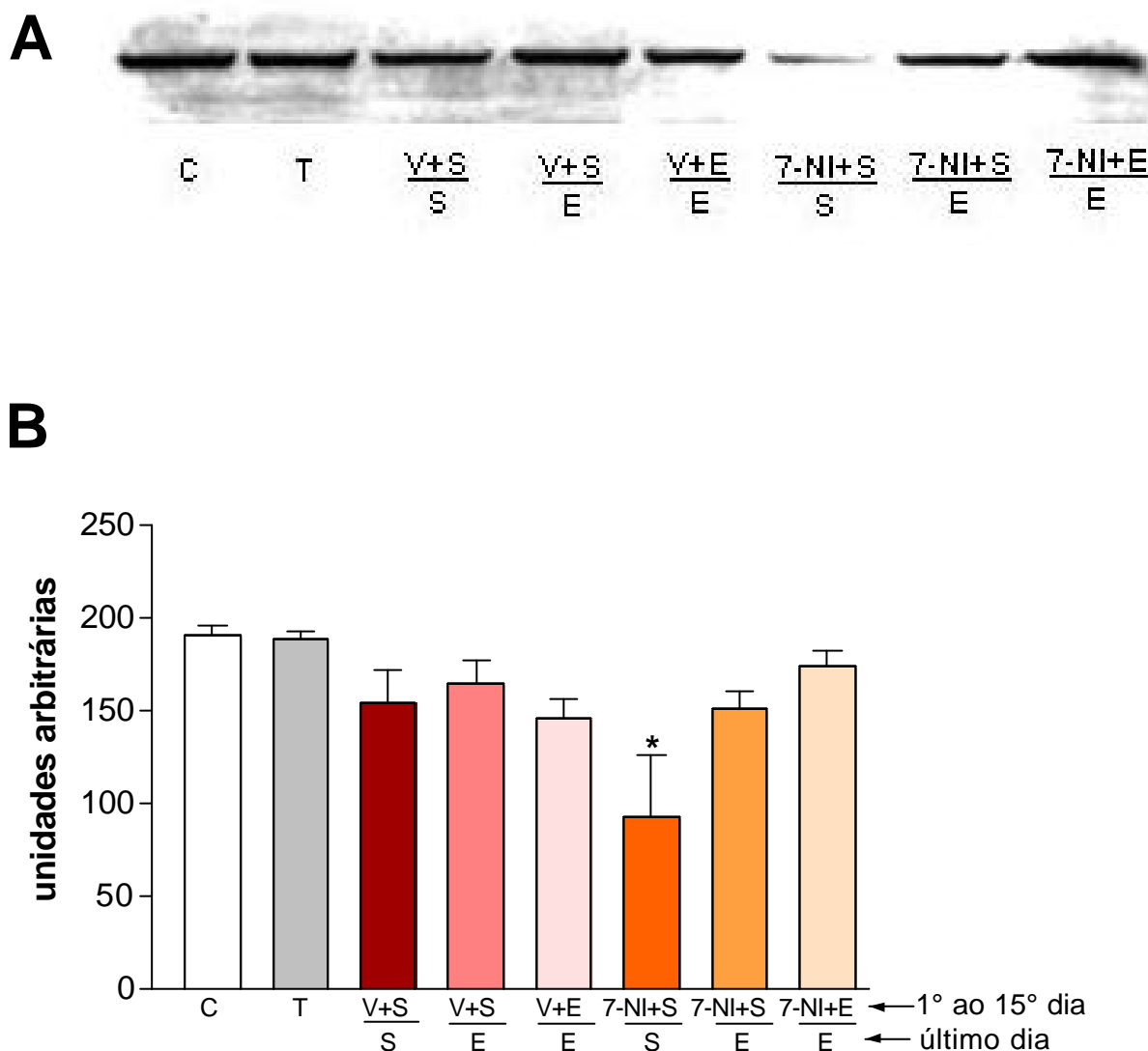


Figura 35: Imunoquantificação da iNOS em homogenatos de cerebelo de ratos tratados cronicamente com etanol (E, 2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.), na ausência e presença de 7-NI (12 mg/Kg, i.p.). Diferentes grupos de animais receberam, durante 15 dias, os tratamentos: V+S (veículo + salina), V+E, 7-NI+S, 7-NI+E. O C representa o grupo que não recebeu qualquer tipo de tratamento e que não foi testado no plano inclinado. Os animais do grupo T não receberam qualquer tipo de tratamento e apenas foram treinados (avaliados) no plano inclinado como os demais tratados. No 16^o dia, os animais foram sacrificados 6 horas após a administração de S ou E. As proteínas (100 µg/poço) foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose para a realização da imunodeteção. **A** – **Imunodeteção de iNOS**. **B** – Gráfico representativo da **análise quantitativa do imunoc conteúdo de iNOS** através da densitometria das bandas. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias (densidade óptica) e se referem a 4 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com C, T, V+S/E e 7-NI+E/E (ANOVA + Tukey).

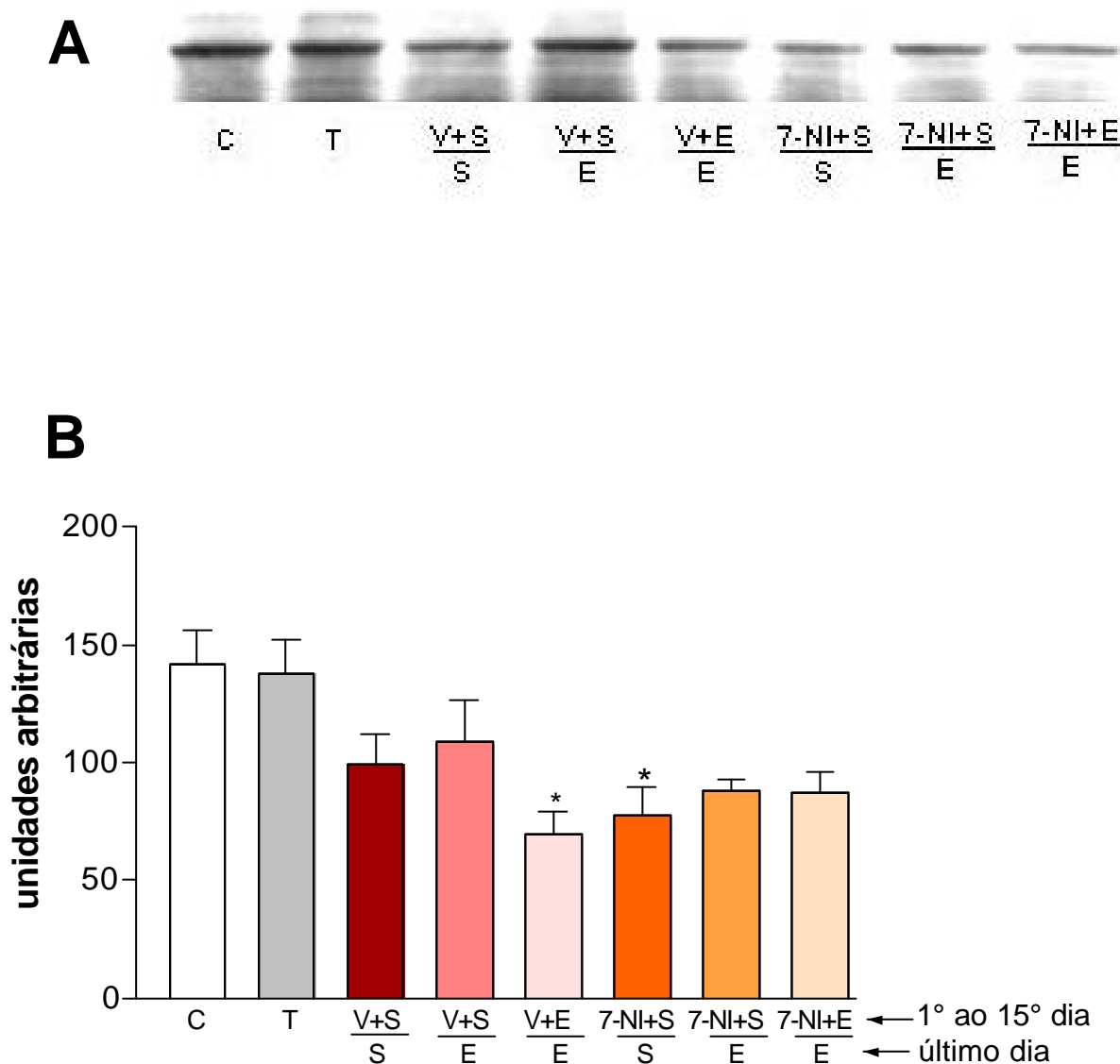


Figura 36: Imunoquantificação da eNOS em homogenatos de **cerebelo** de **ratos** tratados cronicamente com etanol (E, 2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.), na ausência e presença de 7-NI (12 mg/Kg, i.p.). Diferentes grupos de animais receberam, durante 15 dias, os tratamentos: V+S (veículo + salina), V+E, 7-NI+S, 7-NI+E. O C representa o grupo que não recebeu qualquer tipo de tratamento e que não foi testado no plano inclinado. Os animais do grupo T não receberam qualquer tipo de tratamento e apenas foram treinados (avaliados) no plano inclinado como os demais tratados. No 16^o dia, os animais foram sacrificados 6 horas após a administração de S ou E. As proteínas (100 µg/poço) foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose para a realização da imunodeteção. **A – Imunodeteção de eNOS.** **B –** Gráfico representativo da **análise quantitativa do imunoc conteúdo** de eNOS através da densitometria das bandas. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias (densidade óptica), se referem a 4 animais por grupo. * p < 0,05 comparado com C e T (ANOVA + Tukey).

Experimento 19: Dosagem alcoólica

Para analisar uma possível interação farmacocinética entre o 7-NI no metabolismo do etanol, foi realizada a dosagem alcoólica, em animais tratados, crônica ou agudamente, com estas drogas.

Procedimentos e resultados

Para determinar a alcoolemia após o tratamento agudo com etanol (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.), na ausência ou presença de 7-NI (12 mg/Kg, i.p.), este fármaco foi administrado 30 min antes das injeções de etanol. Decorridos 30 min deste último procedimento, foi feita a coleta de sangue dos animais (Tabela IIa).

Posteriormente, com outros dois grupos de animais, foram realizadas novas dosagens sanguíneas. No dia 1, foi administrado veículo ou 7-NI (12 mg/Kg, i.p.), 30 min antes do etanol (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.). No dia 2, ambos os grupos receberam apenas a injeção de etanol, sendo o sangue coletado 30 min após este procedimento. A análise de variância de uma via não demonstrou efeitos significantes entre os diferentes grupos (Tabela II), apontando não existir interferência na farmacocinética.

Com o intuito de verificar uma possível interferência do 7-NI no metabolismo do etanol após 15 dias de tratamento crônico, no 16^o dia, 30 min após a injeção com etanol, foi realizada a coleta de sangue. De acordo com os resultados obtidos, a concentração sanguínea de etanol foi similar entre os grupos, indicando que o 7-NI não interferiu no metabolismo do etanol (Tabela III).

Tabela II: Alcoolemia de ratos submetidos ao tratamento com veículo ou 7-NI (12 mg/Kg, i.p.) e etanol (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.): A) os animais foram tratados com veículo ou 7-NI e 30 min depois com etanol, sendo as coletas de sangue realizadas após 30 min da segunda injeção; B) os animais foram tratados com 7-NI e etanol e, decorridas 24h, receberam apenas etanol, sendo as coletas de sangue efetuadas após 30 min. Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 3-4 animais por grupo.

	Tratamento	Alcoolemia (dg/L)
A	Veículo + etanol	30,0 \pm 1,5
	7-NI + etanol	27,1 \pm 1,2
B	Veículo + etanol	29,9 \pm 1,1
	7-NI + etanol	26,3 \pm 1,2

Tabela III: Alcoolemia de ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 15 dias, na ausência e presença de veículo ou 7-NI (12 mg/Kg, i.p.) e salina ou etanol (2,7 g/Kg, 20% p/v, i.p.). No 16^o dia, os animais receberam apenas etanol, 30 min antes da coleta de sangue. Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 4 animais por grupo.

Tratamento Crônico por 15 dias	Alcoolemia no 16^o dia (dg/L)
Veículo + salina	29,2 \pm 2,1
Veículo + etanol	27,7 \pm 1,0
7-NI + salina	28,9 \pm 2,8
7-NI + etanol	27,5 \pm 1,6

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a maioria dos experimentos envolveu a tolerância rápida ao etanol, sendo grande parte dos animais testados no plano inclinado para avaliar a coordenação motora, e, além disso, testados os efeitos de alguns fármacos no modelo da temperatura. Os testes do plano inclinado e da temperatura corporal compreendem, respectivamente, o controle da função motora e o controle fisiológico da temperatura. Conforme já referido anteriormente, apesar dos seus mecanismos não estarem totalmente esclarecidos, é possível que os mesmos possam estar relacionados (KHANNA et al., 1997 e 1999).

Como tem sido relatado que a tolerância rápida e crônica apresentam similaridades, sendo observado que a rápida possa prever a crônica (KHANNA et al., 1991a, 1996 e 1999), neste estudo, foi também analisado o efeito do tratamento crônico com etanol na ausência e presença de um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) que será discutido adiante.

Entre as doses de etanol que promoveram tolerância rápida, foram escolhidas a de 2,7 g/Kg, no teste do plano inclinado, e de 4 g/Kg no dia 1 e 2,3 g/Kg no dia 2, no teste da temperatura. Uma vez que o etanol e todos os outros fármacos, no presente trabalho, foram administrados antes dos testes, pode-se deduzir que a tolerância desenvolvida também foi do tipo operante, ou tolerância influenciada pela prática intoxicada (MELLANBY, 1919; GOLDBERG, 1943; LÊ e KALANT, 1992).

Tem sido enfatizado que o receptor NMDA possa estar envolvido na tolerância rápida e crônica ao etanol (KHANNA et al., 1991a, 1991b, 1992a, 1993a, 1993b, 1994a, 1994b, 1995a, 1997, 1999). Os dados da literatura, referentes à tolerância rápida ao etanol, até então, haviam sido obtidos a partir de experimentos realizados com a administração sistêmica dos fármacos que atuam no receptor NMDA e, deste modo, a possibilidade de efeitos periféricos não podia ser descartada (KHANNA et al., 1991b; 1992a; 1992b; 1993a; 1993b; 1994b;

1995a e 1997; SZABÓ et al., 1994; KARCZ-KUBICHA e LILJEQUIST, 1995; BARRETO et al., 1998). Assim, o primeiro questionamento deste estudo foi no sentido de saber se a ativação ou bloqueio do receptor NMDA com fármacos administrados por via i.c.v. teria um efeito similar àquele já obtido por via sistêmica.

O antagonista não competitivo do receptor NMDA, dizocilpina (MK-801), impediu totalmente o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora e à hipotermia. Além disso, já que o isômero menos ativo ⁽⁻⁾MK-801 não teve efeito, nossos dados sugerem um bloqueio estereoespecífico no receptor NMDA. Estas informações estão de acordo com os dados prévios obtidos por administração sistêmica em ratos (KHANNA et al., 1993b e 1997) e camundongos (BARRETO et al., 1998). Desta maneira, os resultados obtidos sustentam o envolvimento do receptor NMDA no desenvolvimento à tolerância rápida ao etanol, tanto no parâmetro fisiológico quanto comportamental. Ademais, confirmam os dados de que o desenvolvimento da tolerância ao etanol está associado com o teste empregado (ALKANA et al., 1983; KHANNA 1996), visto que as doses de álcool e dos fármacos utilizados variaram em cada modelo.

Para avaliar o efeito da ativação do receptor NMDA na tolerância, empregaram-se várias doses de D-cicloserina (DCS), agonista parcial do receptor NMDA, no sítio da glicina insensível à estriçnina. A dose de 20 nmol de DCS no teste da incoordenação motora induzida e a dose de 40 nmol de DCS no teste da hipotermia causaram redução do efeito do etanol no segundo dia de exposição, indicando que este fármaco causa uma facilitação da tolerância rápida. Quando o ⁽⁺⁾MK-801 (4 nmol) foi administrado antes da DCS, no teste do plano inclinado, além de bloquear a tolerância ao etanol, impediu a facilitação da tolerância rápida induzida pelo agonista. Os efeitos destes agentes na tolerância rápida ao etanol parecem ser farmacodinâmicos, pois mesmo se considerarmos a eventual distribuição sistêmica dos

fármacos administrados por via i.c.v., sabe-se que estes não interferem com a metabolização do etanol (KHANNA et al., 1993a e b).

Levando em conta o sistema NMDA no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, foi utilizado o antagonista seletivo do sítio da glicina, ácido 7-cloro quinurênico (KEMP et al., 1988), que bloqueou totalmente a tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol. Este fármaco também impediu a facilitação da tolerância rápida ao etanol estimulada pela DCS.

É concebido que a função do receptor NMDA é dependente da composição de suas subunidades (HU e TICKU, 1995), sendo que o tratamento crônico com etanol causou uma *upregulation* na função do receptor NMDA em células granulares cerebelares (IORIO et al., 1992) e especificamente da subunidade NR2B em neurônios corticais (HU et al., 1996), além de outras áreas cerebrais (FAINGOLD et al., 1998). Foi verificado um aumento das subunidades NR2A e NR2B tanto no córtex quanto no hipocampo de ratos (FOLESA e TICKU, 1995). Outros autores encontraram, após o tratamento crônico com etanol, uma *upregulation* das subunidades NR1, NR2A e NR2B no córtex e hipocampo de ratos (KALLURI et al., 1998).

Em relação aos locais de ação do etanol no receptor NMDA, foi proposto o sítio da glicina (POPP et al., 1999; NUNEZ et al., 2000), sendo ainda aventado que as distintas subunidades do receptor apresentam diferenças na farmacologia e função (LOVINGER, 1996). O ifenprodil atua competitivamente na subunidade NR2B do receptor NMDA e foi 400 vezes mais potente em inibir receptores NMDA, compostos de subunidades NR2B e NR1A, do que as subunidades que foram recombinadas, compostas de NR2A e NR1A (REYNOLDS e MILLER, 1989; LOVINGER, 1996; revisto por LYNCH e GUTTMANN, 2001). Além disso, os receptores NMDA no núcleo lateral da amígdala estão envolvidos no medo condicionado, sendo que injeções sistêmicas e na amígdala com ifenprodil, em ratos,

sugeriram a participação da subunidade NR2B do receptor NMDA na plasticidade (RODRIGUES et al., 2001). No entanto, no presente trabalho, não foram utilizados fármacos específicos que atuem em subunidades do receptor NMDA, não sendo assim possível saber qual/quais subtipo(s) de receptor esteja(m) preferencialmente envolvido(s) na tolerância rápida ao etanol.

Deve ser mencionado que existem evidências de que a tolerância ao etanol possa ser influenciada pela aprendizagem e memória (BITRAN e KALANT, 1991). A potenciação de longa duração (long-term potentiation, LTP), modelo celular dos processos de memória que ocorrem em muitas células nervosas e envolvem a ativação de receptores NMDA (IZQUIERDO, 1993), foi inibida pelo etanol em diferentes procedimentos experimentais (MORRISETT e SCHARTZWELDER, 1993; RANDALL et al., 1995), sendo os efeitos, do etanol sobre a LTP, mais pronunciados em fatias de hipocampo de ratos mais jovens (PYAPALI et al., 1999). Ademais, os fármacos que prejudicam o aprendizado, como o ⁽⁺⁾MK-801, bloqueiam o desenvolvimento da tolerância (KHANNA et al., 1993b), enquanto que os que melhoram a memória, como a D-cicloserina e triptofano, facilitam a tolerância (KHANNA et al., 1994a e 1995a). Deve ser ressaltado que, além da tolerância ser um critério para diagnóstico das substâncias psicoativas pelo DSM-IV (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994), é considerada uma forma de neuroadaptação (KALANT et al., 1971), e a compreensão dos seus mecanismos de ação pode auxiliar no tratamento da síndrome de dependência ao álcool.

São encontrados consideráveis níveis de receptores NMDA no hipocampo (MONAGHAN et al., 1983), cerebelo (GARTHWAITE, 1982), regiões talâmicas, hipotálamo (BOURGUIGNON et al., 1989), núcleo do trato solitário, oliva inferior (MONAGHAN e COTMAN, 1985), córtex, núcleo *accumbens*, caudado putâmen, no núcleo lateral e basolateral da amígdala (COTMAN et al., 1987; SCHERZER et al., 1998) e medula espinhal

(AKESSON et al., 2000). Desta forma, diferentes estruturas podem participar nos efeitos aqui obtidos com drogas que afetam o receptor NMDA na tolerância rápida aos dois efeitos estudados.

Um segundo questionamento deste trabalho refere-se à participação do NO na tolerância rápida, já que os estudos também realizados por via sistêmica haviam apontado o envolvimento de vias dependentes de NO no desenvolvimento da tolerância rápida em modelos envolvendo a incoordenação motora causada pelo etanol.

Uma vasta literatura sobre o assunto mostra que o NO atua como mediador da transmissão em neurônios que inervam artérias cerebrais em muitas áreas cerebrais (BREDT et al., 1990; BREDT e SNYDER, 1992; SNYDER, 1992), existindo NO e NOS nas seguintes estruturas: cerebelo, hipocampo, hipotálamo, especialmente nos núcleos paraventricular e supraóptico, em neurônios contendo ocitocina, na neurohipófise, células cerebelares de Purkinje e neurônios aferentes com projeções para o cerebelo, células gliais, *locus coeruleus*, bem como em sistemas periféricos, em ratos (BREDT et al., 1990; SCHMIDT et al., 1992; DIVAC et al., 1993; FORSTER e SOUTHAM, 1993; VALTSCHANOFF et al., 1993; GROSSMAN et al., 1994; KADOWAKI et al., 1994; MIYAGAWA et al., 1994; POZO et al., 1994; WANG et al., 1994; XU et al., 1994).

Existem evidências de uma ampla distribuição de NOS no cérebro em neurônios peptidérgicos (no córtex e estriado), aminérgicos (na rafe dorsal), colinérgicos (no septo, tegmento mesopontino e neurônios simpáticos pré-ganglionares), GABAérgicos (no córtex), neurosecretórios (no núcleo supra-óptico e paraventricular) e glutamatérgicos (células cerebelares granulares) (DIVAC et al., 1993; KADOWAKI et al., 1994; ALABADÍ et al., 1999). Além disso, a excitabilidade neuronal pode levar a um aumento dos níveis de GMPc em diferentes regiões do cérebro, tais como o cerebelo, córtex cerebral, estriado e hipocampo (GARTHWAITE e BOULTON, 1995).

Muitas funções fisiológicas do NO e das isoformas de NOS podem ser influenciadas diferentemente pelo etanol, dependendo do tipo de tratamento e de interação com outros estímulos (ADAMS et al., 1992; WANG e PANG, 1993). Por exemplo, a exposição aguda de etanol não interferiu na resposta, enquanto a crônica aumentou a resposta estimulada por agonista em células endoteliais de artéria pulmonar bovina, propondo a participação de eNOS (DAVDA et al., 1993). Em cultura de células gliais, o etanol não teve um efeito direto sobre a produção de NOS, mas inibiu a produção de NO induzida por LPS (WANG et al., 1998). Sugere-se ainda que o etanol possa inibir a iNOS (SYAPIN et al., 2001; WAKABAYASHI e NEGORO, 2002) e modular a expressão de iNOS em células gliais humanas (DAVIS et al., 2002).

Existem evidências do envolvimento do NO nos mecanismos que regulam a ingestão de etanol, sendo que o inibidor não específico da NOS, L-nitroarginina (L-NA), causou uma redução da ingestão voluntária de etanol em ratos (CALAPAI et al., 1996). Também foi demonstrado que camundongos *knockout* em nNOS apresentaram maior ingestão de etanol, menor sensibilidade aos efeitos depressores do etanol e menor tolerância ao etanol quando comparados aos selvagens. Considerando estes resultados, foi salientado que, apesar do gene nNOS estar envolvido na regulação do comportamento de ingestão de etanol, é provável que as outras isoformas de NOS estejam envolvidas (SPANAGEL et al., 2002). Analisados em conjunto, estes dados podem indicar o envolvimento das três isoformas de NOS nos mecanismos relacionados à dependência ao etanol.

A administração de inibidores não seletivos da NOS, L-NA e L-nitroarginina-metil-éster (L-NAME), por via i.p., bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol no modelo do plano inclinado em ratos. Nos experimentos em que foi administrado L-NA, também foi utilizado o precursor de NO, L-arginina (L-Arg), que reverteu o bloqueio da tolerância rápida, no mesmo teste (KHANNA et al., 1993c e 1995b). O inibidor preferencial

da nNOS, 7-Nitroindazol (7-NI) (ALABADÍ et al., 1999; KOROS et al., 1999), bloqueou totalmente a tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol em camundongos. Este efeito foi revertido com L-Arg, mas não com seu enantiômero inativo, D-arginina (D-Arg), no modelo do rota-rod (BARRETO, 1997). Nesses estudos, o efeito bloqueador da tolerância por inibidores de NOS tem sido atribuído, em parte, a uma interferência com processos de aprendizado e memória (KHANNA et al., 1993c). No entanto, em relação à interferência do NO nos processos de memória e aprendizagem, alguns estudos assinalam que o bloqueio da NOS possa prejudicá-los (CHAPMAN et al., 1992; HOLSCHER, 1994; HAWKINS et al., 1998; RICKARD et al., 1999) e inibir a potenciação de longa duração (LTP) (HALEY et al., 1992). O inibidor preferencial de nNOS, 7-NI, produziu amnésia em frangos (HOLSCHER, 1994) e déficit na memória espacial em ratos, avaliada no labirinto aquático (HOLSCHER et al., 1996). Alguns autores não encontraram uma relação entre o NO e o aprendizado (BLOKLAND et al., 1999), enquanto outros mencionam ainda que a inibição de NOS possa facilitar o aprendizado e a memória (DU e HARVEY, 1996; DU et al., 2000). Assim, são necessários estudos adicionais para esclarecer os diferentes argumentos.

Com o intuito de aprofundar o estudo acerca da participação do receptor NMDA e do NO na tolerância ao etanol, e considerando que a literatura tem demonstrado efeitos do etanol em vias dependentes de NO no SNC, foi testado inicialmente o inibidor preferencial da nNOS, 7-NI, administrado por via i.p. e i.c.v. no modelo do plano inclinado para avaliar a coordenação motora.

A administração de 7-NI (via i.p. e i.c.v) bloqueou a tolerância rápida induzida pelo etanol no modelo do plano inclinado. Quando os experimentos foram desenvolvidos com a administração prévia de L-Arg (via i.p. ou i.c.v.), este tratamento impediu o bloqueio da tolerância. O mesmo não ocorreu quando foi utilizado o seu enantiômero inativo, D-Arg. Estes dados revelam que a inibição da enzima nNOS, e conseqüente redução da síntese de

NO, interfere no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Quando o verdadeiro precursor de NO foi administrado, o bloqueio não foi observado. Desta forma, os resultados do presente estudo, por via i.p. ou i.c.v., confirmam e estendem os dados anteriores, com inibidores de NOS menos seletivos, em ratos (KHANNA et al., 1993c e 1995b), ou com 7-NI, em camundongos (BARRETO, 1997), obtidos por via sistêmica.

No experimento crônico, desenvolvido para avaliar a incoordenação motora de animais tratados com etanol por 16 dias, pôde-se constatar o desenvolvimento da tolerância já no segundo dia e a manutenção da mesma ao longo do tratamento. Quando o 7-NI foi administrado concomitantemente ao etanol, durante 15 dias, houve nítido bloqueio da tolerância durante todo o experimento. Estes resultados, juntamente com os dados de experimentos realizados em dois dias, reforçam o descrito na literatura, de que a tolerância rápida possa predizer aspectos importantes da tolerância crônica (KHANNA et al., 1991a, 1992c, 1996).

Nossos dados, todavia, não permitem estabelecer se as alterações induzidas na tolerância aos efeitos do etanol por agonistas e antagonistas NMDA são afetadas pela ativação ou pelo bloqueio das vias dependentes de NO. Há referência de que a facilitação da tolerância rápida pela DCS foi bloqueada pela administração do inibidor da NOS, L-NA (KHANNA et al. 1995b). Além disso, a redução da síntese de NO por 7-NI aumentou a eficácia do etanol em produzir efeito ansiolítico no modelo do labirinto em cruz elevado. Este efeito, contudo, não ocorreu quando DCS foi injetada simultaneamente com 7-NI (FERREIRA e MORATO, 1996 e 1997). Essas evidências sugerem uma interação entre a ativação do sistema NMDA e a redução da síntese de NO, e seria plausível sugerir relação entre esses sistemas, na modulação da tolerância, também no presente trabalho.

Um dado importante de nosso estudo é o efeito do 7-NI em bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida também na hipotermia causada pelo etanol. Deve ser enfatizado que os

resultados obtidos com este efeito foram semelhantes com os observados no teste do plano inclinado. Deste modo, apesar de a hipotermia e a incoordenação motora serem controladas por estruturas distintas do sistema nervoso, pode-se dizer que exista a possibilidade de um mecanismo associativo comum que contribua para a tolerância aos efeitos do etanol, influenciados pelo receptor NMDA e vias nitrérgicas, como componentes cognitivos (KALANT, 1996; KHANNA et al., 1993c, 1995b e 1999).

O fato de os grupos tratados com diferentes fármacos e etanol apresentarem uma performance similar aos tratados com veículo e etanol no primeiro dia do teste sugere que os efeitos desses fármacos sobre a tolerância rápida não são, provavelmente, devido a alterações na coordenação motora ou na temperatura causadas por etanol.

É reconhecido que o estresse *per se* possa causar hipertermia em animais, no entanto, a administração de etanol causa hipotermia (CUNNINGHAM e BISCHOF, 1987). No presente trabalho, os animais foram manipulados três dias antes dos experimentos para habituá-los ao equipamento. Por este motivo, achamos improvável que o estresse tenha interferido nos resultados.

Conforme já referido anteriormente, no modelo da temperatura, DCS facilitou a tolerância rápida induzida pelo etanol, enquanto ⁽⁺⁾MK-801 e 7-NI bloquearam a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. As doses de fármacos administradas *per se* não alteraram a temperatura corporal dos ratos, que exibiram resultados semelhantes aos grupos controles, tratados com salina. Ademais, não foi detectado qualquer efeito residual das drogas na temperatura corporal dos animais no segundo dia, apontando efeitos farmacodinâmicos e não farmacocinéticos. Outros estudos evidenciam que o 7-NI causa um efeito hipotérmico, dependente da dose deste fármaco (STEINER et al., 2000) e da temperatura ambiente, sendo que a de 20 °C causa hipotermia, ao passo que a de 28 °C não interfere nos resultados (CALLAHAN e RICAURTE, 1998).

A dose de 25 mg/Kg de 7-NI não alterou a hipertermia induzida por metanfetamina, em camundongos, enquanto que a de 50 mg/Kg causou hipotermia *per se* (STEINER et al., 2000). Em outros experimentos, 30 mg/Kg do referido inibidor reduziram a temperatura corporal em 1,5 °C, em ratos, sendo ainda sugerido que 7-NI possa inibir em 60% a atividade de nNOS (PEROTTI et al., 1999). Uma vez que as doses de 7-NI utilizadas no presente trabalho foram inferiores às utilizadas pelos referidos autores, um efeito deste fármaco sobre a temperatura corporal não seria esperado.

No presente estudo, a alcoolemia foi verificada na ausência ou presença de 7-NI, administrado por via i.p., após o tratamento agudo com etanol, e também com outros grupos de animais, após testar a tolerância rápida. Os resultados não demonstraram diferença significativa entre os grupos. Estes dados concordam com os resultados de outros estudos sobre a tolerância rápida, mostrando que inibidores da NOS não interferiram com as concentrações cerebrais de etanol, ressaltando que os efeitos dos fármacos sobre a incoordenação motora induzida pelo etanol envolvem mecanismos farmacodinâmicos, ao invés de farmacocinéticos (KHANNA et al., 1993a e c, 1995b). Como o protocolo experimental aqui empregado foi semelhante ao de Khanna e colaboradores (1993c), e o 7-NI bloqueou a tolerância rápida, em ambos os modelos utilizados, nossos resultados dão suporte a essa hipótese.

Para verificar uma possível interferência do 7-NI na alcoolemia dos animais tratados cronicamente, foi realizada a coleta de sangue no 16^o dia, 30 minutos após as injeções com etanol. Os resultados obtidos entre os diferentes grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, indicando que o 7-NI não interferiu no metabolismo do etanol. Embora não tenhamos avaliado a concentração alcoólica cerebral em ratos tratados com 7-NI, nossos dados analisados em conjunto com as evidências da literatura revelam que a ação do 7-

NI no desenvolvimento da tolerância rápida e crônica deva envolver apenas mecanismos funcionais.

Nossos resultados estão de acordo com os de outros autores, sugerindo a participação do NO em mecanismos adaptativos relacionados com a dependência a drogas. Em estudos agudos, a inibição de NOS potencializou o tempo de sono (ADAMS et al., 1994) e o efeito ansiolítico (FERREIRA et al., 1999; ORTIGA, 2002), induzidos pelo etanol, e diminuiu os sintomas na abstinência ao etanol (UZBAY et al., 1997), enquanto que doadores de NO e um análogo do GMPc impediram o efeito ansiolítico dessa droga. As injeções de 7-NI no hipocampo e na substância cinzenta periaquedutal dorso lateral de ratos mostraram que a associação do referido fármaco com etanol elevou os índices indicativos de atividade ansiolítica no labirinto em cruz elevado (FERREIRA et al., 1999; ORTIGA, 2002).

O tratamento crônico com etanol associado com o inibidor de NOS L-N-nitroarginina em ratos diminuiu a preferência ao etanol e a hipermotilidade no período de abstinência, em relação aos animais apenas tratados com etanol (LALLEMAND e DE WITTE, 1997). Além disso, outros inibidores de NOS diminuíram o consumo de etanol em ratos (CALAPAI et al., 1996), inclusive nos que preferem etanol e nos Fawn-Hooded (REZVANI et al., 1995), e reduziram a sensibilização em camundongos tratados com cocaína e metanfetamina (ITZHAK, 1997). Estes inibidores também suprimiram a tolerância à morfina em fatias de hipocampo de ratos (LUE et al., 1999) e reduziram a preferência condicionada de lugar induzida pela cocaína e fenciclidina em camundongos (ITZHAK et al., 1998; MIYAMOTO et al., 2000) e pela morfina em ratos (KIVASTIK et al., 1996).

Em relação à abstinência às drogas, foi notado que a interferência nas vias dependentes de NO reduz os sintomas na retirada do etanol (ADAMS et al., 1995), opióides (LIU e ANAND, 2001; JAVELLE et al., 2002) e nicotina (ADAMS e CÍCERO, 1998; MALIN et al., 1998). Por outro lado, o uso de doadores de NO aumentou os sintomas da abstinência na

interrupção do uso de etanol e opióides (ADAMS et al., 1993 e 1995; revisto por UZBAY e OGLESBY, 2001).

A inibição da NOS em camundongos DBA/2J diminuiu a sensibilização locomotora e a preferência condicionada de lugar ao etanol (ITZHAK e MARTIN, 2000). Em outros estudos, foi observado que houve um aumento do efeito hipnótico do etanol através do uso de inibidores da NOS e uma redução com o uso de doadores de NO (ADAMS et al., 1994; VASSILJEV et al., 1998).

Parecem existir múltiplas interações entre glutamato, NO, dopamina e outros neurotransmissores em estruturas cerebrais relacionadas com a estimulação psicomotora (PULVIRENTI et al., 1991; ITZHAK, 1997). A interação da cascata NMDA/NO tem merecido destaque na tolerância a opióides (PASTERNAK et al., 1995), havendo interferência do NO na tolerância à morfina (LUE et al., 1999). Por sua vez, com inibidores de NOS não houve tolerância à morfina (KOLESNIKOV et al., 1992) além da diminuição dos sintomas da abstinência a opióides (KIMES et al., 1993). O aumento dos níveis de NO induzido pelo uso crônico de morfina pode elevar os níveis de GMPc (BREDET e SNYDER, 1989; GARTHWAITE et al., 1989), com a possibilidade de ocorrer a fosforilação de proteínas e a alteração de respostas fisiológicas (LUE et al., 1999).

Apesar de não ser um dos objetivos do presente estudo, é importante citar algumas vias e circuitos neuronais envolvidos nos processos de tolerância ao etanol. Por exemplo, projeções ascendentes contendo serotonina do núcleo da rafe à parte anterior do sistema límbico do cérebro têm demonstrado desempenhar uma importante função na aquisição e manutenção da tolerância. As lesões provocadas na rafe medial retardaram o desenvolvimento da tolerância crônica ao prejuízo motor e hipotérmico induzido pelo etanol, sendo que as lesões na rafe dorsal não interferiram na tolerância. Ainda, lesões no núcleo dorsal da rafe diminuíram significativamente os níveis de 5-HT no estriado e no córtex, enquanto que lesões

no núcleo medial da rafe reduziram o conteúdo de 5-HT no hipocampo e córtex (LÊ et al., 1981a). Em outro estudo, a partir de injeções por via intracerebroventricular, a depleção de serotonina retardou o desenvolvimento da tolerância ao etanol, ao passo que a associada com noradrenalina inibiu, sendo que a depleção isolada de noradrenalina não produziu efeito (LÊ et al., 1981b). Posteriormente, lesões na via mesolímbica serotoninérgica demonstraram retardar a tolerância ao etanol e ao pentobarbital (KHANNA et al., 1987).

Diferentes áreas cerebrais podem participar nos mecanismos subjacentes à tolerância ao etanol, como o núcleo mediano da rafe ou hipocampo ventral (BARE et al., 1998), órgão subfornical, núcleo supraquiasmático e septo lateral (LANÇA et al., 1999), envolvendo, principalmente, a serotonina e a vasopressina. A destruição de terminais neuronais serotoninérgicos pela injeção de 5,7-dihidroxitriptamina evitou o desenvolvimento da tolerância após uma única exposição de arginina vasopressina e etanol (WU et al., 1996). Deve ser salientado que a literatura refere que o desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos serotoninérgicos pode (BARE et al., 1998) ou não ocorrer (THIELEN et al., 2001), dependendo da região cerebral estudada.

No que diz respeito aos múltiplos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da tolerância ao etanol, têm sido propostas tanto modificações transcricionais (processos pelos quais porções de DNA, que são codificadas para proteínas específicas, são convertidas a RNAm, no núcleo da célula) quanto pós-traducionais (após o RNAm ser convertido em proteínas ou polipeptídeos, no ribossoma) em receptores NMDA e GABA_A (CHANDLER et al., 1997 e 1998). A participação de neurotransmissores e hormônios como GABA, glutamato, serotonina, noradrenalina, arginina vasopressina e acetilcolina parece influenciar o desenvolvimento da tolerância (WU et al., 1994; KALANT, 1996; BARE et al., 1998; CHANDLER et al., 1998). Também foi demonstrado que o bloqueio da formação de NO pode reduzir a liberação de acetilcolina na formação reticular pontina em ratos (LEONARD e

LYDIC, 1995), bem como haver interações entre o NO, dopamina e glutamato em estruturas cerebrais associadas à estimulação psicomotora (ITZHAK, 1997; KISS e VIZI, 2001). É possível que o envolvimento do NO na tolerância rápida, descrito aqui, possa estar ligado a vários sistemas de neurotransmissores. Assim, o NO poderia participar indiretamente na tolerância, via modulação de monoaminas. Porém, o estudo da influência do NO sobre a neurotransmissão de monoaminas tem mostrado alguns resultados contraditórios (para uma revisão, ver KISS, 2000).

O etanol reduz os níveis de GMPc devido a uma diminuição do influxo de cálcio, necessária à ativação da guanilato ciclase solúvel (HOFFMAN et al., 1989), havendo evidências de que o GMPc atue em várias regiões cerebrais, entre elas o cerebelo (REDOS et al., 1976; WOOD, 1991) e hipocampo (TOROPAINEN et al., 1997).

A guanilato ciclase cataliza a formação de GMPc, sendo ativada pelo NO. Para avaliar uma possível interferência da via NO-GMPc na tolerância rápida induzida pelo etanol, foram utilizados os bloqueadores da guanilato ciclase solúvel (GCs): azul de metileno, o seu derivado, LY83583, e NS2028 e ODQ.

Os resultados deste estudo mostraram que os diferentes inibidores da GCs bloquearam a tolerância rápida, enquanto que o gerador de NO e o análogo de GMPc facilitaram o desenvolvimento da tolerância. Os resultados obtidos com azul de metileno e o seu derivado LY83583 merecem atenção, já que o primeiro fármaco pode também inibir a NOS (RAND e LI, 1995) ou atuar como um seqüestrador de NO (MACHADO et al., 2000), ao passo que ambos podem levar à formação de superóxido e interferir com a transmissão dependente de NO (GARTHWAITE e BOULTON, 1995). No entanto, os resultados obtidos com inibidores da GCs mais seletivos, NS2028 e ODQ, confirmam os resultados obtidos com os primeiros fármacos, reforçando que a inibição da GCs bloqueia a tolerância rápida ao etanol.

O doador de NO, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), não interferiu no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Por outro lado, o gerador de NO, nitroprussiato de sódio (NPS), e o análogo de GMPC: 3',5'-monofosfato sódico de 8-bromoguanosina cíclico (8-Br-GMPc) facilitaram a tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol. O NPS, administrado no primeiro dia do experimento, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida no segundo dia do teste. Este resultado sugere que o aumento na concentração de NO causado pelo NPS propiciou alterações adaptativas que facilitaram a aquisição da tolerância rápida nos animais. Este efeito foi obtido com 40 nmol, enquanto que 80 nmol de NPS, como também ambas as doses de SNAP não produziram efeito.

Alguns estudos exibiram diferenças nos mecanismos pelos quais doadores de NO possam afetar neuro-efetores (GARCIA-PASCUAL et al., 1999). Além disso, diferenças nas potências farmacológicas têm sido observadas, dependendo do órgão estudado (GONZALES et al., 1997; BOCCA et al., 2000; ZHANG et al., 2001). Em células secretoras de hormônio de crescimento humanas, o SNAP, por exemplo, apresentou uma maior geração de NO, se comparado com o NPS (BOCCA et al., 2000). Por outro lado, a atividade do receptor NMDA pode ser afetada por um aumento na concentração de NO, devido à nitrosilação de grupos sulfidríla (LEI et al., 1992; MANZONI, et al, 1993). Desta forma, poderia ser especulado que SNAP (40 e 80 nmol) e NPS (80 nmol) produziram níveis mais elevados de NO do que NPS, na dose de 40 nmol. É possível que isto venha a interferir na atividade do receptor NMDA, compensando o efeito inicial do NO sobre a tolerância.

Considerando que algumas ações do NO são independentes da ativação de GMPC (GARTHWAITE e BOULTON, 1995), foi analisada a participação do NO na tolerância, testando-se o 8-Br-GMPc. Uma vez que este fármaco é um análogo de GMPC, foi pressuposto que facilitaria o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Os resultados dos

experimentos confirmaram que a administração de 8-Br-GMPc no dia 1 aumentou a magnitude da tolerância no dia 2, apontando que este fármaco reproduz os efeitos do NO, facilitando o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

É interessante notar que as ações agudas do etanol também podem ser afetadas por inibidores da GCs ou por doadores de NO. Assim, a administração intrahipocampal ou na substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral em ratos com NPS ou 8-Br-GMPc ressaltou que estes fármacos se opõem ao efeito ansiolítico do etanol. Já os inibidores da GCs nessas estruturas tendem a produzir um efeito sinérgico ao do etanol em modelos de ansiedade (FERREIRA et al., 1999; ORTIGA, 2002).

Estudos posteriores investigando as vias da PKA e as vias nitrérgicas dependentes de GPMc podem ser promissores na tolerância. O GMPc e a PKA podem atuar de forma independente, conjunta, ou antagônica, e como mediadores de muitos efeitos relacionados com o NO. Como existem evidências de que a nNOS possa ser fosforilada por diferentes quinases, incluindo a PKC, PKA, CAM-K, PKG (NAKANE et al., 1991; BREDT et al., 1992; DINNEMAN et al., 1994; DAWSON et al., 1998), estas proteínas merecem atenção nos estudos referentes à tolerância e dependência ao etanol. Foi verificado, por exemplo, que, em *Drosophila*, as vias dependentes de AMPc e PKA se opõem aos efeitos do etanol. Assim, pode-se supor que a sensibilidade aumentada ao etanol possa ser revertida por agentes que elevem os níveis de AMPc e PKA, enquanto uma redução na atividade de PKA pode causar aumento na sensibilidade ao etanol (MOORE et al., 1998). Ademais, camundongos transgênicos, que expressam maior quantidade de adenilato ciclase do tipo VII, apresentaram uma menor sensibilidade à ataxia, perda de reflexos e supressão dos disparos nos neurônios de Purkinje induzidos pelo etanol (YOSHIMURA et al., 1999). O GMPc pode ainda atuar regulando a atividade de algumas fosfodiesterases (GARTHWAITE, 1991) e aumentar o

AMPC, através da inibição da fosfodiesterase III nas plaquetas e em preparações vasculares (BURNS et al., 1994; ECKLY e LUGNIER, 1994).

Como vários estudos descrevem que o NO está envolvido nas ações do etanol e na atividade de receptores NMDA, o consumo de etanol poderia potencializar ou reduzir a ação do NO incitada por receptores NMDA (CHANDLER et al., 1997) e promover alterações nas expressões dos níveis de receptores no SNC (SAMSON e HARRIS, 1992). Uma vez que o inibidor preferencial da nNOS interferiu com a tolerância rápida induzida pelo etanol, nos modelos do plano inclinado e da temperatura, a nossa hipótese foi que a exposição prolongada ao etanol e/ou ao 7-NI poderia causar alterações no imunoconteúdo da enzima óxido nítrico sintase. Como a tolerância rápida e a crônica foram bloqueadas pela redução da síntese de NO, este efeito poderia corresponder a uma redução no imunoconteúdo das NOS. Desta maneira, outro objetivo foi o de analisar o imunoconteúdo das três isoformas da NOS em duas estruturas ricas em NOS como o hipocampo e cerebelo (VALTSCHANOFF et al., 1993; POZO et al., 1994). Para esta investigação, foi utilizada a técnica de *Western blotting*, empregando-se anticorpos de coelho anti-nNOS, iNOS e eNOS em ratos expostos cronicamente ao etanol e ao tratamento com 7-NI.

No que tange ao tratamento com etanol e aos efeitos sobre o imunoconteúdo de NOS no hipocampo e cerebelo, poucos são os dados existentes. Foram examinados os efeitos de uma dieta alcoólica padrão (FERREIRA, 2000; FERREIRA et al., 2001), em ratos adultos, durante 16 dias, em relação à expressão das subunidades de receptores glutamatérgicos e da enzima nNOS. De acordo com os resultados deste estudo, não foi observada nenhuma alteração na expressão das subunidades dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA, ocorrendo o mesmo para as subunidades dos receptores AMPA e cainato e para a enzima NOS avaliada, embora os animais manifestassem claros sintomas de abstinência ao serem privados de etanol. Esses autores atribuíram a divergência encontrada em relação a

outros trabalhos referidos na literatura ao tipo de paradigma usado para a exposição ao etanol. Além disso, foi sugerido que as alterações funcionais possam ser mediadas por outros mecanismos, como modificações pós-tradução (FERREIRA, 2000; FERREIRA et al., 2001).

Uma vez que esses autores empregaram uma dieta líquida, fornecida à noite aos animais (FERREIRA, 2000; FERREIRA et al., 2001), em nosso estudo, utilizamos um esquema diferente, injetando as drogas, por via i.p., antes do teste comportamental, considerando que, possivelmente, desta forma, o tratamento causaria alguma alteração no imunocontéudo da NOS, o que poderia ser detectado através da técnica de *Western blotting*. Além da nNOS, também os imunocontéudos de eNOS e iNOS foram avaliados.

Apesar da maioria dos experimentos anteriores envolvendo a tolerância rápida ao etanol terem sido desenvolvidos com ratos submetidos à cirurgia i.c.v., neste estudo, era necessário saber qual(is) da(s) isoforma(s) da NOS poderia(m) estar envolvida(s) no tratamento crônico com o etanol e com 7-NI. Se utilizássemos animais submetidos à cirurgia estereotáxica, não poderíamos descartar a possibilidade de que a gliose produzida no cérebro dos animais pudesse implicar um aumento da NOS induzida e, conseqüentemente, toda a cascata que envolve as outras isoformas. Assim, tanto o etanol quanto o 7-NI e veículo foram administrados por via i.p., sendo as doses das drogas as mesmas já administradas anteriormente (2,7 g/Kg de etanol; 12 mg/Kg de 7-NI).

Ao contrário do que se presumia, no presente estudo, não foram encontradas diferenças no imunocontéudo de nNOS, iNOS e eNOS, nos homogenatos hipocampais dos diferentes grupos de animais submetidos ao tratamento com etanol, associado ou não com 7-NI por 15 dias. Fica o questionamento se, aumentando os dias de tratamento com etanol e/ou 7-NI, seriam obtidos outros resultados, e se, alterando o tempo decorrido da última administração com o etanol e/ou fármaco até o momento do sacrifício dos animais, haveria outra resposta em relação ao imunocontéudo. Levando em conta este resultado, pode-se sugerir que a

exposição crônica a drogas, não necessariamente, ou nem sempre, está associada com alterações nos níveis protéicos de NOS, existindo outros mecanismos adaptativos envolvidos. Também em hipocampo de ratos, Keita e colaboradores (2000) observaram que o riluzol diminuiu a atividade da enzima sem alterar a expressão protéica de nNOS.

Quanto à imunodeteção das três isoformas no cerebelo, percebe-se uma diminuição do imunoconteúdo no grupo tratado cronicamente com 7-NI que nunca recebeu etanol, em comparação com os demais grupos. Os ratos que receberam o mesmo tratamento com 7-NI e salina por 15 dias, mas no último dia foram sacrificados, 6 horas após a administração de etanol, não apresentaram alteração no imunoconteúdo quando comparados aos demais grupos. Isto sugere que o etanol administrado no último dia no grupo cronicamente tratado com 7-NI impediu a alteração do imunoconteúdo desta enzima.

No caso da eNOS, em um outro grupo de animais, que recebeu apenas etanol e veículo cronicamente, também foi observada uma redução significativa em seu imunoconteúdo, em comparação com o grupo controle. Considera-se que seria interessante confirmar se um aumento no número de animais de cada grupo da amostra reproduziria os mesmos resultados obtidos com os homogenatos de cerebelo.

Analisados em conjunto, nossos resultados com respeito à avaliação dos imunoconteúdos das três isoformas de NOS, após diferentes tratamentos crônicos com etanol e/ou 7-NI, não se correlacionam com os resultados comportamentais obtidos com esses animais. Em outras palavras, o bloqueio da tolerância por 7-NI não parece estar diretamente associado com alterações no imunoconteúdo das NOS.

Em relação aos efeitos do etanol na expressão ou imunoconteúdo da NOS em outros estudos, verificou-se tanto um aumento como redução, dependendo da espécie ou do órgão investigado. A exposição ao etanol levou ao aumento de 2 a 3 vezes no nível da eNOS em placenta humana. Ao mesmo tempo, o conteúdo de GMPC do tecido e a liberação de NO

estavam diminuídos pelo fato de o NO ser desviado para seqüestrar radicais livres. O aumento da expressão de eNOS pode ser uma resposta a uma elevada demanda de NO (KAY et al., 2000). Por outro lado, a exposição crônica ao etanol no período pré-natal suprimiu a atividade enzimática de NOS, mas não afetou a expressão das isoformas nNOS e eNOS analisadas no hipocampo de cobaias (KIMURA et al., 1999). Outros estudos mostraram que a anestesia com riluzol reduz a atividade, mas não altera a expressão protéica de nNOS no hipocampo de ratos, evidenciando que sua ação não altera irreversivelmente a estrutura da enzima (KEITA et al., 2000).

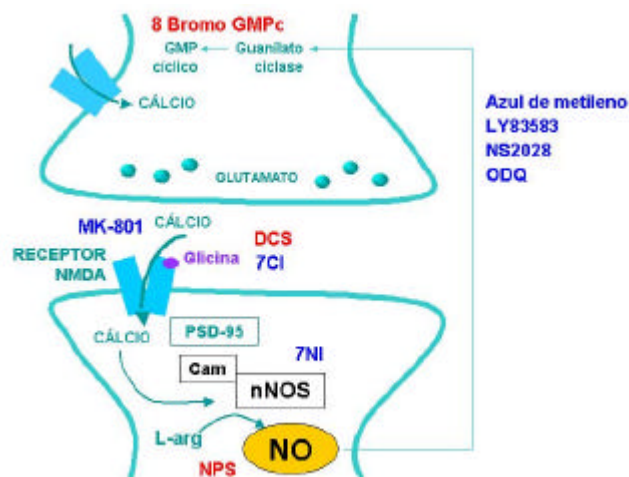
Assim, os dados relativos ao estudo do imunoconteúdo ou da expressão das isoformas de NOS após a exposição ao etanol devem ser analisados com cautela, pois nem sempre podem refletir a atividade de NOS nos tecidos.

Segundo os resultados, a tolerância rápida induzida pelo etanol envolve a ativação do receptor NMDA, promovendo aumento nos níveis de NO, que, por sua vez, via ativação da GCs, eleva a síntese de GMPc. Além disso, o envolvimento do NO na tolerância rápida, descrito aqui, pode ser relacionado a diferentes sistemas de neurotransmissores.

Concluindo, nos parâmetros fisiológicos e comportamentais analisados, os resultados do presente trabalho confirmam o envolvimento do receptor NMDA na tolerância rápida ao etanol, já que a DCS a intensificou e que antagonistas deste receptor a bloquearam, sugerindo ainda uma conexão deste sistema com o NO. Os dados aqui apresentados demonstram que o NO está envolvido na tolerância ao etanol, já que o 7-NI bloqueou a tolerância rápida tanto no modelo do plano inclinado quanto no da temperatura corporal. Ademais, outros ensaios do presente estudo avaliando a coordenação motora reforçam a hipótese do envolvimento do NO na tolerância, visto que o gerador de NO, NPS, intensificou a tolerância rápida ao etanol. No que concerne à exposição crônica ao etanol, não houve alteração do imunoconteúdo das isoformas de NOS no hipocampo quando o 7-NI foi associado ao tratamento, nem quando

administrado isoladamente. Isto aponta que nem sempre o tratamento prolongado com drogas altera a expressão e os níveis protéicos da enzima, havendo outros mecanismos envolvidos.

Como ainda não existe um tratamento preconizado como o mais adequado e eficaz para a dependência e os malefícios que o etanol acarreta, são indispensáveis estudos que complementem os dados referentes à tolerância, dependência e dano cerebral conseqüentes da ingestão de etanol, relacionando-os a vias e aos vários sistemas de neurotransmissores, receptores e NO. Deste modo, é possível que fármacos mais seletivos que atuam no receptor NMDA e nas vias nitrérgicas possam vir a ser utilizados clinicamente no tratamento do alcoolismo.



Esquema III: Provável mecanismo de ação envolvendo a interação NMDA e as vias do NO.

7 CONCLUSÕES

1) O agonista parcial do sítio da glicina, DCS, administrado por via i.c.v., facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol no teste da incoordenação motora e da hipotermia.

2) O antagonista não competitivo do receptor NMDA, ⁽⁺⁾MK-801, bloqueou a tolerância rápida à incoordenação motora e à hipotermia, enquanto que o isômero óptico menos ativo, ⁽⁻⁾MK-801, avaliado no plano inclinado, não interferiu no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

3) O antagonista seletivo do sítio da glicina no receptor NMDA, ácido 7-cloro quinurênico, bloqueou a tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol, como também a facilitação da tolerância induzida por DCS.

4) O inibidor preferencial de nNOS, 7-NI, administrado por via i.p. e/ou i.c.v., bloqueou totalmente a tolerância rápida à incoordenação motora e à hipotermia, induzida pelo etanol. Em ensaios adicionais, ratos testados no modelo do plano inclinado foram previamente tratados por via i.p. e i.c.v. com o precursor de NO, L-Arg, que reverteu o bloqueio ocasionado pelo 7-NI. O mesmo não ocorreu quando L-Arg foi substituída por D-Arg.

5) Os bloqueadores da guanilato ciclase solúvel: azul de metileno, LY83583, NS2028 e ODQ foram avaliados na incoordenação motora e impediram totalmente a tolerância rápida ao etanol.

6) O gerador de NO, NPS, e o análogo de GMPc, 8-Br GMPc, testados no modelo do plano inclinado, facilitaram o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

7) O tratamento crônico com etanol, avaliado no modelo do plano inclinado, promoveu o desenvolvimento da tolerância, confirmando dados anteriores de que a tolerância rápida possa prever o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol. Quando o 7-NI também foi injetado, houve nítido bloqueio da tolerância.

8) O 7-NI não interferiu na alcoolemia dos animais, evidenciando que os efeitos do fármaco sobre a incoordenação motora do etanol envolvem mecanismos farmacodinâmicos.

9) De modo geral, os resultados referentes à avaliação dos imunocorrelatos das 3 isoformas de NOS, após diferentes tratamentos crônicos com etanol e/ou 7-NI, não se correlacionam com os resultados comportamentais obtidos com esses animais. Isto parece indicar que a avaliação do imunocorrelato não reflete a atividade de NOS e os níveis de NO.

10) Analisados em conjunto, os resultados do presente trabalho reforçam a participação do receptor NMDA e do NO na tolerância rápida ao etanol e demonstram que os fármacos interferem de forma similar nos testes do plano inclinado e da hipotermia. Além disso, os dados obtidos sugerem o envolvimento da via GMPc do NO no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACQUAS, E.; MELONI, M.; DI CHIARA, G. Blockade of delta-opioid receptors in the nucleus accumbens prevents ethanol-induced stimulation of dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 230, n. 2, p. 239-241, 1993.

ADAMS, M. L.; CICERO, T.J. Alcohol intoxication and withdrawal: the role of nitric oxide. *Alcohol*, v. 16, n. 2, p. 153-8, 1998.

_____; KALICKI, J.M.; MEYER, E.R.; CICERO, T.J. Inhibition of morphine withdrawal syndrome by a nitric oxide synthase inhibitor, N^G-nitro-L-arginine methyl ester. *Life Sci.*, v. 52, p. 245-9, 1993.

_____; MEYER, E. R.; SEWING, B. N.; CICERO, T. J. Effects of nitric oxide-related agents on alcohol narcosis. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 18, p. 969-975, 1994.

_____; NOCK, B.; TRUONG, R.; CICERO, T.J. Nitric oxide control of steroidogenesis: endocrine effects of NG-nitro-L-arginine and comparisons to alcohol. *Life Sci.*, v. 50, n. 6, p. 35-40, 1992.

_____; SEWING, B.N.; CHEN, J.; MEYER, E.R.; CICERO, T.J. Nitric-oxide related agents alter alcohol withdrawal in male rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 19, p. 195-9, 1995.

AGARWAL, D.P. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol. Biol.*, v. 49, n. 9, p. 703-709, 2001.

AGUAYO, L.G. Ethanol potentiates the GABAA-activated Cl⁻ current in mouse hippocampal and cortical neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 187, n. 1, p. 127-130, 1990.

AKESSON, E.; KJAELDGAARD, A.; SAMUELSSON, E.B.; SEIGER, A.; SUNDSTROM, E. Iontropic glutamate receptor expression in human spinal cord during first trimester development. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, v. 119, n. 1, p. 55-63, 2000.

ALABADÍ, J. A.; THIBAUT, J-L.; PINARD, E.; SEYLAZ, J.; LASBENNES, F. 7-Nitroindazole, a selective inhibitor of nNOS, increases hippocampal extracellular glutamate concentration in status epilepticus induced by kainic acid in rats. *Brain. Res.*, v. 839, p. 305-312, 1999.

ALKANA, R. L.; FINN, D.A.; MALCOLM, R. D. The importance of experience in the development of tolerance to ethanol hypothermia. *Life Sci.*, v. 32, n. 23, p. 2685-2692, 1983.

ALLAN, A.M.; HARRIS, R.A. Acute and chronic ethanol treatments alter GABA receptor-operated chloride channels. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 27, n. 4, p. 665-670, 1987.

_____; HARRIS, R.A. Gamma-aminobutyric acid and alcohol actions: neurochemical studies of long sleep and short sleep mice. *Life Sci.*, v. 39, n. 21, p. 2005-2015, 1986.

ALTMAN, J.; EVERITT, B. J.; GLAUTIER, S.; MARKOU, A.; NUTT, D.; ORETTI, R.; PHILLIPS, G. D.; ROBBINS, T. W. The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate. *Psychopharmacol.*, v. 125, p. 285-345, 1996.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV). Washington, DC: American Psychiartric Association Publishers, 1994.

ANDERSSON, O.; STENQVIST, A.; ATTERSAND, A.; VON EULER, G. Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics*, v. 78, n. 3, p. 178-184, 2001.

AOKI, E.; TAKEUCHI, I.K.; SHOJI, R. Nitric oxide: an attractive signaling molecule. *Acta Histochem. Cytochem.*, v. 28, p. 97-106, 1995.

ARAGON, C.M.; ROGAN, F.; AMIT, Z. Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase – H₂O₂ system. *Biochem. Pharmacol.*, v. 44, n. 1, p. 93-98, 1992.

ARVOLA, A.; SAMMALISTO, L.; WALLGREN, H. A test for level of alcohol intoxication in the rat. *Q. J. Stud. Alcohol*, v. 19, p. 563-572, 1958.

ASAI, H.; IMAOKA, S.; KUROKI, T.; MONNA, T.; FUNAE, Y. Microsomal ethanol oxidizing system activity by human hepatic cytochrome P450s. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 277, n. 2, p. 1004-1009, 1996.

BALDO, B.A. Protein blotting: research, applications and its place in protein separation methodology In: *Advances in Electrophoresis*, ed. by A. Chranbach, M.J. Dunn and B.J. Radola, v.7, p. 407-478, VCH, 1994.

BARATTI, C.M.; KOPF, S.R. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.*, v. 65, p. 197-201, 1996.

BARE, D.J.; MCKINZIE, J.H.; MCBRIDE, W.J. Development of rapid tolerance to ethanol-stimulated serotonin release in the ventral hippocampus. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 22, n. 6, p. 1272-1276, 1998.

BARETTA, I. P.; ASSREUY, J.; DE LIMA, T. C. M. Nitric oxide involvement in the anxiogenic-like effect of substance P. *Behav. Brain Res.*, v. 121, n. 1-2, p. 199-205, 2001.

BARRETO, P. S. Influência do bloqueio do receptor NMDA e da síntese de óxido nítrico sobre a tolerância rápida ao etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. Florianópolis, SC, 1997. 105 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

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

BENJAMIN, D.; GRANT, E.R.; POHORECKY, L.A. Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. *Brain Res.*, v. 621, n. 1, p. 137-140, 1993.

BITRAN, M.; KALANT, H. Learning factor in rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 39, p. 917-922, 1991.

BLANDINA, P.; GOLDFARB, J.; CRADDOCK-ROYAL, B.; GREEN, J.P. Release of endogenous dopamine by stimulation of 5-hydroxytryptamine₃ receptors in rat striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 251, n. 3, p. 803-809, 1989.

BLOKLAND, A.; DE VENTE, J.; PRICKAERTS, J.; HONIG, W.; MARKERINK-VAN ITTERSUM, M.; STEINBUCH, H. Local inhibition of hippocampal nitric oxide synthase does not impair place learning in the Morris water escape task in rats. *Eur. J. Neurosci.*, v. 11, n. 1, p. 223-232, 1999.

BOBROVSKAIA, L.; ODELL, A.; LEAL, R.B.; DUNKLEY, P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. *Journal of Neurochemistry*, v. 78, p. 490-498, 2001.

BOCCA, L.; VALENTI, S.; CUTTICA, C.M.; SPAZIANTE, R.; GIORDANO, G.; GIUSTI, M. Nitric oxide biphasically modulates GH secretion in cultured cells of GH-secreting human pituitary adenomas. *Minerva Endocrinol.*, v. 25, p. 55-59, 2000.

BOURGUIGNON, J.P.; GERARD, A.; MATHIEU, J.; SIMONS, J.; FRANCHIMONT, P. Pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone from hypothalamic explants is restrained by blockade of N-methyl-D,L-aspartate receptors. *Endocrinology*, v. 125, n. 2, p. 1090-1096, 1989.

BREDT, D. S.; FERRIS, C.D.; SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 16, p. 10976-10981, 1992.

_____; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, v. 347, p. 768-770, 1990.

_____; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, v. 8, p. 3-11, 1992.

_____; _____. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, p. 682-685, 1990.

_____; _____. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, n. 22, p. 9030-9033, 1989.

BRENMAN, J.E.; BREDT, D.S. Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 7, n. 3, p. 374-378, 1997.

BRITTON, R.S.; VIDELA, L.A.; RACHAMIN, G.; OKUNO, F.; ISRAEL, Y. Effect of age on metabolic tolerance and hepatomegaly following chronic ethanol administration. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 8, n. 6, p. 528-534, 1984.

BROWNING, M.D.; BUREAU, M.; DUDEK, E.M.; OLSEN, R.W. Protein kinase C and camp-dependent protein kinase phosphorylate the beta subunit of the purified gamma-aminobutyric acid A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 87, n. 4, p. 1315-1318, 1990.

BULLOCK, C. The biochemistry of alcohol metabolism – a brief review. *Biochemical education*, v. 18, n. 2, p. 62-66, 1990.

BUNN, S.J.; SIM, A.T.R.; HERD, L.M.; AUSTIN, L.M.; DUNKLEY, P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: The role of intracellular calcium in the histamine HI stimulated phosphorylation of Ser⁸, Ser¹⁹, Ser³¹ and Ser⁴⁰. *Journal of Neurochemistry*. v.64, p.1370-1378, 1995.

BURNS, F.; STEVENS, P.A.; PYNE, N.J. The identification of apparently novel cyclic AMP cyclic GMP phosphodiesterase activities in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, v. 113, p. 3-4, 1994.

CALAPAI, G.; MAZZAGLIA, G.; SAUTEBIN, L.; CONSTANTINO, G.; MARCIANO, M.C.; CUZZOCREA, S.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A.P. Inhibition of nitric oxide formation reduces voluntary ethanol consumption in the rat. *Psychopharmacol.*, v. 125, p. 398-401, 1996.

CALLAHAN, B.T.; RICAURTE, G.A. Effect of 7-nitroindazole on body temperature and methamphetamine-induced dopamine toxicity. *Neuroreport*, v. 9, n. 12, p. 2691-2695, 1998.

CAMPBELL, A.D.; MCBRIDE, W.J. Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 51, n. 4, p. 835-842, 1995.

CAPPELL, H.; LEBLANC, A. Tolerance to, and physical dependence on ethanol: why do we study them? *Drug Alcohol Depend.*, v. 4, p. 15-31, 1979.

CARBONI, E.; ACQUAS, E.; FRAU, R.; DI CHIARA, G. Differential inhibitory effects of a 5-HT₃ antagonist on drug-induced stimulation of dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 164, n. 3, p. 515-519, 1989.

CEBRID - CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Departamento de Psicobiologia. I Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil. São Paulo, 2001, 380p.

CHANDLER, L. J.; NORWOOD, D.; SUTTON, G. Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 23, n. 2, p. 363-370, 1999.

_____; HARRIS, R.A.; CREWS, F.T. Ethanol tolerance and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 19, p. 491-495, 1998.

_____; SUTTON, G.; NORWOOD, D.; SUMNERS, C.; CREWS, F.T. Chronic ethanol increases N-methyl-D-aspartate-stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.*, v. 51, n. 5, p. 733-740, 1997.

CHAPMAN, P.F.; ATKINS, C.M.; ALLEN, M.T.; HALEY, J.E.; STEINMETZ, J.E. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport* 3, p. 567-570, 1992.

CHATTERTON, J.E.; AWOBULUYI, M.; PREMKUMAR, L.S.; TAKAHASHI, H.; TALANTOVA, M.; SHIN, Y.; CUI, J.; TU, S.; SEVARINO, K.A.; NAKANISHI, N.; TONG, G.; LIPTON, S.A.; ZHANG, D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, v. 415, n. 6873, p. 793-798, 2002.

CHEN, C. S. A study of the alcohol-tolerance effect and an introduction of a new behavioural technique. *Psychopharmacology*, v. 12, n. 5, p. 433-440, 1968.

CHEN, C.C.; LU, R.B.; CHEN, Y.C.; WANG, M.F.; CHANG, Y.C.; LI, T.K.; YIN, S.J. Interaction between the functional polymorphisms of the alcohol-metabolism genes in the protection against alcoholism. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 65, n. 3, p. 795-807, 1999.

CHIN, J.H.; GOLDSTEIN, D.B. Effects of low concentration of ethanol on the fluidity of spin-labeled erythrocyte and brain membranes. *Mol. Pharmacol.*, v. 13, p. 435-441, 1977.

CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, v. 1, p. 623-634, 1988.

CÍCERO, T.J. Alcohol self-administration, tolerance and withdrawal in humans and animals: theoretical and methodological issues. In: RIGHER H.; CRABBE, J.C.Jr. eds. *Alcohol tolerance and dependence*. North Holland, Elsevier, p. 1-51, 1980.

COE, I.R.; YAO, L.; DIAMOND, I.; GORDON, A.S. The role of protein kinase C in cellular tolerance to ethanol. *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 46, p. 29468-29472, 1996.

COLLINGRIDGE, G. L.; BLISS, T.V. Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci.*, v. 18, p. 54-56, 1995.

_____; LESTER, R.A.J.: Excitatory amino acids receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* v. 40, p. 143-210, 1989.

COLLINS, E. & SIM, A.T.R. Regulation of neuronal PP1 and PP2A during development. *Methods in Molecular Biology*. v.93, p.79-102, 1998.

COTMAN, C.W.; MONAGHAN, D.T.; OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci.*, v. 10, p. 273-280, 1987.

COUZIGOU, P.; COUTELLE, C.; FLEURY, B.; IRON, A. Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes, alcoholism and alcohol related disease. *Alcohol Alcohol. Suppl.*, 2, p. 21-27, 1994.

CRABBE, J.C.; RIGTER, H.; UIJLEN, J.; STRIJBOS, C. Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 208, p. 128-133, 1979.

_____; PHILLIPS, T.J.; FELLER, D.J.; HEN, R.; WENGER, C.D.; LESSOV, C.N.; SCHAFER, G.L. Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT_{1B} serotonin receptors. *Nat. Genet.*, v. 14, n. 1, p. 98-101, 1996.

CREWS, F. T.; MORROW, L.; CRISWELL, H.; BREESE, G. Effects of ethanol on ion channels. *International Rev. Neurob.*, v. 39, p. 283- 367, 1996.

CROSSMAN, A.R.; NEARY, D. *Neuroanatomia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997

CUNNINGHAM, C.L.; BISCHOF, L.L. Stress and ethanol-induced hypothermia. *Physiol. Behav.*, v. 40, n. 3, p. 377-382, 1987.

DAVDA, R.K.; CHANDLER, L.J.; CREWS, F.T.; GUZMAN, N.J. Ethanol enhances the endothelial nitric oxide synthase response to agonists. *Hypertension*, v. 21, n.(6 Pt 2), p. 939-943, 1993.

DAVIS, R.L.; DERTIEN, J.; SYAPIN, P.J. Ethanol-induced modulation of inducible nitric-oxide synthase activity in human A172 astrocytoma cells. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 26, n. 9, p. 1404-1411, 2002.

DAVIS, T.P.; CULLING-BERGLUND, A.J.; GILLESPIE, T.J.; SMITH, T.L. Ethanol treatment alters beta-endorphin metabolism by purified synaptosomal plasma membranes. *Peptides*, v. 8, n. 3, p. 467-472, 1987.

DAWSON, T. M.; SASAKI, M.; GONZALEZ-ZULUETA, M.; DAWSON, V.L. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog. Brain Res.*, v. 118, p. 3-11, 1998.

_____; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.*, v. 14, p. 5147-5159, 1994.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; LONDON, E.D.; BREDET, D.S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 88, n. 14, p. 6368-6371, 1991.

DEITRICH, R.A.; BLUDEAU, P.; ERWIN, V.G. Phenotypic and genotypic relationships between ethanol tolerance and sensitivity in mice selectively bred for initial sensitivity to ethanol (SS and LS) or development of acute tolerance (HAFT and LAFT). *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 24, n. 5, p. 595-604, 2000.

_____; PALMER, J.D. Alcohol. In: BRODY, T.M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K.P.; NEW, H.C. *Human Pharmacology. Molecular to clinical*. Saint Louis, Mosby, v. 31, p. 423-433, 1995.

DEVAUD, L.L.; MORROW, A.L. Gender-selective effects of ethanol dependence on NMDA receptor subunit expression in cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 369, n. 3, p. 331-334, 1999.

DI CHIARA, G. Alcohol and dopamine. *Alcohol Health & Research World*, v. 21, p. 108 – 114, 1997.

DINERMAN, J.L.; STEINER, J.P.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.; SNYDER, S.H. Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology*, v. 33, n. 11, p. 1245-1251, 1994.

DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S.F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.*, v. 51, p. 7-61, 1999.

DIVAC, I.; RAMIREZ-GONZALEZ, J.A.; RONN, L.C.; JAHNSEN, H.; REGIDOR, J. NADPH-diaphorase (NOS) is induced in piramidal neurones of hippocampal slices. *Neuroreport*, v. 5, n. 3, p. 325-328, 1993.

DOHRMAN, D.P.; DIAMOND, I.; GORDON, A.S. The role of the neuromodulator adenosine in alcohol's actions. *Alcohol, Health & Research World*, v. 21, n. 2, p. 136-143, 1997.

DU, W.; HARVEY, J.A. The nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME facilitates associative learning. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 20, p. 1183-1195, 1996.

_____; WEISS, H.; HARVEY, J.A. Associative learning is enhanced by selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors and retarded by a nitric oxide donor in rabbit. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 150, p. 264-271, 2000.

EAST, S.J.; GARTHWAITE, J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine nitric oxide pathway. *Neurosci. Lett.*, v. 123, p. 17-19, 1991.

ECKLY, A.; LUGNIER, C. Role of phosphodiesterases III e IV in the modulation of vascular cyclic AMP content by the NO/cyclic GMP pathway. *Br. J. Pharmacol.*, v. 113, p. 445-450, 1994.

EIZIRIK D.; LEIJERSTAM F. The inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) in insulin-producing cells. *Diabete Metab.*, v. 20, p. 116-122, 1994.

ELIASSON, M. J.; HUANG, Z.; FERRANTE, R. J.; SASAMATA, M.; MOLLIVER, M. E.; SNYDER, S. H.; MOSKOWITZ, M. A. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J. Neurosci.*, v. 19, p. 5910-5918, 1999.

ERWIN, V.G.; MCCLEARN, G.E.; KUSE, A.R. Interrelationships of alcohol consumption, actions of alcohol and biochemical traits. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 13, n. 1, p. 297-302, 1980.

ESTEBAN, S.; MORANTA, D.; SASTRE-COLL, A.; MIRALLES, A.; GARCIA-SEVILLA, J.A. Withdrawal from chronic ethanol increases the sensitivity of presynaptic 5-HT(1A) receptors modulating serotonin and dopamine synthesis in rat brain in vivo. *Neurosci. Lett.*, 28, v. 326, n. 2, p. 121-124, 2002.

FAINGOLD, C.L.; N'GOUEMO, P.; RIAZ, A. Ethanol and neurotransmitter interactions – from molecular to integrative effects. *Prog. Neurobiol.*, v. 55, n. 5, p. 509-535, 1998.

FERNANDES, P.D.; ASSREUY, J. Oxído nítrico e sistema cardiovascular. *Ciência Hoje*, v. 18, p. 8-10, 1994.

FERREIRA, V. M. M. Efeitos da exposição de curta e longa duração ao etanol: participação das vias nitrérgicas e dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Florianópolis, 2000. 108 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

_____; FRAUSTO, S.; BROWNING, M.D.; SAVAGE, D.D.; MORATO, G.S.; VALENZUELA, C.F. Iontropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus: lack of an effect of a long-term ethanol exposure paradigm. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 25, n. 10, p. 1536-1541, 2001.

_____; MORATO, G.S. D-cycloserine blocks the effects of ethanol and HA-966 in rats tested in the elevated plus-maze. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 21, p. 1638-1642, 1997.

_____; MORATO, G.S. Influence of age and of pre-treatment with D-cycloserine on the behavior of ethanol-treated rats tested in the elevated plus-maze apparatus. *Addiction Biology*, v. 1, p. 395-404, 1996.

_____; VALENZUELA, C. F.; MORATO, G. S. Role of nitric oxide-dependent pathways in ethanol-induced anxiolytic effects in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 23, n. 12, p. 1898-1904, 1999.

FIELD, L.; DILTS, R.V.; RAVICHANDRAN, R.; LENHERT, P.G.; CARNAHAN, G.E. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-DL-penicillamine, X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1, 1-dimethylethyl thionitrite. *J. Chem. Soc. Comm.*, p. 249-250, 1978.

FINN, D.A.; CRABBE, J.C. Exploring alcohol withdrawal syndrome. *Alcohol, Health & Research World*, v. 21, n. 2, p. 149-156, 1997.

FINN, P.R.; SHARKANSKY, E.J.; BRANDT, K.M.; TURCOTTE, N. The effects of familial risk, personality, and expectancies on alcohol use and abuse. *J. Abnorm. Psychol.*, v. 109, n. 1, p. 122-133, 2000.

FOLLESA, P.; TICKU, M.K. Chronic ethanol treatment differentially regulates NMDA receptor subunit mRNA expression in rat brain. *Mol. Brain Res.*, v. 29, n. 1, p. 99-106, 1995.

FORMIGONI, M.L.O.S.; MONTEIRO, M.G.; A etiologia do alcoolismo. In: RAMOS, S.P.; BERTOLOTE, J.M. *Alcoolismo hoje*. Porto Alegre, Artes Médicas, cap. 2, p. 33-43, 1997.

FORSTER, E.R.; SOUTHAM, E. The intrinsic and vagal extrinsic innervation of the rat stomach contains nitric oxide synthase. *Neuroreport*, v. 4, n. 3, p. 275-278, 1993.

FÖRSTERMANN, U. Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. *Arzneimittelfors-Chung*, v. 44, p. 402-407, 1994.

FREUND, G.; ANDERSON, K. J. Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 20, n. 7, p. 1165-1172, 1996.

FREZZA, M.; DI PADOVA, C.; POZZATO, G.; TERPIN, M.; BARAONA, E.; LIEBER, C.S. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *N. Engl. J. Med.*, v. 322, n. 2, p. 95-99, 1990.

FROEHLICH, J.C. Genetic factors in alcohol self-administration. *J. Clin. Psychiatry* 56 Suppl. 7, p. 15-23, 1995.

_____. Opioid peptides. *Alcohol, Health & Research World*, v. 21, n. 2, p. 132-136, 1997.

_____; LI, T.K. Opioid involvement in alcohol drinking. *Ann. NY. Acad. Sci.*, v. 739, p. 156-167, 1994.

GARCIA-PASCUAL, A.; COSTA, G.; LABADIA, A.; JIMENEZ, E.; TRIGUERO, D. Differential mechanisms of urethral smooth muscle relaxation by several NO donors and nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 360, p. 80-91, 1999.

GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid receptors and guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate in incubated slices of immature and adult rat cerebellum. *Neuroscience*, v. 7, n. 10, p. 2491-2497, 1982.

_____. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurol. Sci.*, v. 14, p. 60-67, 1991.

_____; BOULTON, C. L. Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 57, p. 683-706, 1995.

_____; GARTHWAITE, G.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 172, n. 4-5, p. 413-416, 1989.

GELLERT, J.; TESCHKE, R. The biochemistry of alcohol metabolism. *Z. Gastroenterol. Suppl.*, 3, p. 22-27, 1988.

GERSTIN, E.H.; MCMAHON, T.; DADGAR, J.; MESSING, R.O. Protein kinase C δ mediates ethanol-induced up-regulation of L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 26, p. 16409-16414, 1998.

GESSA, G.L.; MUNTONI, F.; COLLU, M.; VARGIU, L.; MEREU, G. Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.*, v. 348, n. 1, p. 201-203, 1985.

GIBALDI, M. What is nitric oxide and why are so many people studying it? *J. Clin. Pharmacol.*, v. 33, p. 488-496, 1993.

GIVENS, B.S.; BREESE, G.R. Electrophysiological evidence that ethanol alters function of medial septal area without affecting lateral septal function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 253, n. 1, p. 95-103, 1990.

GOLDBERG, L. Quantitative studies of alcohol tolerance in man. The influence of ethyl alcohol on sensory, motor and psychological functions referred to blood alcohol in normal and habituated individuals. *Acta Physiol. Scand.*, v. 5, n. 16, p. 1-128, 1943.

GONZALES, C.; CRUZ, M.A.; GALLARDO, V.; MIGUEL, P.; CARRASCO, G. Relative potency of nitro vasodilators on human placental vessels from normal and preeclamptic pregnancies. *Gynecol Obstet Invest*, 43: 219-224, 1997.

GONZALES, R. A.; JAWORSKI, J. N. Alcohol and glutamate. *Alcohol, Health & Research World*, v. 21, n. 2, p. 120-126, 1997.

_____; WOODWARD, J.J. Ethanol inhibits N-Methyl-D-Aspartate stimulated [3H]Norepinephrine release from rat cortical slices. *The J. of Pharmacol. and Experim. Ther.*, v. 253, n. 3, p. 1138-1144, 1990.

GORDON, A.S.; COLLIER, K.; DIAMOND, I. Ethanol regulation of adenosine receptor-stimulated cAMP levels in a clonal neural cell line: an in vitro model of cellular tolerance to ethanol. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 83, n. 7, p. 2105-2108, 1986.

GOTHERT, M.; FINK, K. Inhibition of N-methyl-D-aspartate (NMDA)- and L-glutamate-induced noradrenaline and acetylcholine release in the rat brain by ethanol. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 340, p. 516-521, 1989.

GRAEFF, F.G. Abuso e dependência de drogas. In: GRAEFF, F.G; GUIMARÃES, F.S. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo, Atheneu, , cap. 10, p. 197-221, 1999.

GRANT, K.A. Emerging neurochemical concepts in the action of ethanol at ligand-gated ion channels. *Behav. Pharmacol.*, v. 5, p. 383-404, 1994.

_____; LOVINGER, D.M. Cellular and behavioral neurobiology of alcohol: receptor-mediated neuron process. *Clin. Neurosci.*, v. 3, n. 3, p. 155-164, 1995.

GROSSMAN, A.B.; ROSSMANITH, W.G.; KABIGTING, E.B.; CADD, G.; CLIFTON, D.; STEINER, R.A. the distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotropin-releasing hormone neurons. *J. Endocrinol.*, v. 140, n. 2, p. 5-8, 1994.

GROVER, C.A.; FRYE, G.D.; GRIFFITH, W.H. Acute tolerance to ethanol inhibition of NMDA-mediated EPSPs in the CA1 region of the rat hippocampus. *Brain Res.*, v. 642, n. 1-2, p. 70-76, 1994.

GRYGLEWSKI, R.J Interactions between endothelial secretagogues. *Annals of Medicine*, v. 27, p. 421-427, 1995a.

_____. Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 77, p. 1-9, 1995b.

GUIMARÃES, F. S.; AGUIAR, J. C.; DEL BEL, E. A.; BALLEJO, G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport* 5, p. 1929-1932, 1994 .

HALEY, J.E.; WILCOX, G.L.; CHAPMAN, P.F. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron.*, v. 8, n. 2, p. 211-216, 1992.

HAN, Y. H. Why do alcoholics require more anesthesia? *Anesthesiology*, v. 30, p. 341-342, 1969.

HARADA, S.; AGARWAL, D.P.; GOEDDE, H.W. Aldehyde dehydrogenase deficiency as cause of facial flushing reaction to alcohol in Japanese. *Lancet*, v. 2, n. 8253, p. 982, 1981.

HARRIS, R.A.; BAXTER, D.M., MITCHELL, M.A; HITZEMANN, R.J. Physical properties and lipid composition of brain membranes from ethanol tolerant-dependent mice. *Mol. Pharmacol.*, v. 25, p. 401-409, 1984.

_____; MCQUILKIN, S.J.; PAYLOR, R.; ABELIOVICH, A.; TONEGAWA, S.; WEHNER, J.M. Mutant mice lacking the γ isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of γ -aminobutyrate type A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 92, n. 9, p. 3658- 3662, 1995.

HAWKINS, R.D.; SON, H.; ARANCIO, O. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog. Brain Res.*, v. 118, p. 155-172, 1998.

HOBBS, A. J.; HIGGS, A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39: 191-220, 1999.

HODGE, C.W., MEHMERT, K.K.; KELLEY, S.P.; MCMAHON, T.; HAYWOOD, A.; OLIVE, M.F.; WANG, D.; SANCHEZ-PEREZ, A.M.; MESSING, R.O. Supersensitivity to allosteric GABA(A) receptor modulators and alcohol in mice lacking PCKepsilon. *Nat. Neurosci.*, v. 2, n. 11, p. 997-1002, 1999.

HODGES, H.; ALLEN, Y.; SINDEM, J.; MITCHELL, SN.; AREDNT. T.; LANTOS, P.; GRAY, J. A.; The effects of cholinergic drugs and cholinergic-rich foetal neural transplants on alcohol-induced deficits in radial maze performance in rats. *Behav Brain Res*, v. 43, p. 7-28, 1991.

HOFFMAN, M. A new role for gases: Neurotransmission. *Science*, v. 252, p. 1788, 1991.

HOFFMAN, P. L.; RABE, C. S.; GRANT, K. A.; VALVERIUS, P.; HUDSPITH, M.; TABAKOFF, B. Ethanol and the NMDA receptor. *Alcohol.*, v. 7, p. 229-231, 1990.

_____; RABE, C.S.; MOSES, F.; TABAKOFF, B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J. Neurochem.*, v. 52, p. 1937-1940, 1989.

_____; TABAKOFF, B. Ethanol and guanine nucleotide binding proteins: a selective interaction. *FASEB J.*, v. 4, n. 9, p. 2612-2622, 1990.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 17, p. 31-108, 1994.

HOLLOWAY, F.A.; BIRD, D.C.; HOLLOWAY, J.A.; MICHAELIS, R.C. Behavioral factors in development of tolerance to ethanol's effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 29, p. 105-113, 1988.

HOLSCHER, C. 7-Nitro indazole, a neuron-specific nitric oxide synthase inhibitor, produces amnesia in the chick. *Learn Mem.*, v. 1, n. 4, p. 213-216, 1994.

_____; MCGLINCHEY, L.; ANWYL, R.; ROWAN, M.J. 7-Nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. *Learn Mem.*, v. 2, n. 6, p. 267-278, 1996.

HOLTHUSEN, H.; ARNDT, J. O. Nitric oxide evokes pain at nociceptors of the paravascular tissue and veins in humans. *J. Physiol.*, v. 487 (Pt 1), p. 253-258, 1995.

HU, X. J.; FOLLESA, P.; TICKU, M. K. Chronic ethanol treatment produces a selective upregulation of the NMDA receptor subunit gene expression in mammalian cultured cortical neurons. *Mol. Brain Res.*, v. 36, n. 2, p. 211-218, 1996.

_____; TICKU, M. K. Chronic ethanol treatment upregulates the NMDA receptor function and binding in mammalian cortical neurons. *Mol. Brain Res.*, 30 (2): 347-356, 1995.

IMPERATO, A.; DI CHIARA, G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 239, n. 1, p. 219-228, 1986.

IORIO, K.R.; REINLIB, L.; TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. Chronic exposure of cerebellar granule cells to ethanol results in increased N-methyl-D-aspartate receptor function. *Mol. Pharmacol.*, 41 (6): 1142-1148, 1992.

ITZHAK, Y. Modulation of cocaine -and methamphetamine- induced behavioral sensitization by inhibition of brain nitric oxide synthase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 282, n. 2: 521-527, 1997.

_____; MARTIN, J.L. Blockade of alcohol-induced locomotor sensitization and conditioned place preference in DBA mice by 7-nitroindazole. *Brain Res.*, 858 (2): 402-407, 2000.

_____; _____; BLACK, M.D.; HUANG, P.L. The role of neuronal nitric oxide synthase in cocaine-induced conditioned place preference. *Neuroreport*, 9: 2485-2488, 1998.

IZQUIERDO, I. Long-term potentiation and the mechanisms of memory. *Drug Devel. Res.*, v. 30, p. 1-17, 1993.

JAVELLE, N.; BEROD, A.; RENAUD, B.; LAMBAS-SENAS, L. NO synthase inhibitors attenuate locus coeruleus catecholamine metabolism and behavior induced by morphine withdrawal. *Neuroreport*, v. 13, n. 5, p. 725-728, 2002.

JOHNSON, B.A.; CAMPLING, G.M.; GRIFFITHS, P.; COWEN, P.J. Attenuation of some alcohol-induced mood changes and the desire to drink by 5-HT₃ receptor blockade: a preliminary study in healthy male volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 112, n. 1, p. 142-144, 1993.

KADOWAKI, K.; KISHIMOTO, J.; LENG, G.; EMSON, P.C. Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-hypophysial system after chronic salt loading: evidence of a neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology*, v. 134, n. 3, p. 1011-1017, 1994.

KALANT, H. Current state of knowledge about the mechanisms of alcohol tolerance. *Addiction Biol.*, v. 1, p.133-141, 1996.

_____. Research on tolerance; what can we learn from history? *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 22, p. 67-76, 1998.

_____; KHANNA, J.M. Methods for the study of tolerance. *Mod. Meth. Pharmacol.*, v. 6, p. 43-46, 1990.

_____; LEBLANC, A.E. GIBBINS, R.J. Tolerance to, and dependence on, some nonopioid psychotropic drugs. *Pharmacol. Rev.*, v. 23, p. 135-191, 1971.

KALLURI, H.S.; MEHTA, A.K.; TICKU, M.K. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v. 58, n. 1-2, p. 221-4, 1998.

KAPUTLU, I.; UZBAY, I. T. L-NAME inhibits pentylentetrazole and strychnine-induced seizures in mice. *Brain Res.*, v. 753, p. 98-101, 1997.

KARCZ-KUBICHA, M.; LILJEQUIST, S. Effects of post-ethanol administration of NMDA and non-NMDA receptor antagonists on the development of ethanol tolerance in C57B1 mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 120, n. 1, p. 49-56, 1995.

KAY, H.H.; GRINDLE, K.M.; MAGNESS, R.R. Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 182, n. 3, p. 682-688, 2000.

KEITA, H.; BOCZKOWSKI, J.; SAMB, A.; LANONE, S.; LANG-LAZDUNSKI, L.; ROUELLÉ, D.; DESMONTS, J.M.; MANTZ, J. Anesthetic concentrations of riluzole inhibit neuronal nitric oxide synthase activity, but not expression, in the rat hippocampus. *Brain Res.*, v. 881, p. 237-240, 2000.

KEMP, J.A.; FOSTER, A.C.; LEESON, P.D.; PRIESTLEY, T.; TRIDGETT, R.; IVERSEN, L.L.; WOODRUFF, G.N. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, n. 17, p. 6547-6550, 1988.

KENDRICK, K. M.; GUEVARA-GUZMAN, R.; de La RIVA, C.; CHRISTENSEN, J.; OSTERGAARD, K.; EMSON, P.C. NMDA and kainate-evoked release of nitric oxide and classical transmitters in the rat striatum: *in vivo* evidence that nitric oxide may play a neuroprotective role. *Eur. J. Neurosci.*, v. 8, n. 12, p. 2619-2634, 1996.

KHANNA, J. M.; CAMPANELLI, C.; LÊ, A. D.; KALANT, H. Effect of raphe lesions on the development of chronic tolerance to pentobarbital and cross-tolerance to ethanol. *Psychopharmacology*, v. 91, p. 473-478, 1987.

_____; KALANT, H.; CHAU, A.; SHAH, G.; MORATO, G.S. Interaction between N-methyl-D-aspartate (NMDA) and serotonin (5-HT) on ethanol tolerance. *Brain Res. Bull.*, v. 35, p. 31-35, 1994a.

_____; KALANT, H.; SHAH, G.; CHAU, A. Effect of D-cycloserine on rapid tolerance to ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 45, n. 4, p. 983-986, 1993a.

_____; KALANT, H.; SHAH, G.; WEINER, J. A. Rapid tolerance as an index of chronic tolerance. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 38, p. 427-432, 1991a.

_____; MORATO, G. S.; FERREIRA, V. M. M. NMDA antagonists and tolerance to drugs affecting the central nervous system. *CNS Drug Reviews*, v. 5, n. 2, p. 165-176, 1999.

_____; MORATO, G.S.; CHAU, A.; SHAH, G. D-cycloserine enhances rapid tolerance to ethanol motor incoordination. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 52, p. 609-614, 1995a.

_____; SHAH, G.; CHAU, A. Effect of NMDA antagonists on rapid tolerance to ethanol under two different testing paradigms. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 57, n.4, p. 693-697, 1997.

_____; SHAH, G.; WEINER, J.; WU, P. H.; KALANT, H. Effect of NMDA antagonists on rapid tolerance to ethanol. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 230, n.1, p. 23-31, 1993b.

_____; WEINER, J.; KALANT, H.; CHAU, A.; SHAH, G. Ketamine blocks chronic but not acute tolerance to ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 42, p. 347-350, 1992a.

_____; WU, P.H., WEINER, J.; KALANT, H. NMDA antagonist inhibits rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, v. 26, p. 643-645, 1991b.

_____; CHAU, A.; SHAH, G. Characterization of the phenomenon of rapid tolerance to ethanol. *Alcohol*, v. 13, n. 6, p. 621-628, 1996.

_____; KALANT, H.; SHAH, G.; CHAU, A. Effect of (+) MK-801 and ketamine on rapid tolerance to ethanol. *Brain. Res. Bull.*, v. 28, n. 2, p. 311-314, 1992b.

_____; KALANT, H.; SHAH, G.; WEINER, J. Rapid tolerance as an index of chronic tolerance. *Pharmacol. Biochem. & Behavior*, v. 38, p. 427-432, 1991b.

_____; KALANT, H.; WEINER, J.; SHAH, G. Rapid tolerance and cross-tolerance as predictors of chronic tolerance and cross tolerance. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 41, p. 355-360, 1992c.

_____; MORATO, G.S.; CHAU, A.; SHAH, G. Influence of nitric oxide synthase inhibition on the development of rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, v. 37, n. 6, p. 599-604, 1995b.

_____; 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.*, v. 48, n. 3, p. 755-763, 1994b.

_____; MORATO, G.S.; SHAH, G.; CHAU, A.; KALANT, H. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bulletin*, v. 32, n. 1, p. 43-47, 1993c.

KIECHLE, F.L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology and detection. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 100, p. 567-575, 1993.

KIMES, A.S.; VAUPEL, D.B.; LONDON, E.D. Attenuation of some signs of opioid withdrawal by inhibitors of nitric oxide synthase. *Psychopharmacology*, v. 112, n. 4, p. 521-524, 1993.

KIMURA, K.A.; CHIU, J.; REYNOLDS, J.N.; BRIEN, J.F. Effect of chronic prenatal ethanol exposure on nitric oxide synthase I and III proteins in the hippocampus of the near-term fetal guinea pig. *Neurotoxicol. Teratol.*, v. 21, n. 3, p. 251-259, 1999.

KISS, J. P. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res. Bull.*, v. 52, p. 459-466, 2000.

_____; VIZI, E.S. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci.*, v. 24, n. 4, p. 211-215, 2001.

KITSON, K.E. Ethanol and acetaldehyde metabolism: past, present, and future. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 20 (8 Suppl), p. 82A-92A, 1996.

KIVASTIK, T.; RUTKAUSKAITE, J.; ZHARKOVSKY, A. Nitric oxide synthesis inhibition attenuates morphine-induced place preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 53, n. 4, p. 1013-1015, 1996.

KLECKNER, N. W.; DINGLEDINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, v. 241, p. 835-837, 1988.

KNYCH, E.T. Ethanol inhibits nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission in the anococcygeus muscle of the rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 18, n. 3, p. 566-570, 1994.

KOBAYASHI, T.; IKEDA, K.; KOJIMA, H.; NIKI, H.; YANO, R.; YOSHIKA, T.; KUMANISHI, T. Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Nat. Neurosci.*, v. 2, n. 12, 1091-1097, 1999.

_____; IKEDA, K.; KUMANISHI, T. Functional characterization of an endogenous *Xenopus* oocyte adenosine receptor. *Br. J. Pharmacol.*, v. 135, n. 2, p. 313-322, 2002.

KOLESNIKOV, Y.A.; PICK, C.G.; PASTERNAK, G.W. NG-nitro-L-arginine prevents morphine tolerance. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 221, n. 2-3, p. 399-400, 1992.

KORNAU, H.C.; SCHENKER, L.T.; KENNEDY, M.B.; SEEBURG, P.H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, v. 269, n. 5231, p. 1737-1740, 1995.

KOROS, E.; KOSTOWSKI, W.; BIENKOWSKI, P. Discriminative stimulus properties of ethanol in rats: studies on the role of nitric oxide. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 62, p. 607-612, 1999.

KOSTKA, P. Free radicals (nitric oxide). *Anal. Chem.*, v. 67, p. 411R-416R, 1995.

KUGLER, P.; DRENCKHAHN, D. Astrocytes and Bergmann glia as an important site of nitric oxide synthase I. *Glia*, v. 16, p. 165-173, 1996.

LAL, H.; PRATHER, P.L.; REZAZADEH, S.M. Potential role of 5-TH_{1C} and/or 5-HT₂ receptors in the mianserin-induced prevention of anxiogenic behaviors occurring during ethanol withdrawal. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 17, n. 2, p. 411-417, 1993.

LALLEMAND, F.; DE WITTE, P. L-NNA decreases cortical vascularization, alcohol preference and withdrawal in alcoholic rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 58, n. 3, p. 753-61, 1997.

LANÇA, A.J.; WU, P.H.; JUNG, B.; LIU, J.F.; NG, V.; KALANT, H. Differential increase in Fos immunoreactivity in hypothalamic and septal nuclei by arginine⁸-vasopressin and desglycinamide⁹-arginine⁸-vasopressin. *Neuroscience*, v. 91, n. 4, p. 1331-1341, 1999.

LANCASTER, F. E. Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection? A review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 16, p. 539-541, 1992.

LÊ, A. D.; KALANT, H. Influence of intoxicated practice on the development of acute tolerance to the motor impairment effect of ethanol. *Psychopharmacol.*, v. 106, p. 572-576, 1992.

_____; KALANT, H.; KHANNA, J. M. Influence of ambient temperature on the development and maintenance of tolerance to ethanol-induced hypothermia. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 25, p. 667-672, 1986a.

_____; KHANNA, J. M.; KALANT, H.; GROSSI, F. Tolerance to and cross-tolerance among ethanol, pentobarbital and chlordiazepoxide. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 24, n. 1, p. 93-98, 1986b.

_____; KHANNA, J. M.; KALANT, H.; LEBLANC, A.E. The effect of lesions in the dorsal, median and magnus raphe nuclei on the development of tolerance to ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 218, p. 525-529, 1981a.

_____; KALANT, H.; KHANNA, J.M. Roles of intoxicated practice in the development of ethanol tolerance. *Psychopharmacology*, v. 99, p. 366-370, 1989.

_____; KHANNA, J.M.; KALANT, H.; LEBLANC, A.E. Effect of modification of brain serotonin (5-HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA) on ethanol tolerance. *Psychopharmacology*, v. 75, n. 3, p. 231-235, 1981b.

_____; KIIANMAA, K. Characteristics of ethanol tolerance in alcohol drinking (AA) and alcohol avoiding (ANA) rats. *Psychopharmacology*, v. 94, p. 479-483, 1988.

LEAL, R.B.; CORDOVA, F.M.; HERD, L.; BOBROVSKAYA, L.; DUNKLEY, P.R. Lead-stimulated p38^{MAPK} – Dependent Hsp27 Phosphorylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 178, n. 1, p. 44-51, 2002.

LEI, S.Z.; PAN, Z.H.; AGGARWAL, S.K.; CHEN, H.S.; HARTMAN, J.; SUCHER, N.J.; LIPTON, S.A. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron.*, v. 8, p. 1087-1099, 1992.

LEMARQUAND, D.; PIHL, R.O.; BENKELFAT, C. Serotonin and alcohol intake, abuse and dependence: clinical evidence. *Biol. Psychiatry*, v. 36, n. 5, p 326- 337, 1994a.

_____; PIHL, R.O.; BENKELFAT, C. Serotonin and alcohol intake, abuse and dependence: findings of animal studies. *Biol. Psychiatry*, v. 36, n. 6, p 395- 421, 1994b.

LEONARD, T.O.; LYDIC, R. Nitric oxide synthase inhibition decreases pontine acetylcholine release. *Neuroreport*, v. 6, n. 11, p. 1525-1529, 1995.

LEWOHL, J.M.; WILSON, W.R.; MAYFIELD, R.D.; BROZOWSKI, S.J.; MORRISETT, R.A.; HARRIS, R.A. G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are targets of alcohol action. *Nat. Neurosci.*, v. 2, n. 12, p. 1084-1090, 1999.

LIEBER, C. S. Metabolism of ethanol and associated hepatotoxicity. *Drug and Alcohol Rev.* v. 10, p. 175 – 202, 1991.

_____. Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, v. 7, n. 3, p. 581-608, 1993.

_____. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt. Sinai J. Med.*, v. 67, n. 1, p. 84-94, 2000.

_____. Alcohol and the liver: metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury. *Acta Med. Scand. Suppl.*, v. 703, p. 11-55, 1985.

_____. Interaction of ethanol with drugs, hepatotoxic agents, carcinogens and vitamins. *Alcohol Alcohol.*, v. 25, n. 2-3, p. 157-176, 1990.

_____. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998) – a review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 23, n. 6, p. 991-1007, 1999.

_____. Susceptibility to alcohol-related liver injury. *Alcohol Alcohol. Suppl.*, v. 2, p. 315-326, 1994.

_____; DECARLI, L.M. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptative increase after ethanol feeding. *Science*, v. 162, p. 917-918, 1968.

_____; _____. Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. In vitro characteristics and adaptative properties in vivo. *J. Biol. Chem.*, v. 245, p. 2505-2512, 1970.

LINDROS, K.O.; STOWELL, A.; PIKKARAINEN, P.; SALASPURO, M. Elevated blood acetaldehyde in alcoholics with accelerated ethanol elimination. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13: Suppl. 1, p. 119-124, 1980.

LITTLETON, J. M. The assessment of rapid tolerance to ethanol. In: *Rigter H, Crabbe JC Jr, editors. Alcohol tolerance and dependence. Amsterdam: Elsevier/ North Holland*, p. 53-79, 1980.

LIU, J-G.; ANAND, K.J.S. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res. Rev.*, v. 38, p. 1-19, 2001.

LOVINGER, D. M.; WHITE, G.; WEIGHT, F. F.; Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, v. 243, p. 1721-1724, 1989.

_____. Interactions between ethanol and agents that act on the NMDA-type glutamate receptor. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 20, n. 8, p. 187A-191A, 1996.

_____; WHITE, G.; WEIGHT, F.F. NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J. Neurosci.*, 10; 1372-1379, 1990.

_____; _____. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science (Wash DC)*, v. 243, p. 1721 – 1724, 1989.

LUE, W.M.; SU, M.T.; LIN, W.B.; TAO, P.L. The role of nitric oxide in the development of morphine tolerance in rat hippocampal slices. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 383, n. 2, p. 129-135, 1999.

LYNCH, D.R.; GUTTMANN, R.P. NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr. Drug Targets*, v. 2, n. 3, p. 215-231, 2001.

MACDONALD, J.F.; BARTLETT, M.C.; MODY, I.; PAHAPILL, P.; REYNOLDS, J.N.; SALTER, M.W.; SCNEIDERMAN, J.H.; PENNEFATHER, P.S. Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurons. *J. Physiol.*, 432: 483-508, 1991.

MACHADO, J.D.; SEGURA, F.; BRIOSO, M.A.; BORGES, R. Nitric oxide modulates a late step of exocytosis. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 20274-20279, 2000.

MADISON, D.V.; MALENKA, R.C.; NICOLL, R.A. Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 14, p. 379-397, 1991.

MALIN, D.H.; LAKE, J.R.; SHENOI, M.; UPCHURCH, T.P.; JOHNSON, S.C.; SCHWEINLE, W.E.; CADLE, C.D. The nitric oxide synthesis inhibitor nitro-L-arginine (L-

NNA) attenuates nicotine abstinence syndrome in the rat. *Psychopharmacology*, v. 140, n. 3, p. 371-377, 1998.

MANZONI, O.; BOCKAERT, J. Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors. *J. Neurochem.*, v. 61, p. 368-370, 1993.

_____; PREZEAU, L.; MARIN, P.; DESHAGER, S.; BOCKAERT, J.; FAGNI, L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron*, v. 8, n. 4, p. 653-662, 1992.

MARDH, G.; FALCHUK, K.H.; AULD, D.S.; VALEE, B.L. Testosterone allosterically regulates ethanol oxidation by homo- and heterodimeric gamma-subunit-containing isozymes of human alcohol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 83, n. 9, p. 2836-2840, 1986.

MARSHALL, A.W.; KINGSTONE, D.; BOSS, M.; MORGAN, M.Y. Ethanol elimination in males and females: relationship to menstrual cycle and body composition. *Hepatology*, v. 3, n. 5, p. 701-706, 1983.

MASCIA, M.P.; MAIYA, R.; BORGHESE C.M.; LOBO, I.A.; HARA, K.; YAMAKURA, T.; GONG, D.H.; BECKSTEAD, M.J. Does acetaldehyde mediate ethanol action in the central nervous system? *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 25, n. 11, p. 1570-1575, 2001.

MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, v. 28, n. 3, p. 197-276, 1987.

MAYHAN, W.G.; DIDION, S.P. Acute effects of ethanol on responses of cerebral arterioles. *Stroke*, v. 26, n. 11, p. 2097-2101, 1995.

MCBAIN, C. J.; MAYER, M. L. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol. Rev.*, v. 74, p. 723-760, 1994.

MCCMAHON, T.; ANDERSEN, R.; METTEN, P.; CRABBE, J.C.; MESSING, R.O. Protein kinase C epsilon mediates up-regulation of N-type calcium channels by ethanol. *Mol. Pharmacol.*, v. 57, n. 1, p. 53-58, 2000.

MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 11, n. 9, p. 379-387, 1990.

MELLANBY, E. Alcohol: its absorption into and disappearance from the blood under different conditions. *Medical research committee, Special report series*, 31, Londres, 1919.

MERIKANGAS, K.R. The genetic epidemiology of alcoholism. *Psychol. Med.*, v. 20, n. 1, p. 11-22, 1990.

MIGAUD, M.; CHARLESWORTH, P.; DEMPSTER, M.; WEBSTER, L. C.; WATABE, A. M.; MAKHINSON, M.; HE, Y.; RAMSAY, M. F.; MORRIS, R. G. M.; MORRISON, J. H.; O'DELL, T. J.; GRANT, S. G. N. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*, v. 396, p. 433-439, 1998.

MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. GABA and the GABA_A receptor. *Alcohol, Health & Research World*, v. 21, n. 2, p. 127-131, 1997.

MIYAGAWA, A.; OKAMURA, H.; IBATA, Y. Coexistence of oxytocin and NADPH-diaphorase in magnocellular neurons of the paraventricular and the supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.*, v. 171, n. 1-2, p. 13-16, 1994.

MIYAMOTO, Y.; NODA, Y.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; FURUKAWA, H.; NABESHIMA, T. Involvement of nitric oxide in phencyclidine-induced place aversion and preference in mice. *Behav. Brain Res.*, v. 116, p. 187-196, 2000.

MOCHLY-ROSEN, D.; CHANG, F.H.; CHEEVER, L.; KIM, M.; DIAMOND, I.; GORDON, A.S. Chronic ethanol causes heterologous desensitization of receptors by reducing alpha's messenger RNA. *Nature*, v. 333, n. 6176, p. 848-850, 1988.

MONAGHAN, D.T.; COTMAN, C.W. distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J. Neurosci.*, v. 5, n. 11, p. 2909-2919, 1985.

_____; HOLETS, V.R.; TOY, D.W.; COTMAN, C.W. Anatomical distributions of four pharmacological distinct 3H-L-glutamate binding sites. *Nature*, v. 306, n. 5939, p. 176-179, 1983.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine nitric-oxide pathway. *New England Journal of Medicine*, v. 329, p. 2002-2012, 1993.

_____; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONTAGUE, P.R.; GANCAICO, C.D.; WINN, M.J.; MARCHASE, R.B.; FRIEDLANDER, M.J. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science*, v. 263, n. 5149, p. 973-977, 1994.

MONTI, J. M.; HANTOS, H.; PONZONI, A.; MONTI, D.; BANCHERO, P. Role of nitric oxide in sleep regulation: effects of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase, on sleep in rats. *Behav. Brain Res.*, v. 100, p. 197-205, 1999.

MONYER, H.; BURNASHEV, N.; LAURIE, D.J.; SAKMANN, B.; SEEBURG, P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, v. 12, n. 3, p. 529-540, 1994.

MOORE, M.S.; DEZAZZO, J.; LUK, A.Y.; TULLY, T.; SINGH, C.M.; HEBERLEIN, U. Ethanol intoxication in *Drosophila*: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the camp signaling pathway. *Cell*, v. 93, n. 6, p. 997-1007, 1998.

MORENO, A.; PARES, X. Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J. Biol. Chem.*, v. 266, n. 2, p. 1128-1133, 1991.

MORRIS, R.; SOUTHAM, E.; GITTINS, S.R.; DE VENTE, J.; GARTHWAITE, J. The NO-cGMP pathway in neonatal rat dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.*, v. 6, n. 5, p. 876-879, 1994.

MORRISETT, R.A.; SWARTZWELDER, H.S. Attenuation of hippocampal long-term potentiation by ethanol: a patch-clamp analysis of glutamatergic and GABAergic mechanisms. *J. Neurosci.*, v. 13, p. 2264-2272, 1993.

- MORSE, R.M.; FLAVIN, D.K. Definition of alcoholism. *JAMA*, v. 268, p. 1012-1014, 1992.
- MULLER, B.M.; KISTNER, U.; KINDLER, S.; CHUNG, W.J.; KUHLENDAHL, S.; FENSTER, S.D.; LAU, L.F.; VEH, R.W.; HUGANIR, R.L.; GUNDELFINGER, E.D.; GARNER, C.C. SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron.*, v. 17, n. 2, p. 255-265, 1996.
- MURAMATSU, T.; WANG, Z.C.; FANG, Y.R.; HU, K.B.; YAN, H.; YAMADA, K.; HIGUCHI, S.; HARADA, S.; KONO, H. Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and drinking behavior of Chinese living in Shanghai. *Hum. Genet.*, v. 96, n. 2, p. 151-154, 1995.
- NAASSILA, M.; BEAUGE, F.; DAOUST, M. Regulation of rat neuronal nitric oxide synthase activity by chronic alcoholization. *Alcohol & Alcoh.*, v. 32, n. 1, p. 13-17, 1997.
- NAKANE, M.; MITCHELL, J.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 180, n. 3, p. 1396-1402, 1991.
- NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, v. 258, n. 5082, p. 597-603, 1992.
- NARITA, M.; TAMAKI, H.; KOBAYASHI, M.; SOMA, M.; NARITA, M.; SUZUKI, T. Changes in Ca²⁺-dependent protein kinase C isoforms induced by chronic ethanol treatment in mice. *Neurosci. Lett.*, v. 307, p. 85-88, 2001.
- NATHAN, C.; XIE, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 13725-13728, 1994.
- NISHI, M.; HINDS, H.; LU, H.P.; KAWATA, M.; HAYASHI, Y. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J. Neurosci.*, v. 21, n. 23, RC 185, 2001.
- NOWICKI, J. P.; DUVAL, D.; POIGNET, H.; SCATTON, B. Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 204, p. 339-340, 1991.
- NUNEZ, E.; LOPEZ-CORCUERA, B.; MARTINEZ-MAZA, R.; ARAGON, C. Differential effects of ethanol on glycine uptake mediated by the recombinant GLYT1 and GLYT2 glycine transporters. *Br. J. Pharmacol.*, v. 129, n. 4, p. 802-810, 2000.
- NUTT, D. Alcohol and the brain. Pharmacological insights for psychiatrists. *Br. J. Psychiatry*, v. 175, p. 114-119, 1999.
- NUUTINEN, H.; LINDROS, K.O.; SALASPURO. Determinants of blood acetaldehyde level during ethanol oxidation in chronic alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 7, n. 2, p. 163-168, 1983.
- O'DELL, T. J.; HAWKINS, R. D.; KANDEL, E. R.; ARANCIO, O. Test of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 88, p.11285-11289, 1991.

OHKUMA, S.; KATSURA, M. Nitric oxide and peroxy-nitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Prog. Neurobiol.*, v. 64, n. 1, p. 97-108, 2001.

OLIVE, M.F.; HODGE, C.W. Co-localization of PKCepsilon with various GABA(A) receptor subunits in the mouse limbic system. *Neuroreport*, v. 11, n. 4, p. 683-687, 2000.

_____; MEHMERT, K.K.; MESSING, R.O.; HODGE, C.W. Reduced operant ethanol self-administration and *in vivo* mesolimbic dopamine responses to ethanol in PKCepsilon-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.*, v. 12, n. 11, p. 4131-4140, 2000.

ONOUE, S.; ENDO, K.; YAJIMA, T.; KASHIMOTO, K. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide regulates the basal production of nitric oxide in PC12 cells. *Life Sci.*, v. 71, n. 2, p. 205-214, 2002.

ORTIGA, R.M. Influência de vias dependentes do óxido nítrico presentes na substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral no efeito ansiolítico do álcool. Florianópolis, SC, 2002. 97 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, v. 54, p. 581-618, 1998.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

_____; HICKERY, M.S.; CHARLES, I.G.; MONCADA, S.; BAYLISS, M.T. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 193, n. 1, p. 398-405, 1993.

PANOCCA, I.; CICCOCIOPPO, R.; MOSCA, M.; POLIDORI, C.; MASSI, M. Effects of the dopamine D₁ receptor antagonist SCH 39166 on the ingestive behavior of alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 120, n. 2, p. 227-235, 1995a.

_____; _____; POLIDORI, C.; POMPEI, P.; MASSI, M. The 5-HT₄ receptor antagonist GR113808, reduces ethanol intake in alcohol-preferring rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 52, n. 2, p. 255-259, 1995b.

_____; _____; POLIDORI, C.; ROMAGNOLI, S.; FROLDI, R.; MASSI, M. Possible mechanism of action for the attenuation of ethanol intake induced by ritanserin in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 128, n. 2; p. 181-190, 1996.

PASTERNAK, G.W.; KOLESNIKOV, Y.A.; BABEY, A.M. Perspectives on the N-Methyl-D-Aspartate/Nitric oxide cascade and opioid tolerance. *Neuropsychopharmacology*, v. 13, n. 4, p. 309-313, 1995.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, 1997.

- PEROTTI, C.A.; NOGUEIRA, M.S.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CARNIO, E.C. Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 32, n. 11, p. 1381-1387, 1999.
- PERSSON, M.G.; GUSTAFSSON, L.E. Ethanol can inhibit nitric oxide production. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 224, n. 1, p. 99-100, 1992.
- PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, v.83, p 346-356, 1977.
- POPP, R.L.; LICKTEIG, R.L.; LOVINGER, D.M. Factors that enhance ethanol inhibition of N-Methyl-D-aspartate receptors in cerebellar granule cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 289, n. 3, p.1564-1574, 1999.
- PORTENOY, R. K. Tolerance to opioid analgesics: clinical aspects. *Cancer Surveys*, v. 21, p. 49-65, 1994.
- POZO, D.; REITER, R.J.; CALVO, J.R.; GUERRERO, J.M. Physiological concentrations of melatonina inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.*, v. 55, n. 24, p. 455-460, 1994.
- PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neur.*, v. 64, p. 51-68, 2001.
- PULVIRENTI, L.; SWERDLOW, N.R.; KOOB, G.F. Nucleus accumbens NMDA antagonist decreases locomotor activity produced by cocaine, heroin or accumbens dopamine, but not caffeine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 40, n. 4, p. 841-845, 1991.
- PYAPALI, G.K.; TURNER, D.A.; WILSON, W.A.; SWARTZWELDER, H.S. Age and dose-dependent effects of ethanol on the induction of hippocampal long-term potentiation. *Alcohol*, v. 19, n. 2, p. 107-111, 1999.
- QUINTANILLA, M.E.; CALLEJAS, O.; TAMPIER, L. Aversion to acetaldehyde: differences in low-alcohol-drinking (UchA) and high-alcohol-drinking (UchB) rats. *Alcohol* v. 26, n. 2, p. 69-74, 2002.
- _____; TAMPIER, L. Acetaldehyde metabolism by brain mitochondria from UchA and UchB rats. *Alcohol*, v. 12, n. 6, p. 519-524, 1995.
- _____; TAMPIER, L. Effect of naltrexone on acute tolerance to etanol in UchB rats. *Alcohol* v. 21, p. 245-249, 2000.
- RABE, C. S.; TABAKOFF, B. Glycine site-directed agonists reverse the actions of ethanol at the N-methyl-D-aspartase receptor. *Mol. Pharmacol.*, v. 38, n. 6, p. 753-757, 1990.
- RAND, M.J.; LI, C.G. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 57, p. 659-682, 1995.

RANDALL, R.D.; LEE, S.Y.; MEYER, J.H.; WITTENBERG, G.F.; GRUOL, D.L. Acute alcohol blocks neurosteroid modulation of synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampal slice. *Brain Res.*, v. 701, p. 238-248, 1995.

RECASENS, M. Putative molecular mechanisms underlying long term potentiation (LTP): the key role of excitatory amino acid receptors. *Therapie*, v. 50, p. 19-34, 1995.

REDOS, J.D.; CATRAVAS, G.N.; HUNT, W.A. Ethanol-induced depletion of cerebellar guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *Science*, v. 193, n. 4247, p. 58-59, 1976.

REED, C.L.; HOOD, K.E.; CORTES, D.A.; JONES, B.C. Genetic-environment analysis of sensitivity and acute tolerance to ethanol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 69, p. 461-467, 2001.

REYNOLDS, I.J.; MILLER, R.J. Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: interaction with polyamines. *Mol. Pharmacol.*, v. 36, n. 5, p. 758-765, 1989.

REZVANI, A.H.; GRADY, D.R.; PEEK, A.E.; PUCILOWSKI, O. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates alcohol consumption in two strains of alcohol-preferring rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 50, p. 265-270, 1995.

RICKARD, N.S.; GIBBS, M.E.; NG, K.T. Inhibition of the endothelial isoform of nitric oxide synthase impairs long-term memory formation in the chick. *Learn Mem.*, v. 6, n. 5, p. 458-466, 1999.

RISINGER, F.O.; BOYCE, J.M. 5-HT_{1A} receptor blockade and the motivational profile of ethanol. *Life Sci.*, v. 71, n. 6, p. 707-715, 2002.

ROBERTS, A.J.; KOOB, G.F. The neurobiology of addiction. *Alcohol, Health & Research World*, v. 21, n. 2, p. 101-106, 1997.

RODRIGUES, S.M.; SCHAFE, G.E.; LEDOUX, J.E. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *The Journal of Neur.*, v. 21, n. 17, p. 6889-6896, 2001.

ROMMELSPACHER, H.; SMOLKA, M.; SCHMIDT, L.G.; SAMOCHOWIEC, J.; HOEHE, M.R. Genetic analysis of the mu-opioid receptor in alcohol-dependent individuals. *Alcohol*, v. 24, n. 2, p. 129-135, 2001.

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.*, v. 20, n. 6, p. 1011-1015, 1996.

_____; KESSOVA, I.G.; TSYRLOV, I.B.; LIEBER, C.S. Respective roles of human cytochrome P-4502E1, 1A2, and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 22, n. 9, p. 2125-2132, 1998.

_____; TSYRLOV, I.B.; LIEBER, C.S. Azide inhibits human cytochrome P-4502E1, 1A2, and 3A4. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 25, n. 2, p. 253-260, 2001.

SAMSON, H.H.; HARRIS, R.A. Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 13, n. 5, p. 206-211, 1992.

_____; HODGE, C.W.; TOLLIVER, G.A.; HARAGUCHI, M. Effect of dopamine agonists and antagonists on ethanol-reinforced behavior: the involvement of the nucleus accumbens. *Brain Res. Bull.*, v. 30, n. 1-2, p. 133-141, 1993.

SANDI, C.; BORRELL, J.; GUAZA, C. Involvement of kappa type opioids on ethanol drinking. *Life Sci.*, v. 42, n. 10, p. 1067-1075, 1988.

SCHERZER, C.R.; LANDWEHRMEYER, G.B.; KERNER, J.A.; COUNIHAN, T.J.; KOSINSKI, C.M.; STANDAERT, D.G.; DAGGETT, L.P.; VELICELEBI, G.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the human brain: hippocampus and cortex. *J. Comp. Neurol.*, v. 390, n. 1, p. 75-90, 1998.

SCHMIDT, H.H.H.W.; GAGNE, G.D.; NAKANE, M.; POLLOCK, J.S.; MILLER, M.F.; MURAD, F. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions of nitrinergic signal transduction. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 40, n.10, p. 1439-1456, 1992.

SCHUCKIT, M. A. Genetic aspects of alcoholism. *Ann. Emerg. Med.*, v. 15, n. 9, p. 991-996, 1986.

_____. Reaction to alcohol as a predictor of alcoholism. *Alcohol Alcohol. Suppl.*, v. 2, p. 91-94, 1993.

_____. Studies of populations at high risk for alcoholism. *Psychiatr. Dev.*, v. 3, n. 1, p. 31-63, 1985.

_____. Studies of populations at high risk for the future development of alcoholism. *Prog. Clin. Biol. Res.*, v. 241, p. 83-96, 1987.

SCHULZ, R.; TRIGGLE, C.R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 15, p. 255-259, 1994.

SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V. Nitric oxide and synaptic function. *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 17, p. 153-183, 1994.

SELLERS, E.M.; TONEATTO, T.; ROMACH, M.K.; SOMER, G.R.; SOBELL, L.C.; SOBELL, M.B. Clinical efficacy of the 5-HT₃ antagonist ondasetron in alcohol abuse and dependence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 18, n. 4, p. 879- 885, 1994.

SHEININ, A.; SHAVIT, S.; BENVENISTE, M. Subunit specificity and mechanism of action of NMDA partial agonist D-cycloserine. *Neuropharmacol.*, v. 41, n. 2, p. 151-158, 2001.

SHERMAN, M.P.; AEBERHARD, E.E.; WONG, V.Z.; GRISCAVAGE, J.M.; IGNARRO, L.J. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 191, n. 3, p.1301-1308, 1993

SHIBUKI, K.; OKADA, D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*, v. 349, p. 326-328, 1991.

SMOLENSKI, A.; BURCKHARDT, A. M.; EIGENTHALER, M.; BUTT, E.; GAMBARYAN, S.; LOHMANN, S.; WALTER, U. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 358, p. 134-139, 1998.

SNELL, L.D.; BHAVE, S.V.; TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. Chronic ethanol exposure delays the 'development switch' of the NMDA receptor 2A and 2B subunits in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.*, v. 78, n. 2, p. 396-405, 2001.

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.*, p. 68-77, 1992.

_____. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science*, v. 257, n. 5069, p. 494-496, 1992.

SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP signaling pathway in rat brain. *Neuropharmacol.*, v. 32, n. 11, p. 1267-77, 1993.

SOUTHERN, C.; SCHULSTER, D.; GREEN, I. C. Inhibition of insulin secretion by interleukin-1- β and tumor necrosis factor- α via an L-arginine dependent nitric oxide generation mechanism. *FEBS Lett.*, v. 276, p. 42-44, 1990.

SPANAGEL, R.; SIEGMUND, S.; COWEN, M.; SCHROFF, K.C.; SCHUMANN, G.; FISEROVA, M.; SILLABER, I.; WELLEK, S.; SINGER, M.; PUTZKE, J. the neuronal nitric oxide synthase gene is critically involved in neurobehavioral effects of alcohol. *J. Neurosci.*, v. 22, n. 19, p. 8676-8683, 2002.

STEINER, A.A.; CARNIO, E.C.; BRANCO, L.G.S. Role of neuronal nitric oxide synthase in hypoxia-induced anapnoea in rats. *J. Appl. Physiol.*, v. 89, p. 1131-1136, 2000.

STEPHENSON, F.A. Subunit characterization of NMDA receptors. *Current Drug Targets*, v. 2; p. 233-239, 2001.

SUOKAS, A.; FORSANDER, O.; LINDROS, K. Distribution and utilization of alcohol-derived acetate in the rat. *J. Stud. Alcohol.*, v. 45, n. 5, p. 381-385, 1984.

SUZDAK, P.D.; SCHWARTZ, R.D.; SKOLNICK, P.; PAUL, S.M. Ethanol stimulates γ -aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneuroosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 83, n. 11, p. 4071-4075, 1986.

SYAPIN, P.J.; MILITANTE, J.D.; GARRETT, D.K.; REN, L. Cytokine-induced iNOS expression in C6 glial cells: transcriptional inhibition by ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 298, n. 2, p. 744-752, 2001.

SZABÓ, G.; TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. The NMDA receptor antagonist, dizocilpine, differentially affects environment-dependent and environment-independent ethanol tolerance. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 113, n. 3-4, p. 511-517, 1994.

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

_____; HELLEVUO, K.; HOFFMAN, P. L. Alcohol. In: SCHUSTER, C.R.; GUST, S.W.; KUHAR, M.J. *Handbook of experimental pharmacology. Pharmacological aspects of drug dependence*. Berlin, Springer-Verlag, cap. 11, p. 373-458, 1996.

_____; HOFFMAN, P. L. Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron.*, v. 16, n. 5, p. 909-912, 1996.

_____; HOFFMAN, P. L. Alcohol: neurobiology. In: LOWENSTEIN, J.H.; RUIZ, P.; MILLMAN, R.B. *Substance abuse: a comprehensive textbook*. Baltimore, Williams e Wilkins, cap. 13, p. 152-185, 1992.

_____; HOFFMAN, P. L. Neurobiology of alcohol. In: GALANTER, M.; KLEBER, H.D. *Textbook of substance abuse treatment*. Washington, American Psychiatric Press, cap. 1, p. 3-10, 1999.

TAMPIER, L.; QUINTANILLA, M.E. Effect of a dose of ethanol on acute tolerance and ethanol consumption in alcohol drinker (UchB) and non-drinker (UchA) rats. *Addict. Biol.*, v. 7, n. 3, p. 279-284, 2002a.

_____; _____. Effect of acetaldehyde on acute tolerance and ethanol consumption in drinker and nondrinker rats. *J. Stud. Alcohol.*, v. 63, n. 3, p. 257-262, 2002b.

THIELEN, R.J.; MORZORATI, S.L.; MCBRIDE, W.J. Effects of ethanol on the dorsal raphe nucleus and its projections to the caudate putamen. *Alcohol*, v. 23, n. 3, p. 131-139, 2001.

THOMASSON, H.R.; CRABB, D.W.; EDENBERG, H.J.; LI, T.K. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and alcoholism. *Behav. Genet.*, v. 23, n. 2, p. 131-136, 1993.

TOROPAINEN, M.; NÄKKI, R.; HONKANEN, A.; ROSENBERG, P.H.; LAURIE, D.J.; PELTO-HUIKKO, M.; KOISTINAHO, J.; ERIKSSON, C.J.P.; KORPI, E.R. Behavioral sensitivity and ethanol potentiation of the N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in a rat line selected for high ethanol sensitivity. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 21, n. 4, p. 666-671, 1997.

TREVISAN, L.; FITZGERALD, L.W.; BROSE, N.; GASIC, G.P.; HEINEMANN, S.F.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. Chronic ingestion of ethanol up-regulates NMDAR1 receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus. *J. Neurochem.*, v. 62, n. 4, p. 1635-1638, 1994.

UMENO, M.; SONG, B.J.; KOZAK, C.; GELBOIN, H.V.; GONZALEZ, F.J. The rat P450IIE1 gene: complete intron and exon sequence, chromosome mapping, and correlation of developmental expression with specific 5' cytosine demethylation. *J. Biol. Chem.*, v. 263, n. 10, p. 4956-4962, 1988.

UZBAY, I. T.; ERDEN, B. F.; TAPANYGIT, E. E.; KAYAALP, S. O. Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats. *Life Sci.* v. 61, p. 2197-2209, 1997.

_____; OGLESBY, M. W. Nitric oxide and substance dependence. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 25, p. 43-52, 2001.

VALENZUELA, C.F. Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol, Health & Research World*, v. 21, n. 2, p. 144-148, 1997.

VALTSCHANOFF, J.G.; WEINBERG, R.J.; KHARAZIA, V.N.; NAKANE, M.; SCHMIDT, H.H. Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide. *J. Comp. Neurol.*, v. 331, n. 1, p. 111-121, 1993.

VASSILJEV, V.; KALDA, A.; POKK, P.; VALI, M.; ZHARKOVSKY, A. The effects of the nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on ethanol pharmacokinetics in rats after acute and chronic ethanol administration. *Alcohol Alcohol.*, v. 33, n. 6, p. 609-615, 1998.

VERBANCK, P. M. P. The pharmacological treatment of alcoholism: from basic science to clinical medicine. *Alcohol Alcohol.*, v. 30, n. 6, p. 757-764, 1995.

VERDOORN, T.A.; KLECKNER, N.W.; DINGLEDINE, R. Rat brain N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, v. 238, n. 4830, p. 1114-1116, 1987.

VINCENT, S.R. Nitric oxide and synaptic plasticity: NO news from the cerebellum. *Behav. Brain Res.*, v. 19, p. 362-367, 1996.

VLADUTIU, A. O. Role of nitric oxide in autoimmunity. *Clin. Immunol. And Immunopatol.*, v. 76, p. 1-11, 1995.

VOGEL-SPROTT, M. Is behavioral tolerance learned?. *Alcohol, Health & Research World*, v. 21, n. 2, p. 161-168, 1997.

_____; RAWANA, E.; WEBSTER, R. Mental rehearsal of a task under ethanol facilitates tolerance. *Pharmacol. Bioch. Behav.*, v. 21, p. 329-331, 1984.

_____; SDAO-JARVIE, K. Learning alcohol tolerance: the contribution of response expectancies. *Psychopharmacology*, v. 98, p. 289-296, 1989.

WAGNER, F.W.; PARES, X.; HOLMQUIST, B.; VALLEE, B.L. Physical and enzymatic properties of a class III isoenzyme of human liver alcohol dehydrogenase: chi-ADH . *Biochemistry*, v. 23, n. 10, p. 2193-2199, 1984.

WAKABAYASHI, I.; NEGORO, M. Mechanism of inhibitory action of ethanol on inducible nitric oxide synthesis in macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, v. 366, n. 4, p. 299-306, 2002.

WALLER, M. B.; MCBRIDE, W. J.; LUMENG, L.; LI, T. K. Initial sensitivity and acute tolerance to ethanol in the P and NP lines of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 19, p. 683-688, 1983.

WANG, J.Y.; WANG, J.Y.; WANG, J.Y.; SHUM, A.Y.; HWANG, C.P. Ethanol modulates induction of nitric oxide synthase in glial cells by endotoxin. *Life Sci.*, v. 63, n. 17, p. 1571-1583, 1998.

WANG, S.Z.; ZHU, S.Z.; EL-FAKAHANY, E.E. efficient coupling of m5 muscarinic acetylcholine receptors to activation of nitric oxide synthase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 268, n. 2, p. 552-557, 1994.

WANG, X.; ROBINSON, P. J. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J. Neurochem.*, v. 68, p. 443-456, 1997.

WANG, Y.X.; PANG, C.C. Suppression by ethanol of pressor response caused by the inhibition of nitric oxide synthesis. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 233, n. 2-3, p. 275-278, 1993.

WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSON, P; HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 11, p. 25-33, 1990.

WEINER, H.; ARDELT, B. Distribution and properties of aldehyde dehydrogenase in regions of rat brain. *J. Neurochem.*, v. 42, n. 1, p. 109-115, 1984.

WEINER, J.L.; VALENZUELA, C.F.; WATSON, P.L.; FRAZIER, C.J.; DUNWIDDIE, T.V. Elevation of basal protein kinase C activity increases ethanol sensitivity of GABA_A receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurochem.*, v. 68, n. 5, p. 1949-1959, 1997.

WEISS, F.; PARSONS, L.H.; SCHULTEIS, G.; HYYTIA, P.; LORANG, M.T.; BLOOM, F.E.; KOOB, G.F. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J. Neurosci.*, v. 16, n. 10, p. 3474-3485, 1996.

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 (Berl)*, v. 133, n. 3, p. 256-261, 1997.

WISE, R.A. Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend.*, v. 51, p. 13-22, 1998.

WOOD, P.L. Pharmacology of the second messenger, cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate, in the cerebellum. *Pharmacol. Rev.*, v. 43, n. 1, p. 1-25, 1991.

WOODWARD, J. J.; GONZALES, R. A. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated endogenous dopamine release from rat striatal slices: reversal by glycine. *J. Neurochem.*, v. 54, n. 2, p. 712-715, 1990.

WOZNIAK, K.M.; PERT, A.; LINNOILA, M. Antagonism of 5-HT₃ receptors attenuates the effects of ethanol on extracellular dopamine. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 187, n. 2, p. 287-289, 1990.

WU, P.H.; LIU, J.F.; LANÇA, A.J.; KALANT, H. Selective involvement of central 5-HT₂ receptors in maintenance of tolerance to ethanol by arginine⁸-vasopressin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 270, n. 2, p. 802-808, 1994.

_____; LIU, J.F.; WU, W.L.; LANCA, A.J.; KALANT, H. Development of alcohol tolerance in the rat after a single exposure to combined treatment with arginine8-vasopressin and ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 276, n. 3, p. 1283-91, 1996.

XIA, J.; SIMONYI, A.; SUN, G. Y. Chronic ethanol and iron administration on iron content, neuronal nitric oxide synthase, and superoxide dismutase in rat cerebellum. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 23, p. 702-707, 1999.

XU, Z.Q.; PIERIBONE, V.A.; ZHANG, X.; GRILLER, S.; HOKFELT, T. A functional role for nitric oxide in locus coeruleus: immunohistochemical and electrophysiological studies. *Exp. Brain Res.*, v. 98, n. 1, p. 75-83, 1994.

YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. *Anesth. Analg.*, v. 77, p. 886-890, 1993.

YIN, S.J. Alcohol dehydrogenase: enzymology and metabolism. *Alcohol Alcohol. Suppl.*, v. 2, p. 113-119, 1994.

YOSHIDA, A.; HUANG, IY.; IKAWA, M. Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 81, n. 1, p. 258-261, 1984.

YOSHIMURA, M.; WU, P.H.; KIRSTEIN, S.L.; FREUND, R.K.; PALMER, M.R.; HOFFMAN, P.L.; TABAKOFF, B. Effects of ethanol on transgenic mice that overexpress type 7 adenylyl cyclase in brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 23, n. 5, p. 92A, 1999.

ZALESKI, M.J.B. Estudo do receptor GABA_A na aquisição da tolerância rápida ao etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. Florianópolis, SC, 1998. 99 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

_____; NUNES, J.R.F.; LEMOS, T.; MORATO, G.S. GABA_A receptors play a role in the development of tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology*, v. 153, p. 415-424, 2001.

ZHANG, J.; SNYDER, S.H. Nitric oxide in the nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 35, p. 213-233, 1995.

ZHANG, X.Q.; KWEK, K.; READ, M.A.; DONOGHUE, J.F.; WALTERS, W.A. Effects of nitrovasodilators on the human fetal-placental circulation in vitro. *Placenta*, v. 22, p. 337-346, 2001.

ZHUO, M.; SMALL, S. A.; KANDEL, E. R.; HAWKINS, R. D. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long term synaptic enhancement in hippocampus. *Science*, v. 260, p. 1946-1950, 1993.

ZIMA, T.; DRUGA, R.; STIPEK, S. The influence of chronic moderate ethanol administration on NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase) activity in rat brain. *Alcohol Alcohol.*, v. 33, p. 341-346, 1998.

ZIMATKIN, S.M.; DEITRICH, R.A. Ethanol metabolism in the brain. *Addiction Biology*, v. 2, p. 387-399, 1997.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 429, n. 1-3, p. 23-37, 2001.