



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

Adriana Dias Elpo Barbosa

**Estudo de fatores envolvidos na modulação da
tolerância aos efeitos do álcool por
neuroesteróides**

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

Florianópolis 2002.

**“ESTUDO DE FATORES ENVOLVIDOS NA MODULAÇÃO DA TOLERÂNCIA
AOS EFEITOS DO ÁLCOOL POR NEUROESTERÓIDES”**

POR

ADRIANA DIAS ELPO BARBOSA

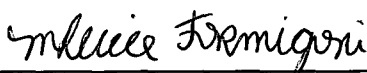
**Tese julgada e aprovada em sua forma
final, pelo Orientador e membros da
Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



Reinaldo Naoto Takahashi

FMC/UFSC - Presidente



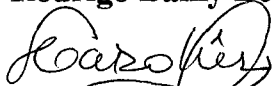
Maria Lúcia O. de Souza Formigoni

UNIFESP



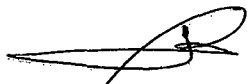
Rodrigo Bairy Leal

UFSC



Antônio de Pádua Carobrez

FMC/UFSC



Thereza C. M. L. Nogueira

FMC/UFSC



Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho
Sub-Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 22 de março de 2002.

*" O verdadeiro progresso da humanidade
está na conquista do conhecimento e
da paz"*

Dedicatória Especial

*Ao meu marido Cicero A.T. Barbosa, que
sempre acreditou em minhas realizações, e
por dar sentido a minha vida.*

Dedicatória

*A minha orientadora Dra. Gina S. Morato,
que me fez compreender que: "O saber só é
útil se compartilhado com todas as pessoas".*

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS E TABELA.....	xi
RESUMO.....	xiv
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. ALCOOLISMO.....	1
2. TOLERÂNCIA.....	5
3. ETANOL E SUA INTERAÇÃO COM NEUROTRANSMISSORES.....	10
3.1. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA E CRÔNICA DO ETANOL NO RECEPTOR GABA-A.....	11
3.2. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA E CRÔNICA DO ETANOL NO RECEPTOR NMDA.....	15
4. NEUROESTERÓIDES.....	19
4.1. NEUROESTERÓIDES E O RECEPTOR GABA-A.....	23
4.2. NEUROESTERÓIDES E O RECEPTOR NMDA.....	25
4.3. NEUROESTERÓIDES E ETANOL.....	28
II. HIPÓTESES.....	33
III. OBJETIVOS.....	34
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
1. ANIMAIS.....	36
2. DROGAS E REAGENTES.....	36
3. EQUIPAMENTOS.....	38
4. PROCEDIMENTO GERAL.....	39
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44

V. EXPERIMENTOS E RESULTADOS.....	46
Experimento 1: <i>Efeito de diferentes doses de etanol sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico.....</i>	47
Experimento 2: <i>Efeito do sulfato de pregnenolona e do sulfato de dehidroepiandrosterona sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.....</i>	49
Experimento 3: <i>Efeito da epipregnanolona e alotetrahidrodeoxicorticosterona sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.....</i>	53
Experimento 4: <i>Efeito do pré-tratamento com epipregnanolona sobre a facilitação da tolerância rápida ao etanol produzida pelo sulfato de pregnanolona e pelo sulfato de dehidroepiandrosterona no teste do rota-rod.....</i>	58
Experimento 5: <i>Efeito do pré-tratamento com epipregnanolona sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol produzida pela alotetrahidrodeoxicorticosterona no teste do rota-rod.....</i>	61
Experimento 6: <i>Efeito do pré-tratamento com epipregnanolona sobre a facilitação da tolerância rápida ao etanol produzida pelo sulfato de pregnanolona e pelo sulfato de dehidroepiandrosterona no teste da temperatura.....</i>	64
Experimento 7: <i>Efeito do pré-tratamento com epipregnanolona sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol produzida pela alotetrahidrodeoxicorticosterona no teste da temperatura.....</i>	67
Experimento 8: <i>Efeito da finasterida sobre a tolerância rápida ao etanol.....</i>	69
Experimento 9: <i>Efeito da indometacina sobre a tolerância rápida ao etanol.....</i>	72
Experimento 10: <i>Efeito da administração prévia de (+)bicuculina sobre a tolerância rápida ao etanol.....</i>	74

Experimento 11: <i>Efeito da administração prévia de (+)bicuculina sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pela epipregnanolona.....</i>	76
Experimento 12: <i>Efeito da administração prévia do sulfato de pregnenolona sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo (+)MK-801</i>	78
Experimento 13: <i>Efeito da administração de sulfato de pregnenolona antes ou após o teste sobre a tolerância rápida ao etanol no teste do rota-rod</i>	81
Experimento 14: <i>Efeito da administração de epipregnanolona antes ou após o teste sobre a tolerância rápida ao etanol no teste do rota-rod</i>	83
Experimento 15: <i>Efeito da administração de sulfato de pregnenolona antes ou após o teste sobre a tolerância rápida ao etanol no teste da temperatura.....</i>	86
Experimento 16: <i>Efeito da administração de epipregnanolona antes ou após o teste sobre a tolerância rápida ao etanol no teste da temperatura.....</i>	89
Experimento 17: <i>Efeito da administração de sulfato de pregnenolona nos dias 1 e/ou 2 sobre a tolerância rápida ao etanol no teste do rota-rod</i>	91
Experimento 18: <i>Efeito da administração do sulfato de pregnenolona nos dias 1 e/ou 2 sobre a tolerância rápida ao etanol no teste da temperatura.....</i>	94
Experimento 19: <i>Dosagem do álcool.....</i>	97
Experimento 20: <i>Efeito da administração de epipregnanolona sobre a tolerância crônica ao etanol.....</i>	100
Experimento 21: <i>Efeito da administração de sulfato de pregnenolona sobre a tolerância crônica ao etanol.....</i>	102
Experimento 22: <i>Imunoquantificação da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA-A durante o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol em animais tratados com neuroesteróides.....</i>	104

VI. DISCUSSÃO.....	107
VII. CONCLUSÕES.....	133
VIII. ABSTRACT.....	135
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH	Álcool desidrogenase
ALLO	Alopregnanolona
ALLOT	Alotetrahidrodeoxicorticosterona
ANOVA	Análise de variância
DHEAS	Sulfato de dehidroepiandrosterona
EPI	Epipregnanolona
e.p.m.	Erro padrão da média
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
3β-HSD	3 β -hidroxiesteróide desidrogenase
3α-HOR	3 α -hidroesteróides oxidoreductase
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
LTP	Potenciação de longa duração
MK-801	Dizolcípina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PROG	Progesterona
PS	Sulfato de pregnenolona
r.p.m.	Rotação por minuto
SNC	Sistema nervoso central
TBPS	Butibiciclofosforotionato
TC	Tolerância crônica
TR	Tolerância rápida

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Biossíntese de neuroesteróides.....	23
Figura 2: Modelo esquemático da modulação dos receptores NMDA e GABA-A pelos neuroesteróides.....	28
Figura 3: Desenvolvimento da tolerância rápida à hipotermia induzida por diferentes doses de etanol em camundongos.....	48
Figura 4: Efeito do sulfato de pregnenolona no desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.....	52
Figura 5: Efeito do sulfato de dehidroepiandrosterona no desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.....	52
Figura 6: Efeito da epipregnanolona no desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.....	55
Figura 7: Efeito da alotetrahidrodeoxicorticosterona no desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.....	56
Figura 8: Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a facilitação do sulfato de pregnenolona na tolerância rápida ao etanol.....	60
Figura 9: Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a facilitação do sulfato de dehidroepiandrosterona na tolerância rápida ao etanol.....	61
Figura 10: Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a interferência da alotetrahidrodeoxicorticosterona na tolerância rápida ao etanol.....	63
Figura 11: Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a facilitação do sulfato de pregnenolona na tolerância rápida ao etanol.....	66
Figura 12: Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a facilitação do sulfato de dehidroepiandrosterona na tolerância rápida ao etanol.....	66

Figura 13: Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a interferência da alotetrahydrodeoxicorticosterona na tolerância rápida ao etanol.....	68
Figura 14: Efeito da finasterida no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol.....	71
Figura 15: Efeito da indometacina no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol.....	73
Figura 16: Efeito da administração prévia de (+)bicuculina sobre à incoordenação motora do etanol.....	75
Figura 17: Efeito da administração prévia de (+)bicuculina sobre a interferência da epipregnanolona na tolerância rápida à incoordenação motora do etanol.....	77
Figura 18: Efeito da administração prévia do sulfato de pregnenolona sobre a interferência do (+)MK-801 na tolerância rápida ao etanol.....	79
Figura 19: Comparação dos efeitos da administração de sulfato de pregnenolona antes ou após o teste sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.....	83
Figura 20: Comparação dos efeitos da administração de epipregnanolona antes ou após o teste sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.....	86
Figura 21: Comparação dos efeitos da administração de sulfato de pregnenolona antes ou após o teste sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.....	88
Figura 22: Comparação dos efeitos da administração de epipregnanolona antes ou após o teste sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.....	91
Figura 23: Influência da administração de sulfato de pregnenolona no Dia 1 e/ou Dia 2 sobre a incoordenação motora ao etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod.....	93
Figura 24: Influência da administração de sulfato de pregnenolona no Dia 1 e/ou Dia 2 sobre a hipotermia produzida pelo etanol em camundongos.....	96

Figura 25: Efeito da epipregnanolona no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol.....	101
Figura 26: Efeito do sulfato de pregnenolona no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol.....	103
Figura 27: Imunoquantificação da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA-A em hipocampo de camundongos.....	105
Figura 28: Imunoquantificação da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA-A em córtex de camundongos.....	106
Tabela 1: Efeito do sulfato de pregnenolona e epipregnanolona na concentração de etanol no sangue (mg/dl) no Dia 2 submetidos ao teste do rota-rod.....	98

RESUMO

Embora o alcoolismo seja um dos principais problemas médicos em todo o mundo, os mecanismos responsáveis pelas diversas manifestações clínicas desta doença permanecem obscuros. Assim, várias pesquisas têm sido realizadas com intuito de melhor compreender os mecanismos de ação que levam ao desenvolvimento da tolerância e da dependência a esta droga. Tem-se sugerido que o fenômeno da tolerância ao álcool é considerado um dos fatores associados com a dependência e, por este motivo, tem sido bastante estudado. A tolerância rápida é usualmente detectada entre oito e vinte e quatro horas após a primeira injeção do etanol.

No presente estudo, inicialmente investigou-se o desenvolvimento da tolerância rápida à hipotermia induzida pelo etanol, em camundongos Suiços machos. A temperatura dos animais foi avaliada aos 30, 60 e 90 min após as injeções de etanol ou salina. Várias doses de etanol foram utilizadas (1,75 a 2,5 g/kg), sendo que as doses de 1,75 de etanol, que não promoveu tolerância rápida e de 2,5 g/kg, que promoveu tolerância rápida, foram escolhidas para os demais experimentos.

Uma vez padronizada a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol, avaliou-se a influência dos neuroesteróides nesse modelo. Nossos resultados mostraram que os neuroesteróides moduladores negativos do receptor GABA-A e positivo do receptor NMDA, como o sulfato de pregnenolona (0,15 mg/kg) e sulfato de dehidroepiandrosterona (0,20 mg/kg), facilitam, enquanto que os neuroesteróides moduladores positivos do receptor GABA-A, como a epipregnanolona (0,15 e 0,30mg/kg) e alotetrahydrodeoxicorticosterona (0,10 e 0,20 mg/kg) bloqueiam o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.

Os experimentos do presente estudo demonstraram que a administração de epipregnanolona (0,15 ou 0,30 mg/kg) bloqueou a ação estimulante do sulfato de dehidroepiandrosterona (0,15 mg/kg), mas não afetou a ação estimulante do sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) sobre a tolerância rápida à incoordenação motora causada pelo etanol, enquanto que o pré-tratamento com epipregnanolona (0,15 mg/kg) bloqueou a ação inibitória da alotetrahydrodeoxicorticosterona sobre a tolerância. Embora, nossos dados obtidos sobre a tolerância à hipotermia produzida pelo etanol tenham sido similares àqueles do prejuízo motor, o tratamento com epipregnanolona (0,30 mg/kg) não só bloqueou a ação estimulante de ambos os neuroesteróides sulfato

de pregnenolona (0,15 mg/kg) e sulfato de dehidroepiandrosterona (0,20 mg/kg), como também a ação inibitória da alotetrahydrodeoxicorticosterona (0,20 mg/kg) sobre o desenvolvimento da tolerância ao etanol.

Nossos dados também mostraram que o sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg), quando administrado previamente ao (+)MK-801 (0,06 mg/kg), um antagonista de receptores NMDA, bloqueou a inibição da tolerância rápida ao etanol (2,25 g/kg), enquanto que o pré-tratamento com epipregnanolona (0,15 mg/kg) administrado antes da (+)bicuculina (0,3 mg/kg), um antagonista do receptor GABA-A, bloqueou a facilitação tolerância rápida ao etanol (2,25 g/kg) no teste do rota-rod.

O desenvolvimento da tolerância ao etanol pode ser influenciado pelos processos de aprendizagem e memória. A este respeito, os neuroesteróides sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) e epipregnanolona (0,15 mg/kg) interferem no desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito de incoordenação motora e hipotermia produzido pelo etanol que ocorrem durante a execução do teste, sob efeito do etanol no primeiro dia do experimento. Contudo, o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, avaliado no segundo dia do teste, não parece estar relacionado com um aprendizado dependente de estado.

No presente estudo também foi observado o efeito de neuroesteróides no desenvolvimento da tolerância crônica à incoordenação motora produzida pelo etanol (2,5 g/kg) em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. Os resultados mostraram que o tratamento prévio com epipregnanolona (0,15 mg/kg), durante doze dias, foi capaz de bloquear o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol, no Dia 13. Já o sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) administrado pelo mesmo período, facilitou significativamente o desenvolvimento de tolerância. No entanto, não houve diferença no imunocontéudo da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA-A no hipocampo e no córtex de camundongos no décimo terceiro dia de tratamento com etanol (2,5 g/kg), quando comparado aos grupos controle. Também, não se observou nenhuma alteração desta subunidade após o tratamento crônico com os neuroesteróides.

Os resultados do presente estudo demonstram que as influências dos neuroesteróides no desenvolvimento da tolerância aos efeitos do etanol sofrem modulação por vários fatores. Nossos resultados também sugerem que a administração de etanol durante 13 dias, a qual resultou no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol em camundongos, não parece estar relacionada a mudanças no conteúdo da subunidade $\alpha 1$ dos receptores GABA-A no hipocampo e no córtex cerebral.

INTRODUÇÃO

1. ALCOOLISMO

O Alcoolismo ou síndrome de dependência de álcool (CID-10, 1993) pode ser definido como um distúrbio crônico e patológico, caracterizado por uma preocupação exagerada com o álcool etílico em detrimento da própria saúde e funcionamento do organismo, levando ao uso abusivo e dependência a esta droga (Morse e Flavin, 1992). De acordo com o Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais (American Psychiatric Association, 1995) e conforme a Classificação Internacional de Doença (CID-10, 1993) da Organização Mundial de Saúde (OMS), a determinação da dependência a diversas substâncias psicoativas, incluindo o álcool, requer o agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos. Neste sentido, são inúmeras as manifestações fisiológicas e comportamentais promovidas por esta droga.

Há muita variação nos dados epidemiológicos sobre alcoolismo devido às várias metodologias empregadas, mas sugere-se que aproximadamente 50 a 90% da população mundial tenham algum contato com o álcool e, destes, 12 a 13% podem tornar-se dependentes (Nace, 1986; Clark e Hilton, 1991; Williams e DeBakey, 1992; Grant, 1997; Diamond e Gordon, 1997). No

Brasil, 40 a 90% das internações em hospitais psiquiátricos por dependência de drogas acontecem devido ao uso de álcool. Esta droga também é responsável por cerca de 45% dos acidentes de trânsito com jovens entre 13 e 19 anos, e cerca de 65% dos acidentes de trânsito fatais com motorista alcoolizados.

A ingestão moderada de álcool pode produzir alterações na temperatura corporal, incoordenação motora, déficit de aprendizagem e memória, bem como estimulação da atividade locomotora, enquanto que o seu uso abusivo produz vários efeitos no organismo como, por exemplo, pancreatite, cirrose, disfunção hepática, distúrbios cardiovasculares e endócrinos, câncer do sistema digestivo e respiratório, além de danos cerebrais (Ishak *et al.*, 1991; Garro *et al.*, 1992; Raymond, 1996, Porto *et al.*, 1999; Schlecht *et al.*, 1999; Cordeiro *et al.*, 1998)

A taxa de álcool no sangue varia de acordo com o peso, a altura e as condições físicas de cada pessoa. Um indivíduo é considerado alcoolizado se estiver com taxa a partir de 0,6 gramas de álcool por litro de sangue (intoxicação moderada, 60 mg/dl). Quando a alcoolemia atinge 100 mg/dl, causa incoordenação motora, reflexos prejudicados, fala arrastada, sonolência, perda das inibições sociais e euforia. Níveis acima de 400 mg/dl promovem paralisia respiratória, hipotensão, acidose metabólica e morte (Urso *et al.*,

1981; Diamond e Messing, 1994). Ademais, estudos mostram que existe uma correlação direta entre a alcoolemia e a concentração de álcool no cérebro (Sunhara *et al.*, 1978; Khanna *et al.*, 1993a).

As causas do alto número de pessoas dependentes a bebidas alcoólicas no País devem-se, principalmente, à cultura nacional (por exemplo, a cerveja é aceita como uma bebida popular), à facilidade de aquisição em vários pontos do País, preços acessíveis e à falta de um controle efetivo sobre a venda de bebidas alcoólicas a indivíduos menores de 18 anos (por exemplo, a idade em que os adolescentes começam a consumir o álcool é cada vez menor e a média atual está em torno de 13 anos) (Forster *et al.*, 1996; Muza *et al.*, 1997a, b; Pechansky, 1998).

A prevalência do alcoolismo entre as mulheres ainda é significativamente menor do que a encontrada entre os homens (Blume *et al.*, 1994; Grant, 1997). Ainda assim, o consumo abusivo e/ou a dependência do álcool traz, reconhecidamente, inúmeras repercussões negativas sobre a saúde física, psíquica e social da mulher. Embora o início e o aumento do consumo de álcool entre as mulheres seja tardio em relação ao dos homens, há um maior risco para suicídio e acidentes fatais entre aquelas (Ross *et al.*, 1990). Estudos mostram que, mesmo que o consumo de álcool seja realmente menor entre as mulheres, seu impacto pode ser maior que entre os homens, avaliado

por meio do relato de problemas associados ao álcool (Bongers *et al.*, 1997). A identificação do alcoolismo feminino em atendimentos primários de saúde ainda é deficiente e pouco valorizada (Chang *et al.*, 1997). Apesar disso, observa-se um crescente aumento do abuso de álcool e de outras drogas ilícitas, como a cocaína, além do já conhecido abuso de anfetaminas (Yarnold, 1997).

Além disso, há vários fatores de risco, tais como genéticos, sociais, psicológicos, ambientais, farmacocinéticos (absorção, distribuição e metabolismo da droga), tipos de personalidades, tipos de bebidas utilizadas, peso corporal, sexo e idade, que podem contribuir à vulnerabilidade ao alcoolismo ou a dependência ao álcool (Cloninger, 1987; Tabakoff e Hoffman, 1996; Grant, 1997; Eckard *et al.*, 1998).

Embora o alcoolismo seja um dos principais problemas médicos em todo o mundo, os mecanismos responsáveis pelas diversas manifestações clínicas desta doença permanecem não esclarecidos, portanto, um melhor entendimento dos mecanismos de ação que levam ao desenvolvimento da tolerância, do abuso e da dependência a esta droga se faz necessário.

2. TOLERÂNCIA

O conhecimento do fenômeno da *tolerância* aos efeitos do etanol tem ajudado a compreensão da natureza implícita do hábito de ingerir bebidas alcoólicas e tem propiciado o desenvolvimento de novos esquemas de tratamento para tal doença. A *tolerância* está entre os vários critérios para caracterizar a dependência do etanol. É definida como uma necessidade de quantidades progressivamente maiores da substância para se atingir um estado de intoxicação ou acentuada redução do efeito com o uso continuado da mesma quantidade de substância (APA, 1994; Tabakoff e Hoffman, 1996).

Este relevante componente da dependência ao etanol pode ser classificado com relação aos mecanismos gerais pelos quais ocorre no organismo em: *tolerância disposicional* (ou *farmacocinética*), que inclui alterações na absorção, distribuição, metabolismo e excreção da droga contribuindo para a redução da concentração desta nos sítios de ação e *tolerância funcional* (ou *farmacodinâmica*), que inclui adaptações no organismo aos efeitos da droga causando mudanças nas propriedades e funções do tecido alvo, tornando-o menos responsivo à mesma quantidade da droga (Kalant e Khanna, 1990; Tabakoff e Hoffman, 1996). A tolerância tem sido bastante estudada devido às suas implicações no consumo do álcool e por

envolver alterações na plasticidade neuronal, que são alterações estruturais e funcionais nas sinapses como resultado dos processos adaptativos (Tabakoff *et al.*, 1986; Kalant e Khanna, 1990). A *tolerância metabólica* faz parte da tolerância disposicional e resulta de uma eliminação mais rápida do álcool no organismo (Tabakoff *et al.*, 1986). Está associada ao aumento de atividade de um grupo de enzimas hepáticas específicas que metabolizam o álcool, com a consequente redução da duração de seus efeitos no corpo, causado pelo uso repetido desta droga (Lieber, 1994). O desenvolvimento da tolerância disposicional para os efeitos do álcool parece não ser resultante de modificações na absorção, distribuição ou eliminação dessa droga.

A tolerância tem sido estudada em uma abordagem temporal, que permite classificá-la em aguda, rápida e crônica. A *tolerância aguda* é observada durante o curso de uma única administração do etanol (Kalant e Khanna, 1990; Kalant, 1998; Chandler *et al.*, 1998) e foi descrita primeiramente por Mellamby (1919). A *tolerância crônica* é geralmente detectada após vários dias, semanas ou meses de repetida administração do etanol (Kalant e Khanna, 1990; Tabakoff, 1995; Chandler *et al.*, 1998). A *tolerância rápida*, que é usualmente detectada entre oito e vinte e quatro horas após a primeira injeção do etanol (Crabbe *et al.*, 1979; Barreto *et al.*, 1998; Barbosa, 1999), tem sido considerada um modelo preditivo da tolerância

crônica, devido à similaridade dos resultados obtidos com os de estudos envolvendo estes dois tipos de tolerância (Chan *et al.*, 1985; Khanna *et al.*, 1992a). Estes achados permitiram o desenvolvimento de modelos de estudos da tolerância não fossem tão prolongados, evitando, portanto, o estresse dos animais e diminuindo o custo com drogas. No entanto, esta forma de tolerância parece envolver principalmente mecanismos funcionais, pois os níveis de etanol no sangue no segundo dia de experimento, não foram significativamente diferentes entre os animais tolerantes e não tolerantes, 120 minutos após a injeção de etanol (Khanna *et al.*, 1991b;1992b)

Pesquisas mostraram que o desenvolvimento da tolerância ao álcool esta droga pode ser acelerado quando os animais praticam o teste enquanto intoxicados, sugerindo-se o termo *tolerância por aprendizagem* para designar esse fenômeno (Chen, 1968; Leblanc *et al.*, 1973; Bitrán e Kalant, 1991). Considera-se que o desenvolvimento da tolerância pode ser influenciado pela *aprendizagem associativa* (condicionamento clássico ou Pavloviano) (Lê *et al.*, 1979; 1987), na qual um estímulo sensorial acompanha a oferta de etanol ao animal. Este estímulo evoca uma resposta homeostática compensatória, que é a base do fenômeno da tolerância, previamente à administração do etanol. Outra forma de aprendizagem que contribui para a tolerância é a *aprendizagem operante* (Leblanc *et al.*, 1973; Lê *et al.*, 1989), na qual os

animais praticam a tarefa sob a influência do etanol (ou prática intoxicada). Em outras palavras, o animal aprende a desempenhar a tarefa enquanto intoxicado pelo álcool.

Em 1968, Chen mostrou que, após treinar ratos no labirinto, estes foram divididos em dois grupos: um grupo recebeu etanol *antes* do teste e o outro *após* o teste. Após três sessões de treino, os dois grupos foram submetidos a um teste final, no qual ambos receberam etanol *antes* do teste. Observou-se que o desenvolvimento da tolerância somente ocorreu nos animais que tiveram, previamente, a oportunidade de desempenhar a tarefa sob o efeito do etanol. Assim, parece ser necessária a execução da prática intoxicada para se observar o desenvolvimento das tolerâncias aguda, rápida e crônica a esta droga (Leblanc *et al.*, 1973).

Bitrán e Kalant (1991) demonstraram que a aprendizagem possui um importante papel dentro do desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Grupos de ratos que receberam uma única dose de etanol (1,7 g/kg i.p.) seguida de intensa prática intoxicada no teste da esteira móvel (moving-belt), desenvolveram tolerância rápida funcional aos efeitos de incoordenação motora a uma segunda dose de etanol, administrada 8 a 24 horas após. Na ausência da prática intoxicada, ou após uma considerável redução da oportunidade de praticar, a mesma dose de etanol falhou em produzir

tolerância, sugerindo que não somente a oportunidade da prática intoxicada, mas também sua extensão e, possivelmente sua qualidade, são importantes determinantes no desenvolvimento da tolerância rápida. Outros estudos também mencionam a influência da aprendizagem na tolerância (Khanna *et al.*, 1992a e b; 1993a e b; 1996; Grant *et al.*, 1990; Kalant e Khanna, 1990).

Existem evidências de que a tolerância é dependente de fatores genéticos em raças de animais que preferem ou não o etanol (Gatto *et al.*, 1987; Lê e Kiiianmaa, 1988). Assim, o desenvolvimento das tolerâncias aguda e crônica pode estar sujeito a um controle genético e ambiental, contribuindo para o aumento do consumo a esta droga (LeBlanc *et al.*, 1975; Sdao-Jarvie e Vogel-Sprott, 1991; Erwin e Deitrich, 1996). Trabalhos realizados em humanos também sugerem que as diferenças genéticas podem influenciar no desenvolvimento da tolerância ao álcool, sugerindo que a predisposição pode contribuir para o aumento do consumo da droga e esclarecer o maior risco de alcoolismo entre filhos de pais alcoólatras (Clonninger, 1987; Schuckit e Gold, 1988). Estudos mostram que o desenvolvimento da tolerância aos efeitos do etanol pode ser acelerado quando administrações repetidas desta droga ocorrem no mesmo ambiente (Melchior e Tabakoff, 1985; Mansfield e Cunningham, 1996). Entretanto, quando o etanol é administrado em elevadas

concentrações, pode ocorrer tolerância funcional independentemente da influência do ambiente (Melchior e Tabakoff, 1981).

Por muitos anos, as pesquisas sobre o efeito hipotérmico do etanol têm sido empregadas como uma variável dependente para o estudo dos vários aspectos da tolerância a esta droga. Em 1979, Crabbe *et al.* foram os primeiros a descrever a tolerância rápida à hipotermia induzida pelo etanol em camundongos. Estudos realizados por Khanna *et al.* (1992b; 1996; 1997) mostraram que o desenvolvimento das tolerâncias rápida e crônica à hipotermia foram similares ao da tolerância à incoordenação motora induzida pelo etanol.

3. ETANOL E SUA INTERAÇÃO COM NEUROTRANSMISSORES

Tem sido demonstrado que o etanol, em concentrações fisiologicamente e farmacologicamente relevantes, afeta uma variedade de sistemas de neurotransmissores, tais como acetilcolina (Erikson e Graham, 1973), monoaminas (Myers e Melchior, 1975; Myers e Veale, 1968; Tabakoff *et al.*, 1977; Davies *et al.*, 1997), aminoácidos (Frye *et al.*, 1981; Mihic e Harris, 1996; Lovinger *et al.*, 1989; 1990) e esteróides neuroativos (Bowen *et al.*, 1999; Vanover *et al.*, 1999; Finn *et al.*, 2000). Essa droga, também exerce

importantes efeitos sobre membranas, canais iônicos (Mihic e Harris, 1996; Snell *et al.*, 2000), sistemas de segundos mensageiros (Pandey, 1998) e óxido nítrico (Venkov *et al.*, 1999).

No entanto, os receptores GABA-A e os receptores NMDA são os mais sensíveis ao etanol e estão claramente envolvidos nos mecanismos neuronais que compreendem a tolerância e a dependência ao etanol (Crews *et al.*, 1996). Estes receptores adaptam-se à exposição crônica ao etanol e este fato pode explicar a tolerância e a hiperexcitabilidade na dependência e na síndrome de abstinência a esta droga. É provável que estas adaptações influenciem a manutenção do comportamento excessivo de beber e, portanto, o estado de dependência a esta droga (Gordis, 1995; Schulteis *et al.*, 1996).

3.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA OU CRÔNICA DO ETANOL NO RECEPTOR GABA-A

Um grande número de pesquisas têm se dedicado a examinar a relação entre as ações do etanol no sistema nervoso central e o complexo receptor GABA-A, um receptor ligado a canais de cloreto, que contém múltiplos sítios de ligação, incluindo aqueles para os barbitúricos, anestésicos voláteis e esteróides, benzodiazepínicos, álcoois, agonistas e antagonistas GABA, que alteram a função deste receptor (Johnston, 1996; Hevers e Luddens, 1998).

Este complexo receptor consiste de uma glicoproteína heteropentamérica composta de cinco subunidades de várias classes (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-4} , δ , ρ_{1-3} , ϵ , π , e ϕ) e, embora tenham sido identificados diferentes tipos de subunidades que podem levar à múltiplas combinações destas (Mehta e Ticku, 1999; Bonnert *et al.*, 1999), o número de combinações do principal subtipo do receptor GABA-A é estimado em torno de dez (McKernan e Whiting, 1996). Embora não se conheça a exata composição dos principais receptores GABA-A, cada receptor, provavelmente, consiste de duas subunidades α , uma subunidade β e duas subunidades γ . Cada tipo de subunidade interage somente com moléculas específicas; por exemplo, as subunidades α e β são sensíveis aos efeitos dos barbitúricos e do GABA, enquanto as subunidades α e γ contêm o sítio de ligação para as benzodiazepinas. Já as três subunidades α , β e γ são sensíveis aos efeitos do etanol. Outras pesquisas mencionam que o sítio de ligação do álcool reside no segundo domínio transmembranar deste receptor (Mihic *et al.*, 1997; Mihic, 1999).

Os efeitos do etanol sobre a função do complexo receptor GABA-A têm sido extensivamente estudados nos últimos 15 anos. Há evidências comportamentais, eletrofisiológicas e neuroquímicas de que os efeitos desta droga no sistema nervoso central envolvam ações neste receptor (Mihic and Harris, 1996). Em relação aos efeitos comportamentais, a administração aguda

de etanol produz efeitos similares a de benzodiazepínicos e barbitúricos como, por exemplo, ansiólise, sedação, hipnose e incoordenação motora (Majchrowicz, 1975; Frey *et al.*, 1981), prejuízo no processo cognitivo (Matthews *et al.*, 1995; Givens e McMahon, 1997) e, em elevadas concentrações, anestesia e depressão respiratória (Sellers e Kalant, 1976). Muitos dos efeitos comportamentais desta droga são semelhantes àqueles dos agonistas do receptor GABA-A, sugerindo um envolvimento direto deste receptor nas ações do etanol. Estes efeitos são potencializados pela administração sistêmica ou intracerebral de drogas que aumentam a ativação do receptor GABA-A no cérebro, enquanto drogas que diminuem a ativação deste receptor, também diminuem os efeitos do etanol (Hoffman *et al.*, 1987; Glowa *et al.*, 1988; Givens e Breese, 1990; Mihic and Harris, 1996).

É amplamente relatado que o etanol aumenta a ativação dos receptores GABA-A. No entanto, isto não ocorre em todas as regiões do cérebro, em todos os tipos de células da mesma região e nem em todos os sítios do receptor GABA-A no mesmo neurônio. Assim, esta droga, nas concentrações de 10-100 mM, aumenta as correntes pós-sinápticas inibitórias neuronais no córtex cerebral, bem como em neurônios do septo medial e em alguns neurônios hipocámpais na área CA1 (Reynolds *et al.*, 1992; Weiner *et al.*, 1994; Marszalec *et al.*, 1998). Este efeito do etanol parece ser devido a um

aumento inicial das correntes de cloreto que permeiam o canal do receptor (Weiner *et al.*, 1994; Marszalec *et al.*, 1998), um efeito que pode ser modulado, pela proteína quinase C (PKC), uma vez que inibidores específicos desta proteína antagonizam o aumento da transmissão sináptica no receptor GABA-A por essa droga (Weiner *et al.*, 1994; 1997).

Tem sido relatado que o desenvolvimento da tolerância e da dependência ao álcool parece estar associado com a redução da efetividade do GABA e/ou benzodiazepinas em algumas regiões do cérebro, em parte, devido a dessensibilização e/ou *down-regulation* do receptor GABA-A (Mehta e Ticku, 1989; Devaud *et al.*, 1995). A função deste receptor geralmente é reduzida durante a tolerância ao etanol e outros agentes que aumentam a do GABA. A *down-regulation* ocorre após exposição prolongada a estes ligantes, podendo resultar na redução do número de sítios de ligação dentro do complexo receptor GABA-A, sem alteração de afinidade (Sieghart, 1995). Trabalhos mencionam que as mudanças na função e na expressão das subunidades do receptor GABA-A após, tratamento prolongado com álcool, variam de acordo com as estruturas cerebrais utilizadas (Grobin *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 1998; Mehta e Ticku, 1999).

Por conseguinte, é importante investigar se mudanças no imunoconteúdo das subunidades do receptor GABA-A no hipocampo e córtex

de camundongos ocorrem após o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol.

3.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA OU CRÔNICA DO ETANOL NO RECEPTOR NMDA

A ação do etanol sobre o receptor NMDA parece ter, também, um importante papel no alcoolismo (Tsai *et al.*, 1998). O complexo receptor NMDA é um subtipo de receptor glutamatérgico ionotrópico, que está acoplado a um canal iônico de alta condutância, permeável aos íons sódio, potássio e cálcio. Este receptor possui muitos sítios de ligação, incluindo aqueles para o glutamato, glicina, cátions divalentes (magnésio e zinco), poliaminas, antagonistas do receptor NMDA, esteróides e etanol (Johnson, e Ascher, 1987; Mayer e Westbrook, 1987; Ehlers *et al.*, 1992).

Este receptor possui seis subunidades, tais como, NR1, NR2A-NR2D e NR3A, as quais se combinam para formar um receptor multimérico, que exhibe distintas propriedades dependendo da composição do receptor. Estudos realizados por Laube e colaboradores (1998), têm sugerido que os receptores NMDA podem ser compostos por duas subunidades NR1 e duas subunidades NR2. A subunidade NR1 está amplamente distribuída no cérebro e é considerada a subunidade chave deste receptor (Monyer *et al.*, 1994).

Pesquisas mostraram, que a subunidade NR2 controla a sensibilidade deste receptor às drogas agonistas e antagonistas e a co-associação das subunidades NR1/NR2A, NR1/NR2B, NR1/NR2C e NR1/NR2D determina maior sensibilidade a agonistas (Meguro *et al.*, 1992; Ishii *et al.*, 1993). Laube *et al.* (1997) relataram também que as subunidades NR1 e NR2 expressam sítios de reconhecimento para o glutamato e contêm sítios de fosforilação susceptíveis à para proteína quinase A (PKA) e PKC (Tingley *et al.*, 1997).

Há vários estudos mostrando que o etanol inibe a função do receptor NMDA em concentrações farmacológicas entre 5 e 50 mM (Lovinger *et al.*, 1989; 1990; Deutsch *et al.*, 1991; Wirkner *et al.*, 1999; Woodwar, 1999). Esta droga e antagonistas deste receptor produzem efeitos similares em humanos e animais (Hodge e Cox, 1998; Krystal *et al.*, 1998). Entretanto, o mecanismo pelo qual esta droga modula o receptor NMDA não está claro. Em 1989, Lovinger e colaboradores demonstraram que o etanol, administrado agudamente, inibiu as correntes ativadas pelo NMDA em cultura de neurônios hipocampais. Este efeito inibitório do etanol parece ser devido à diminuição no tempo e na frequência de abertura do canal (Lovinger *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1996). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm sugerido que a potencialização de longa duração (LTP), considerada como a base molecular da memória, mediada pelo receptor NMDA em neurônios hipocampais, foi também inibida

pelo etanol (Morrisett e Swartzwelder, 1993; Givens e McMahon, 1997; Randall *et al.*, 1995; Schummers *et al.*, 1997). Sugere-se que a inibição mediada por esta droga em neurônios corticais e hipocámpais, seja devida a uma alteração na cinética de ativação do canal (Snell *et al.*, 1993).

No entanto, pesquisas demonstram que a sensibilidade do receptor NMDA ao etanol parece ser determinada pela composição das subunidades deste receptor. Koltchine e colaboradores (1993), foram os primeiros a demonstrar que a subunidade NR1 foi inibida pelo etanol. Kuner e colaboradores (1993) e Massod e colaboradores (1994) mostraram que a combinação das subunidades NR1/NR2 também foi inibida por esta droga, sugerindo que o grau de inibição é dependente da subunidade NR2. Estes resultados foram confirmados por Mirshahi e Woodward (1995), que demonstraram que a combinação das subunidades NR1/NR2A foi mais sensível à inibição pelo etanol, enquanto a combinação das subunidades NR1/NR2C foi menos sensível. Outros trabalhos sugerem que a subunidade NR2B é mais sensível ao etanol (Lonviger, 1995; Fink e Gother, 1996; Faingold *et al.*, 1998).

Estudos *in vivo* têm demonstrado que a tolerância ao etanol resulta no aumento da densidade dos sítios de ligação para o MK-801 e glutamato no hipocampo, córtex, estriado e tálamo, mas não em receptores de outros sítios

(Snell *et al.*, 1993; Sanna *et al.*, 1993; Grant *et al.*, 1990). Michaelis e colaboradores (1990) relataram que, no cérebro pós-morte, a densidade dos sítios de ligação para o glutamato está aumentada no hipocampo em dependentes de álcool, quando comparados com humanos não dependentes. Porém, observou-se uma diminuição na ligação do glutamato nesta estrutura tanto em ratos tratados cronicamente com etanol, como em humanos alcoólicos (para revisão ver Faingold *et al.*, 1998). A diferença nos resultados obtidos por estes estudos parece estar relacionada às diferenças nos protocolos empregados.

Além disso, têm sido relatadas mudanças seletivas nas subunidades deste receptor após a exposição crônica ao etanol. Assim, o tratamento crônico de camundongos com etanol aumentou a subunidade NR1 no hipocampo e cerebelo e também aumentou a subunidade NR2A no hipocampo e córtex. Contudo, os níveis do RNAm destas subunidades não aumentaram, enquanto aumentaram os níveis do RNAm da subunidade NR2B (Snell *et al.*, 1996). Este tipo de exposição também aumentou a regulação dos receptores NR1 pela imunoreatividade no hipocampo, mas não no córtex, núcleo accumbens e estriado (Trevisan *et al.*, 1994). Trabalho anterior deste laboratório mostrou que a exposição crônica ao etanol resultou em dependência a esta droga, avaliada pela intensidade da síndrome de abstinência observada (Ferreira,

2001). Entretanto, os níveis protéicos das subunidades NR1, NR2A, NR2B e NR2C de hipocampo de ratos avaliados por *Western Blot* não foram alterados. Este estudo sugere que, a expressão de subunidades de receptores NMDA não parece ser fundamental para os mecanismos adaptativos observados após o uso crônico de álcool.

4. NEUROESTERÓIDES

O termo “neuroesteróide” foi proposto em 1981 por Baulieu, e tem sido aplicado a vários esteróides que são acumulados no sistema nervoso independentemente das glândulas endócrinas esteroideogênicas e/ou podem ser sintetizados *de novo* a partir do colesterol tanto no sistema nervoso central quanto no periférico (Baulieu, 1991, 1997; Compagnone e Mellon, 1998). Estes incluem a pregnenolona e seu sulfato éster, a progesterona e seus 5 α -metabólitos reduzidos e a dehidroepiandrosterona, principalmente em sua forma de sulfato, que permanecem presentes no cérebro por longo tempo após a remoção das glândulas endócrinas esteroideogênicas (gônadas, adrenais e /ou placenta).

A caracterização da pregnenolona e dehidroepiandrosterona no cérebro de ratos como esteróides não-conjugados e seus sulfatos, em concentrações

mais altas no cérebro do que no plasma, tem levado à reconsideração da inter-relação esteróide-cérebro (Baulieu, 1997). No entanto, as concentrações de testosterona e corticosterona rapidamente declinam para níveis não detectáveis após a remoção das correspondentes glândulas endócrinas (Corpéhot *et al.*, 1994; Baulieu, 1997). Estas observações revelam a existência de uma via de biosíntese de esteróides no sistema nervoso central.

A síntese destes neuroesteróides no sistema nervoso central e sistema nervoso periférico (Figura 1) envolve três isoformas de citocromo P450 (P450_{scc}, P450_{c17} e P450_{c11β}) e o primeiro passo limitante nesta síntese é a conversão do colesterol em pregnenolona pelo complexo enzimático do citocromo P450 por clivagem oxidativa da cadeia lateral (P450_{scc}), uma enzima mitocondrial encontrada nas células gliais (Robel e Baulieu, 1994; Michael *et al.*, 1996; Robel *et al.*, 1995). Além disso, o cérebro contém enzimas adicionais que convertem os clássicos hormônios esteróides em vários neuroesteróides. A pregnenolona, a dehidroepiandrosterona e os metabólitos da progesterona têm sido identificados no cérebro de várias espécies. Os metabólitos da progesterona incluem a 5 α -dihidroprogesterona e a alopregnanolona, sugerindo que o cérebro metaboliza a progesterona de modo diferente das glândulas adrenais e das gônadas. Entretanto, a síntese de neuroesteróides pode ser bloqueada por inibidores específicos como, por

exemplo, a finasterida, um inibidor da enzima 5α -redutase (Lephart *et al.*, 1996; Kokate *et al.*, 1999; VanDoren *et al.*, 2000); a indometacina, um inibidor da enzima 3α -hidroxiesteróide redutase (3α -HSD) (VanDoren *et al.*, 2000); e o trilostano, (4α -5-epoxi- 17β -hidroxi-3-oxo- 5α -androstando- 2α -carbonitrila, TRIL), um potente inibidor da enzima 3β -hidroxiesteróide desidrogenase (3β -HSD) (Potts *et al.*, 1978; VanDoren *et al.*, 2000).

As concentrações de pregnenolona, sulfato de pregnenolona, dehidroepiandrosterona e sulfato de dehidroepiandrosterona no cérebro e no plasma de ratos são: 8,9, 14,2, 0,24 e 1,70 ng/g; e de 1,2, 2,1, 0,06 e 0,20 ng/g, respectivamente (Baulieu e Robel, 1996; Baulieu, 1997). As concentrações dos neuroesteróides são maiores no cérebro do que no plasma de ratos e, não desaparecem do cérebro 15 a 45 dias após combinada adrenalectomia e orquiectomia (Baulieu, 1997). Young *et al.* (1996), mostraram que as concentrações de pregnenolona, sulfato de pregnenolona, dehidroepiandrosterona e progesterona em camundongos machos adultos castrados foram similares às obtidas em ratos machos. Entretanto, estudos têm demonstrado que a administração aguda de etanol diminui as concentrações dos neuroesteróides dehidroepiandrosterona e sulfato de dehidroepiandrosterona no cérebro de ratos. Esta diminuição ocorre rapidamente e o sulfato de dehidroepiandrosterona desaparece completamente

após 30 minutos, reaparecendo progressivamente após 4 horas. No entanto, as concentrações de pregnenolona e sulfato de pregnenolona não são alteradas (Robel e Baulieu, 1994).

Estudos recentes têm mostrado que os neuroesteróides, além de sua ação genômica clássica, apresentam ações não genômicas. Essas ações são rápidas e relacionadas com diversos sistemas de neurotransmissores. Os neuroesteróides têm distintas ações não genômicas sobre os sistemas dos receptores GABA-A e NMDA, dois receptores conhecidos por mediar os efeitos do etanol (Bowen *et al.*, 1999).

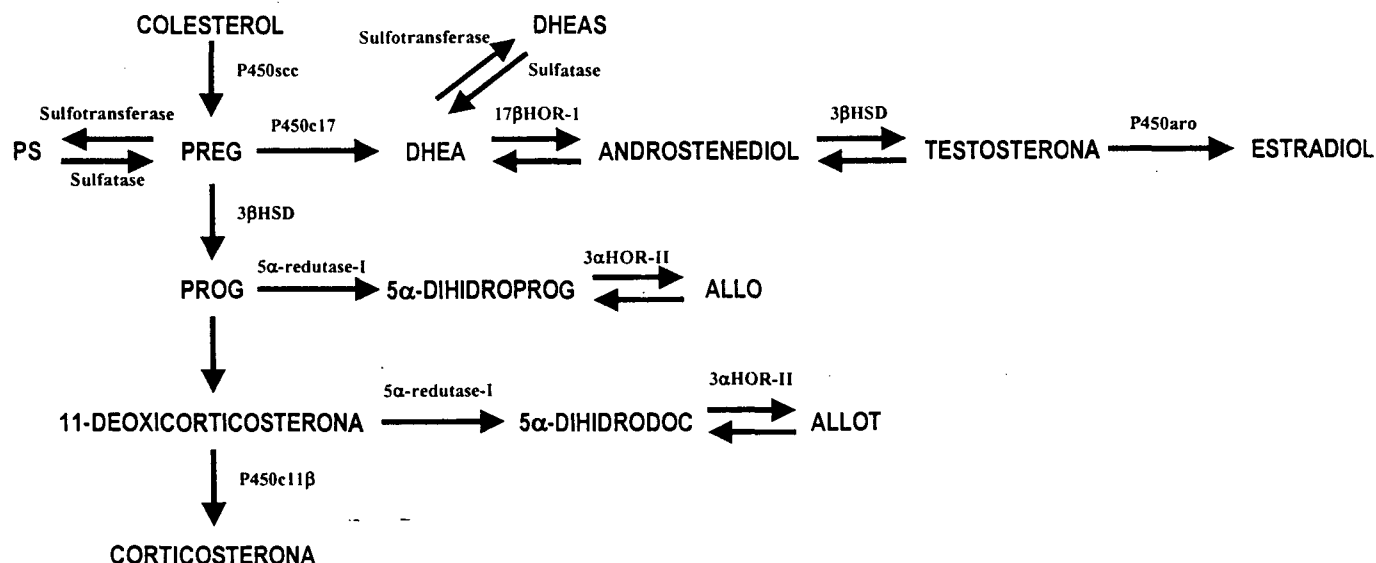


Figura 1. Biossíntese de neuroesteróides. As enzimas estão demonstradas em cada reação. P450_{scc}, citocromo P450 por clivagem oxidativa da cadeia lateral; 3α-HSD, 3α-hidroxiesteróide redutase; 3β-HSD, 3β-hidroxiesteróide desidrogenase (adaptada de Compagnone e Mellon, 1998).

4.1. NEUROESTERÓIDES E O RECEPTOR GABA-A

Os principais estudos dos efeitos dos neuroesteróides convergem para sua interação com o receptor GABA-A (Compagnone *et al.*, 1995; McEwen, 1991). Evidências bioquímicas, eletrofisiológicas e comportamentais sugerem que alopregnanolona, alotetrahydrodeoxicorticosterona, progesterona e epipregnanolona atuam como moduladores positivos (Lambert *et al.*, 1995; Schumacher *et al.*, 1997), enquanto o sulfato de pregnenolona e sulfato de dehidroepiandrosterona atuam como moduladores negativos do receptor GABA-A (Majewska *et al.*, 1988; Majewska, 1992; Mienville e Vicini, 1989) (Figura 2).

Neuroesteróides endógenos como alopregnanolona, alotetrahydrodeoxicorticosterona e pregnanolona estão entre os principais ligantes ativos no receptor GABA-A, com afinidade igual ou superior aos do barbitúricos e benzodiazepinas (Paul e Purdy, 1992; Lambert *et al.*, 1995). Portanto, não é surpreendente que estes e outros neuroesteróides tenham efeitos ansiolíticos, hipnóticos, anticonvulsivantes e anestésicos quando administrados em animais de laboratório (Lambert *et al.*, 1995). No entanto, estudos eletrofisiológicos e de *binding* têm demonstrado que os efeitos destes neuroesteróides não resultam da ligação a sítios de reconhecimento das benzodiazepinas, barbitúricos, picrotoxina e GABA associados ao complexo

receptor GABA-A, sugerindo que interagem com um sítio distinto neste complexo receptor (Paul e Purdy, 1992; Lambert *et al.*, 1995; Morrow *et al.*, 1990b). Embora não haja uma absoluta especificidade à modulação dos neuroesteróides neste receptor, tem sido demonstrado que a presença das subunidades α e γ afeta a neuromodulação exercida pela alopregnanolona e sulfato de pregnenolona (Shingai *et al.*, 1991; Zaman *et al.*, 1992). Por exemplo, estudos eletrofisiológicos demonstraram que a presença da subunidade $\alpha 1$ dobrou a eficácia da alopregnanolona e a presença das subunidades γ inibiu a modulação pelos neurosteróides (para revisão, ver Compagnone e Mellon, 2000).

Estudos realizados por Majewska *et al* (1987; 1988), demonstraram que concentrações micromolares de sulfato de pregnenolona inibem, de maneira dependente da dose, o transporte de cloreto ou as correntes induzidas pelo GABA em sinaptoneurosomas e neurônios, respectivamente. Estudos de *binding* sugerem que o sítio que exhibe afinidade de ordem micromolar a este neuroesteróide coincide com o sítio de ligação de convulsivantes ao receptor GABA-A (Majewska *et al.*, 1990a). Também tem sido relatado que o sulfato de dehidroepiandrosterona bloqueia as correntes induzidas pelo GABA em neurônios, e parece interagir em sítio próximo ao da ligação dos barbitúricos (Majewska *et al.*, 1990b; Dermigoren *et al.*, 1991).

Os neuroesteróides de ação GABAérgica modulam os eventos sinápticos e podem ter um papel crucial na plasticidade neuronal. Os moduladores positivos do receptor GABA-A prolongam o potencial pós-sináptico inibitório (PPSI) (Harrison *et al.*, 1987) e reduzem as respostas despolarizantes ao glutamato e os potenciais de ação induzidos pelo glutamato (Lambertt *et al.*, 1995), enquanto que os moduladores negativos deste receptor (sulfato de pregnenolona e sulfato de dehidroepiandrosterona) reduzem as amplitudes do PPSI (Spivak, 1994), aumentando a despolarização neuronal. Os efeitos excitatórios destes neuroesteróides moduladores negativos do receptor GABA-A sobre os neurônios, têm sido consistentemente relatados (Carette e Poulain, 1984) juntamente com suas ações convulsivantes em animais (Heuser e Eidelberg, 1961).

4.2. NEUROESTERÓIDES E O RECEPTOR NMDA

Tem sido demonstrado que neuroesteróides como o sulfato de alopregnanolona e o sulfato de epipregnanolona, atuam como moduladores negativos do receptor NMDA (Park-Chung *et al.*, 1994), enquanto o sulfato de pregnenolona, a pregnenolona e a dehidroepiandrosterona são considerados moduladores positivos do receptor NMDA (Bowlby, 1993; Irwin *et al.*, 1992; Majewska *et al.*, 1988; 1990a; De Kloet *et al.*, 1998; De Meio, 1975). O

sulfato de dehidroepiandrosterona é um fraco modulador positivo desse receptor (Figura 2).

Estudos eletrofisiológicos mostraram que o sulfato de pregnenolona atua como um modulador positivo do receptor NMDA em neurônios da medula espinhal (Wu *et al* 1991). Nestes estudos, 100 μ M de sulfato de pregnenolona aumentou as correntes associadas a receptores NMDA em aproximadamente 200%. Irwin *et al.* (1992) também demonstraram que este neuroesteróide aumentou a concentração de cálcio intracelular, mediado pelo receptor NMDA em culturas de neurônios do hipocampo de rato. Além disso, foi demonstrado que o aumento de cálcio intracelular mediado pela dehidroepiandrosterona, foi abolido de maneira dependente da dose pelo MK-801 e pelo D-AP5, que são antagonista não competitivo e um inibidor competitivo do receptor NMDA, respectivamente, sugerindo uma interação direta da dehidroepiandrosterona neste receptor (Compagnone *et al.*, 2000). Compagnone e Mellon (1998) também relataram que o sulfato de dehidroepiandrosterona -potenciou o aumento do cálcio intracelular livre devido à ativação dos receptores NMDA no cérebro.

Os neuroesteróides atuam rapidamente e com um alto grau de especificidade estrutural, o que é mais condizente com sua ação direta em sítios modulatórios específicos no receptor NMDA, do que um efeito indireto

mediado por associação com a bicamada lipídica ou outras proteínas. Esta modulação é independente dos sítios da espermina, redox, glicina, MK-801, Mg^{2+} e do ácido araquidônico que também está presente no receptor NMDA (Park-Chung *et al.*, 1997), indicando que estes neuroesteróides atuam através de uma classe distinta de sítios modulatórios. Além disso, a interação entre o modulador positivo (sulfato de pregnenolona) e o modulador negativo (sulfato de epipregnanolona) não é competitiva, indicando que apesar da similaridade estrutural, os efeitos destes dois moduladores do receptor NMDA são mediados através de sítios distintos. O efeito inibitório do sulfato de epipregnanolona provavelmente não é devido à ligação dentro do poro do canal, porque a inibição é independente da voltagem. Os sítios para ambos moduladores, positivo e negativo, provavelmente estão localizados nas porções extracelulares do receptor NMDA, pois o sulfato de pregnenolona e sulfato de epipregnanolona não têm efeito quando aplicados intracelularmente (Park-Chung *et al.*, 1996,1997). Além disso, estudos sugerem que a subunidade NMDAR2A controla a eficácia de ativação dos neuroesteróides que são moduladores positivos (Yaghoubi *et al.*, 1998).

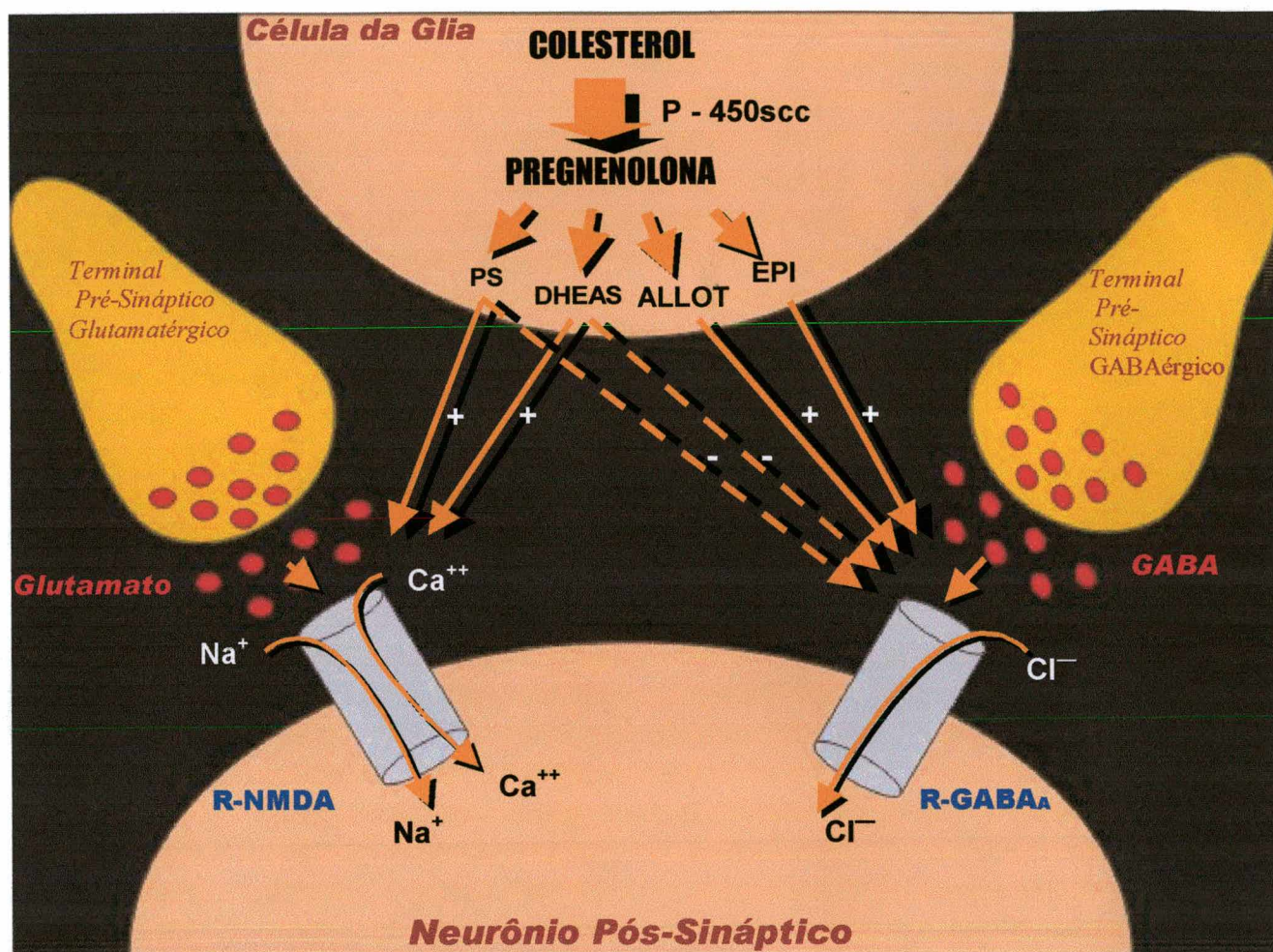


Figura 2. Modelo esquemático da modulação dos receptores NMDA e GABA-A pelos neuroesteróides (adaptada de Lancaster, 1994).

4.3. NEUROESTERÓIDES E ETANOL

Há evidências de que a alopregnanolona e a pregnanolona aumentam o prejuízo motor e o tempo de sono induzido pelo etanol em camundongos (Vanover *et al.*, 1999; Vanover, 1999). Czlonkowska *et al.* (2000),

demonstraram que a administração de alopregnanolona intracerebroventricularmente (i.c.v.) em camundongos, diminuiu a latência e aumentou a duração do tempo de sono, de maneira dependente da dose, enquanto que a progesterona não alterou a latência e o tempo de sono induzido pelo etanol. Contudo, o sulfato de dehidroepiandrosterona e o sulfato de pregnenolona, em algumas doses, diminuíram a duração do tempo de sono produzido pelo etanol. Estes pesquisadores sugerem que a falta dos efeitos da administração de progesterona indica que esta droga seja metabolizada periféricamente a esteróides neuroativos, que podem aumentar as ações do etanol relacionadas ao GABA, após sua interação no cérebro. Melchior e Allen (1992) e Melchior e Ritzmann (1992) também demonstraram que os neuroesteróides sulfato de pregnenolona e sulfato de dehidroepiandrosterona aumentaram o efeito hipotérmico do etanol, mas não interferiram na incoordenação motora ou no tempo de sono induzido pelo etanol, enquanto que a pregnanolona aumentou todos os três efeitos do etanol.

Melchior e Ritzmann (1996) mostraram que o sulfato de pregnenolona, sulfato de dehidroepiandrosterona, dehidroepiandrosterona e pregnenolona, foram capazes de bloquear o prejuízo da memória produzido pelo etanol (0,5 g/kg) em camundongos, quando avaliados no labirinto em T (*T-maze*). Um resultado surpreendente obtido por estes pesquisadores foi o bloqueio do

efeito do etanol (prejuízo da memória) pela pregnanolona, um modulador positivo do receptor GABA-A. Em contraste, a epipregnanolona, um antagonista específico da pregnanolona neste receptor (Prince e Simmonds, 1992), reduziu a capacidade deste neuroesteróide em bloquear o efeito do etanol. Assim, pode haver uma interação entre neuroesteróides que interfira nas ações do etanol.

Outros trabalhos mencionam que os neuroesteróides que modulam positivamente o receptor GABA-A de modo semelhante ao etanol, provavelmente potencializam os efeitos discriminativos do etanol, enquanto que os neuroesteróides que modulam negativamente este receptor ou positivamente o receptor NMDA de modo oposto ao etanol, possivelmente diminuem os efeitos do etanol (Bowen *et al.*, 1999). Outros estudos mostram que a tetrahydrodeoxicorticosterona (5α -THDOC), um neuroesteróide que aumenta a condutância dos íons cloreto no receptor GABA-A, aumentou este efeito do etanol, enquanto o sulfato de dehidroepiandrosterona, um modulador negativo deste receptor, não diminuiu o efeito do etanol (Bienkowski e Kostowski, 1997).

Recentes pesquisas realizadas por Mheta e Ticku (2001) mostraram que o sulfato de dehidroepiandrosterona inibiu a ligação do [H^3] flunitrazepam em menor grau no cerebelo de ratos dependentes ao etanol, quando comparados

ao grupo controle. Já a dehidroepiandrosterona foi mais potente em inibir a ligação do [H^3] TBPS (*t*-butilbiciclofosforotionato) no cerebelo e no córtex cerebral de ratos dependentes ao etanol, quando comparados ao grupo controle. Estas observações indicam que estes neuroesteróides modulam de modo diferente os receptores GABA-A em ratos dependentes de etanol, bem como em ratos controle. Sugerindo que os sítios de ligação destes neuroesteróides neste receptor têm um importante papel durante a dependência, bem como podem modular algumas mudanças neuroquímicas associadas à administração crônica de etanol.

Com respeito a participação de neuroesteróides na tolerância ao álcool, estudos prévios de nosso laboratório mostraram que o pré-tratamento com sulfato de pregnenolona ou sulfato de dehidroepiandrosterona, trinta minutos antes do etanol, estimulou o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora ao etanol (Barbosa, 1999). Além disso, em relação a estudos com injeções repetidas de álcool, observamos que a administração de sulfato de pregnenolona e epipregnanolona, respectivamente, estimulou e bloqueou o desenvolvimento da tolerância crônica ao prejuízo motor induzido pelo etanol (Barbosa, 1999; Barbosa e Morato, 2000). Não se sabe, no entanto, se durante o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol em animais

tratados ou não com neuroesteróides, haveria alguma alteração no imunoconteúdo da subunidade α_1 do receptor GABA-A.

A ação estimulatória do sulfato de pregnenolona no desenvolvimento de tolerância ao etanol foi revertida pela administração de (+)MK-801, um antagonista não competitivo do receptor NMDA. Por outro lado, o muscimol, um agonista do receptor GABA-A, bloqueou a tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol. Assim, seria importante verificar se o bloqueio pelo (+)MK-801 da tolerância rápida à incoordenação motora causada pelo etanol seria inibido por sulfato de pregnenolona. Além disso, seria importante observar a interação de (+)bicuculina, um antagonista do sítio do GABA no receptor GABA-A, e neuroesteróides na modulação da tolerância. Esses resultados poderiam fornecer evidências da participação dos receptores NMDA e GABA-A na modulação da tolerância ao álcool por neuroesteróides.

II - HIPÓTESES

A exposição prolongada ao álcool leva ao desenvolvimento de tolerância. O desenvolvimento da tolerância aos efeitos do álcool é influenciado por diferentes fatores (farmacodinâmicos, farmacocinéticos, cognitivos). Os neuroesteróides, que modulam positiva ou negativamente os receptores GABA-A e NMDA possivelmente exercem um papel chave nos vários fatores relacionados com esse fenômeno, especialmente, no que diz respeito aos receptores GABA-A. Assim, é possível que haja uma alteração no imunoconteúdo da subunidade α_1 dos receptores GABA-A hipocâmpais e corticais.

III - OBJETIVOS

O presente trabalho tem por **objetivo geral** estudar os fatores envolvidos na modulação da tolerância aos efeitos do etanol por neuroesteróides. Para atingir esse propósito, os seguintes **objetivos específicos** foram desenvolvidos:

1. Verificar a influência de neuroesteróides em um modelo de tolerância rápida à hipotermia produzida pelo.
2. Estudar a interação entre diferentes neuroesteróides no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora e hipotermia produzidas pelo etanol.
3. Investigar os efeitos da inibição da síntese de neuroesteróides da finasterida (inibidor da enzima 5α -redutase) e da indometacina (inibidor da enzima 3α -hidroxiesteróide-redutase) no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol.
4. Complementar o estudo sobre a participação dos sistemas GABA-A e NMDA nos efeitos de neuroesteróides na tolerância rápida ao etanol pelo uso de (+)bicuculina e (+)MK-801.

5. Estudar a importância de fatores cognitivos na modulação da tolerância rápida por neuroesteróides.
6. Verificar se a interferência na tolerância rápida ao etanol exercida por neuroesteróides apresenta um componente farmacocinético.
7. Avaliar o imunoconteúdo da subunidade α_1 do receptor GABA-A após o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol em tecidos cerebrais de animais tratados com neuroesteróides, utilizando-se da técnica de *Western Blot*.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Suíços, machos, mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, com 2 meses de idade e peso entre 28 - 34 g, mantidos em ambiente com temperatura de 23 ± 1 °C, com ciclo de luz, claro/escuro, de 12 h (luz ligada às 6 hs), tendo água e comida *ad libitum*. O presente estudo procurou seguir as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institutes of Health (NIH) 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°. 058/2001).

2. DROGAS e REAGENTES

As seguintes drogas foram utilizadas: etanol absoluto p.a. Merck (grau de pureza 99,8%), diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%) a 14% (p/v), em todos os experimentos; sulfato de pregnenolona (5-pregnen-3 β -ol-20-one sulfate sodium), sulfato de dehidroepiandrosterona (5-androsten-3 β -ol-17-one sulfate sodium), (+) MK-801 (Research Biochemicals International; EUA) e preparadas nas concentrações apropriadas, em solução fisiológica;

epipregnanolona, alotetrahydrodeoxicorticosterona (5α -pregnane- $3\alpha,21$ -diol-20-one) (Sigma Chemical Company; EUA) e dissolvidas em concentrações apropriadas em 1% de Tween 80 e solução fisiológica; finasterida (Sigma Chemical Company; EUA) dissolvida numa mistura de 80% óleo de milho; indometacina (Sigma Chemical Company; EUA) dissolvida em solução tampão de Tris (pH 7,4) e (+)bicuculina (Sigma Chemical Company; EUA) dissolvida em solução tampão de PBS (pH 7,0). A solução fisiológica (salina) foi preparada com NaCl (Merck) em água destilada, na concentração de 0,9%. Todas as soluções foram livremente preparadas e administradas por via intraperitoneal (i.p.) e todos os volumes injetados foram de 1ml/kg de peso corporal, exceto para o etanol que foi ajustado de acordo com a dose utilizada.

As doses das várias drogas utilizadas no presente estudo foram retiradas da literatura e/ou baseadas em resultados de estudos preliminares (Barbosa, 1999; Barbosa e Morato 2000; Melchior e Ritzmann, 1996).

Os seguintes reagentes foram utilizados: Bis-acrilamida (Sigma); Acrilamida (Sigma); Tris (Pharmacia Biotech); SDS (sódio dodecil sulfato; Pharmacia Biotech); Ácido Bórico (Pharmacia Biotech); EDTA (Merck); NaCl (Merck); kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech); Glicina (Pharmacia Biotech) e BSA (soroalbumina bovina; Sigma).

3. EQUIPAMENTOS

3.1. ROTA-ROD:

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

3.2. TERMÔMETRO:

Termômetro digital (modelo 8402-00), fabricado pela Cole-Parmer Instrument Company, contém um sensor flexível de 2,5 mm de diâmetro.

3.3. ELETROTRANSFERÊNCIA:

Sistema de eletrotransferência (modelo TE22 e fonte EPS301), fabricado pela Amersham Pharmacia Biotech.

4. PROCEDIMENTO GERAL

4.1. TREINAMENTO DOS CAMUNDONGOS NO ROTA-ROD

O treinamento consistiu em quatro treinos diários durante três dias, no aparelho de rota-rod. O equipamento permitiu o treino de quatro animais por vez, sendo o intervalo de tempo entre um treinamento e outro, foi de aproximadamente dois minutos. O animal era colocado no aparelho, sob aceleração contínua (1 r.p.m./s), e a queda do animal do eixo giratório era registrada. Ao caírem, recebiam um choque de 0,2 mA nas patas (2 s). Após o período dos treinos, os animais foram selecionados de acordo com uma linha de base estável de, no mínimo, 20 r.p.m./s para a realização dos testes. Os animais selecionados apresentaram valores basais de 20 a 40 r.p.m./s e a porcentagem de aproveitamento dos animais foi de aproximadamente 90 – 92%.

4.2. TESTE NO APARELHO DO ROTA-ROD

Nos testes, primeiramente, foi feito o registro da medida basal, que constitui na avaliação da velocidade (r.p.m.) em que o animal, já treinado, caía do eixo giratório. Os animais receberam, intraperitonealmente, injeção de solução fisiológica ou etanol, em doses apropriadas e foram colocados no rota-rod em intervalos de 30, 60 e 90 minutos após a injeção, para observação de

seu desempenho. A velocidade de queda de cada animal, obtida aos 30, 60 e 90 minutos após a injeção, foi comparada com o respectivo valor basal, para a verificação da incoordenação motora. Dentre os valores obtidos para cada animal, registrou-se a pior desempenho. Após 24 horas, todos os animais foram retestados, sob efeito de etanol e o prejuízo motor máximo induzido em cada um foi calculado, conforme descrito por Barreto *et al.* (1998) e Barbosa e Morato (2000), pela fórmula:

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

4.3. TREINAMENTO DOS CAMUNDONGOS COM O TERMÔMETRO

Os animais foram previamente manuseados por três dias antes do experimento com o termômetro digital, com a finalidade de habituar o animal ao equipamento e, assim, minimizar a ocorrência de estresse. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas durante 30 minutos em ambiente com temperatura de 23 ± 1 °C e, em seguida, um sensor lubrificado com Vaselina foi inserido 2,5 cm dentro do reto, sendo o registro da temperatura estável obtido em aproximadamente 30 segundos. Em todos os experimentos os animais apresentaram valores basais entre 36,7 e 37,4 °C.

4.4. TESTE DE HIPOTERMIA

Nos testes, primeiramente foi determinada a temperatura corporal basal. Os animais receberam, intraperitonealmente, injeção de solução fisiológica ou etanol, em doses apropriadas e foram avaliadas as temperaturas corporais em intervalos de 30, 60 e 90 minutos após a injeção. A temperatura corporal obtida aos 30, 60 e 90 minutos após a injeção, foi comparada com o respectivo valor da temperatura basal para a verificação da hipotermia. Dentre os valores obtidos, para cada animal, registrou-se a variação na queda da temperatura. Após 24 horas, todos os animais foram retestados, sob efeito de etanol e a variação da temperatura induzida nos animais foi calculada pela fórmula:

$$\text{Variação da temperatura (°C)} = \text{menor temperatura do teste} - \text{temperatura basal}$$

4.5. WESTERN BLOT

Obtenção das amostras

Após o tratamento para desenvolvimento de tolerância crônica ao etanol, na presença ou não de neuroesteróides (sulfato de pregnenolona e epipregnanolona), os animais foram sacrificados 30 min após a administração de etanol no décimo terceiro dia. Seus cérebros foram retirados, e seus hipocampos e córtex cerebrais dissecados em meio refrigerado.

Separação de proteínas

Os hipocampus e os córtex foram homogeneizados em relação 1/10 (p/v) em tampão de homogeneização (100mM EDTA, 200mM PMSF e 50mM Tris, pH 7,0) e, a seguir, centrifugados 1000 xg durante 5 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e, as proteínas foram dosadas para preparação de amostras para eletroforese. As proteínas (100µg/poço) foram separadas por SDS-PAGE (eletroforeses em gel de poliacrilamida contendo SDS), usando gel gradiente 7,5-15% e gel de entrada 4% (Bunn *et al.*, 1995).

Eletrotransferência e imunodeteção

As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose usando corrente de 300mA (3 h; 4°C). Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas (1h) com leite desnatado 5% em TBS (Tris 10mM, NaCl 150mM, pH7,5) e, a seguir, lavadas uma vez durante 5 min com TBS-T (Tween-20 0,05%, Tris 10mM, NaCl 150mM, pH7,5). Um segundo bloqueio (1 h) foi realizado usando 2,5% de gelatina em TBS, seguido de nova lavagem (três vezes por 5 min) em TBS-T (Baldo, 1994; Collins & Sim, 1998). Finalmente, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-GABA_A-α₁ e, a seguir, lavadas quatro vezes durante 5 min com TBS-T.

Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas (1 h) com anticorpo secundário específico (*rabbit*, ligado à peroxidase) e, após três lavagens (por 5 min) com TBS-T e uma vez (por 5 min) com TBS, foram revelados através de kit de quimioluminescência (sistema ECL), seguindo as recomendações do fabricante.

Dosagem de proteína

As proteínas foram dosadas através do método de Peterson (1977). Sobre alíquotas de 2 µl das amostras foram adicionadas 398 µl de H₂O e 400 µl do reagente de Lonry (0,2 N NaOH; 2,5% DSD; 5% Na₂CO₃; 0,2% SUSO₄; 0,1% de tartarato duplo de Na⁺ e K⁺). Em seguida, foram adicionados 200 µl do reagente de folin 0,4% N e incubados por 30 min. A leitura foi realizada em 750 nm e as concentrações de proteínas foram obtidas através de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina “BSA” .

4.6. DOSAGEM ALCÓÓLICA

A dosagem alcoólica foi determinada por método enzimático, baseado na conversão do álcool para aldeído pela ação da desidrogenase. As amostras de sangue foram colhidas de animais não aproveitados nos testes, por punção intracardiaca (0,7 - 1 ml), com a utilização de uma agulha intradérmica, em

seringa de 1 ml. O sangue foi então transferido para o tubo de ensaio, contendo o anticoagulante EDTA, e armazenado em um refrigerador. No momento das dosagens, as amostras foram centrifugadas a 600 r.p.m., durante 10 minutos. Em seguida, foi retirado cerca de 0,3 – 0,5 ml do sobrenadante, adicionando-se uma solução composta de NAD; ADH; tampão de citrato de sódio, além do corante monotetrazolium. Após um período de repouso de 24 horas, a densidade ótica das amostras foi medida através de um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm, determinando-se então a concentração de álcool nas amostras (mg/dl).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) tendo como variáveis independentes o primeiro pré-tratamento, o segundo pré-tratamento, o tratamento e o dia, dependendo do experimento realizado e, como variáveis dependentes a incoordenação motora máxima ou variação máxima na queda da temperatura. O teste *post hoc* empregado foi o teste de Tukey. Para as dosagens alcoólicas cerebrais foi realizada a ANOVA de uma via. Para a quantificação da subunidade α_1 do receptor GABA-A, a análise estatística foi realizada através da ANOVA e o teste *post hoc*

empregado foi o teste de Duncan. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado como nível de significância em todos os experimentos.

V - EXPERIMENTOS E RESULTADOS

Influência de neuroesteróides na tolerância rápida

Experimento 1: Efeito de diferentes doses de etanol sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico.

Este experimento foi realizado com o intuito de selecionar uma dose de etanol que produzisse tolerância rápida, e uma outra dose que não produzisse tolerância ao efeito hipotérmico induzido pelo etanol. Para tal, camundongos previamente habituados com o procedimento de medida da temperatura, no Dia 2, foram divididos em oito grupos com dez animais em cada um. No Dia 1, quatro grupos receberam 4,0 g/kg de etanol ou salina sendo a resposta hipotérmica medida aos 30,60 e 90 minutos. Logo após, os animais retornaram para suas gaiolas-moradia. No Dia 2 os animais receberam etanol (1,75; 2,0; 2,25 ou 2,5 g/kg) e a resposta hipotérmica foi medida para avaliar o grau de tolerância rápida.

Resultados

Os resultados destes experimentos indicam que os camundongos tratados com etanol (4,0 g/kg) no Dia 1, manifestaram menor resposta hipotérmica ao etanol significativa em relação aos grupos controles, de modo dependente da dose (Figura 3). No Dia 2, verificou-se que os grupos tratados com etanol, nas doses 1,75 ou 2,5 g/kg, não apresentaram tolerância, enquanto

que nos grupos que receberam etanol nas doses de 2,0 ou 2,25 g/kg [$F_{(1,72)} = 13,33$; $p < 0,0001$], observou-se o desenvolvimento da tolerância rápida. A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que nestes grupos de animais houve significativa redução da hipotermia, sugerindo o desenvolvimento da tolerância rápida. A dose de 2,0 g/kg de etanol produziu tolerância mais evidente do que a dose de 2,25 g/kg e, por este motivo, foi escolhida, juntamente com a dose de 2,5 g/kg, para a realização dos experimentos seguintes.

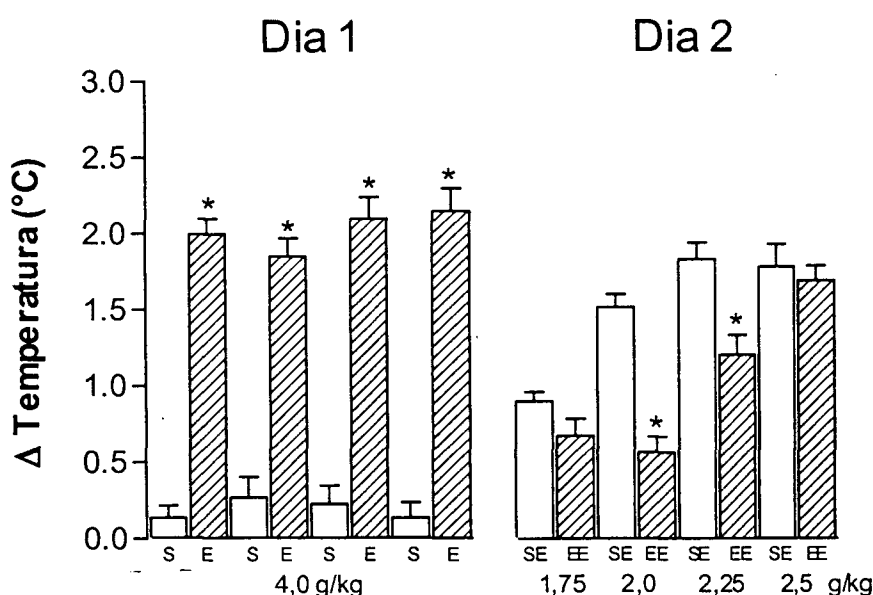


Figura 3 - Desenvolvimento da tolerância rápida à hipotermia induzida por diferentes doses de etanol (1,75; 2,0; 2,25 ou 2,5 g/kg) em camundongos. No Dia 1, o grupo controle recebeu salina (S) e os demais grupos receberam etanol (E) (4,0 g/kg). Os animais foram testados 30 minutos após a injeção de salina ou etanol. Após 24 horas (dia 2), todos os grupos controle e experimental foram tratados com etanol (1,75; 2,0; 2,25 ou 2,5 g/kg) e testados novamente. Os resultados representam as médias \pm E.P.M. de 10 animais. * $p < 0,05$ (teste Tukey).

Experimento 2: Efeito do sulfato de pregnenolona e do sulfato de dehidroepiandrosterona sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.

Para este experimento, o objetivo foi investigar se os neuroesteróides, sulfato de pregnenolona (modulador positivo do receptor NMDA e negativo do receptor GABA-A) e sulfato de dehidroepiandrosterona (modulador negativo do receptor GABA-A), facilitariam a aquisição da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Animais previamente habituados com o método, foram divididos em dois grupos: A e B. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam salina e sulfato de pregnenolona ou sulfato de dehidroepiandrosterona. As doses de sulfato de pregnenolona foram de 0,08 mg/kg (Figura 4A) e 0,15 mg/kg (Figura 4B) e sulfato de dehidroepiandrosterona 0,15 mg/kg (Figura 5A) e 0,20 mg/kg (Figura 5B), respectivamente. Após 30 minutos, cada um dos subgrupos foi redividido em dois, recebendo, cada um 4,0 g/kg de etanol ou salina. A seguir, a resposta hipotérmica foi avaliada aos 30, 60 e 90 minutos e os animais retornaram posteriormente às suas gaiolas. No Dia 2, todos os animais foram tratados com a dose de 2,5 g/kg de etanol, e a resposta hipotérmica foi avaliada.

Resultados

A Figura 4 ilustra a influência do sulfato de pregnenolona sobre o desenvolvimento da tolerância rápida. A administração prévia de sulfato de pregnenolona, na dose de 0,15 mg/kg, foi capaz de facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol no Dia 2. Entretanto, não houve redução do efeito hipotérmico nos grupos controle tratados com etanol em ambos os dias (EE), confirmando que a dose de 2,5 g/kg de etanol não produz tolerância rápida. A ANOVA de três vias mostrou efeito significativo para os fatores tratamento com etanol: (Fig. 4A: $F_{(1,36)} = 13,976$, $p < 0.0008$; Fig. 4B: $F_{(1,36)} = 23,834$, $p < 0.0001$); dia (Fig. 4A: $F_{(1,36)} = 10,946$, $p < 0.0025$; Fig. 4B: $F_{(1,36)} = 11,335$, $p < 0.0018$) e para a interação pré-tratamento x tratamento x dia (Fig. 4B: $F_{(1,36)} = 11,434$, $p < 0.0017$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com sulfato de pregnenolona, na dose 0,15 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 1, comparado aos grupos controles. Contudo, a dose 0,08 mg/kg não foi capaz de facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida (Figura 4A).

Similarmente, a figura 5 ilustra influência do sulfato de dehidroepiandrosterona sobre o desenvolvimento da tolerância rápida. A administração prévia de sulfato de dehidroepiandrosterona na dose de 0,20

mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol no Dia 2. Como no experimento anterior, não houve redução do efeito hipotérmico nos grupos controle tratados com etanol em ambos os dias (EE). A ANOVA de três vias detectou significância para os fatores tratamento com etanol: (Fig. 5A: $F_{(1.36)} = 11,314$, $p < 0.0022$; Fig. 5B: $F_{(1.36)} = 11,499$, $p < 0.0017$); dia (Fig. 5A: $F_{(1.36)} = 15,749$, $p < 0.0004$; Fig. 5B: $F_{(1.36)} = 37,976$, $p < 0.0001$) e para a interação pré-tratamento x tratamento x dia (Fig. 5B: $F_{(1.36)} = 7,918$, $p < 0.0078$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com sulfato de dehidroepiandrosterona, na dose 0,20 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 1, comparado aos grupos controles, mas a dose de 0,15 mg/kg não foi capaz de facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida (Figura 5A).

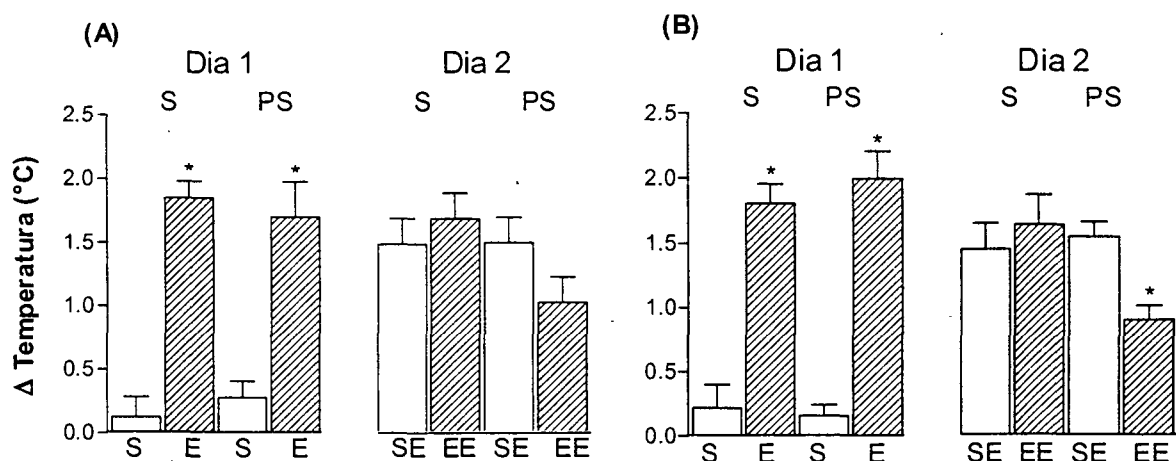


Figura 4 - Efeito do sulfato de pregnenolona no desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Quatro grupos receberam salina (S) e outros quatro grupos receberam sulfato de pregnenolona (PS) nas doses de 0,08 (A) ou 0,15 (B) mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 4,0 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol foi observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose 2,5 g/kg, i.p. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

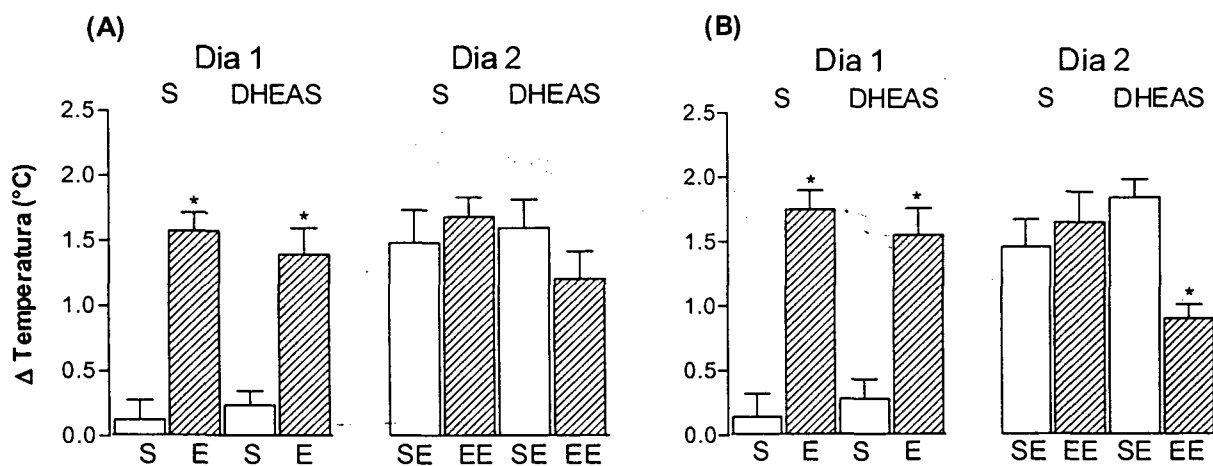


Figura 5 - Efeito do sulfato de dehidroepiandrosterona no desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Quatro grupos receberam salina (S) e outros quatro grupos receberam sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) nas doses de 0,15 (A) ou 0,20 (B) mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 4,0 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol foi observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose 2,5 g/kg, i.p. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 3: Efeito da epipregnanolona e alotetrahydrodeoxicorticosterona sobre a tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.

Para este experimento, o objetivo foi investigar se os neuroesteróides, epipregnanolona e alotetrahydrodeoxicorticosterona, moduladores positivo do receptor GABA-A, interfeririam na aquisição da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em dois grupos: A e B. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam salina e epipregnanolona ou alotetrahydrodeoxicorticosterona. As doses de epipregnanolona foram de 0,15 mg/kg (Figura 6A) e 0,30 mg/kg (Figura 6B) e alotetrahydrodeoxicorticosterona 0,10 mg/kg (Figura 7A) e 0,20 mg/kg (Figura 7B), respectivamente. Após 30 minutos, cada um dos subgrupos foi redividido em dois, recebendo, cada um 4,0 g/kg de etanol ou salina. A seguir, a resposta hipotérmica foi avaliada aos 30, 60 e 90 minutos e os animais retornaram posteriormente às suas gaiolas. No Dia 2, todos os animais foram tratados com a dose de 2,25 g/kg de etanol, e a resposta hipotérmica foi avaliada.

Resultados

A Figura 6 mostra a influência da epipregnanolona sobre o desenvolvimento da tolerância rápida. No Dia 2, a administração prévia de epipregnanolona na dose de 0,30 mg/kg, foi capaz de bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Contudo, no Dia 2 do experimento, houve redução do efeito hipotérmico, de forma significativa, nos grupos controle administrados com etanol em ambos os dias (EE) sugerindo que a dose de 2,0 g/kg de etanol produz tolerância rápida. A ANOVA de três vias considerou significativa os fatores tratamento com etanol: (Fig. 6A: $F_{(1,36)} = 22,274$, $p < 0.0001$; Fig. 6B: $F_{(1,36)} = 29,083$, $p < 0.0001$); dia (Fig. 6A: $F_{(1,36)} = 7,237$, $p < 0.0107$) e pré-tratamento com epipregnanolona (Fig. 6B: $F_{(1,36)} = 6,284$, $p < 0.016$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com epipregnanolona (0,30 mg/kg) bloqueou a tolerância rápida, no Dia 1, comparado aos grupos controles. Na dose menor (0,15 mg/kg), no entanto, a epipregnanolona bloqueou parcialmente o desenvolvimento da tolerância rápida (Figura 6A).

Similarmente, a influência da alotetrahydrodeoxicorticosterona sobre o desenvolvimento da tolerância rápida está representada na Figura 7. No Dia 2, a administração prévia de alotetrahydrodeoxicorticosterona na dose de 0,20

mg/kg, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Os grupos controles tratados com etanol nos dois dias de experimento (grupo EE) mostraram menor hipotermia no Dia 2. A ANOVA de três vias detectou significante os fatores tratamento com etanol: (Fig. 7A: $F_{(1.36)} = 13,413$, $p < 0.0007$; Fig. 7B: $F_{(1.36)} = 28,187$, $p < 0.0001$) e interação pré-tratamento x tratamento x dia (Fig. 7A: $F_{(1.36)} = 6,650$, $p < 0.0141$; Fig. 7B: $F_{(1.36)} = 4,921$, $p < 0.0329$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com alotetrahydrodeoxicortisterona, na dose 0,20 mg/kg, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 1, comparado aos grupos controles, mas a dose 0,10 mg/kg teve apenas um bloqueio parcial sobre o desenvolvimento da tolerância rápida (Figura 7A).

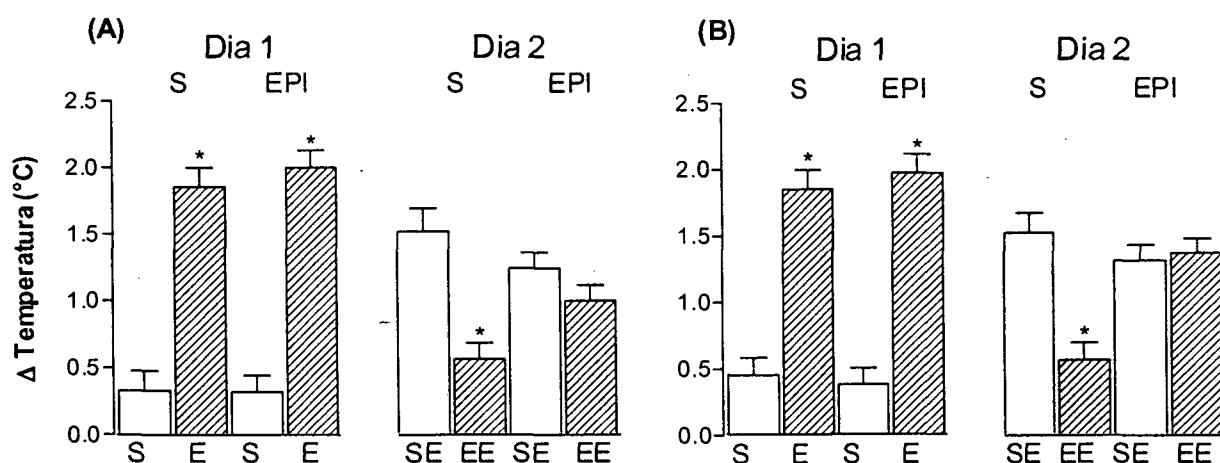


Figura 6 - Efeito da epipregnanolona no desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Quatro grupos receberam salina (S) e outros quatro grupos receberam epipregnanolona (EPI) nas doses de 0,15 (A) ou 0,30 (B) mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 4,0 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol foi observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose 2,0 g/kg, i.p. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

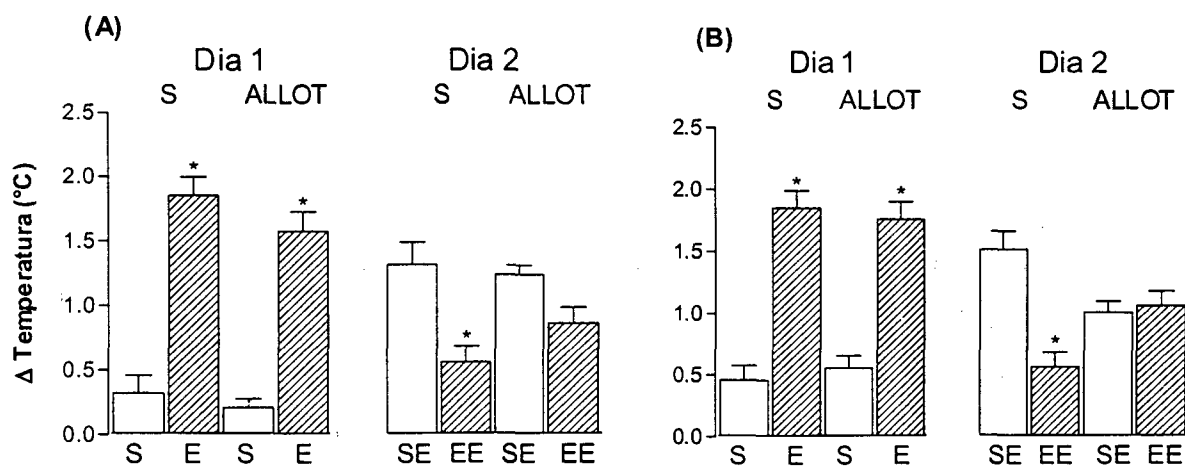


Figura 7 - Efeito da alotetrahydrodeoxycorticosterona no desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Quatro grupos receberam salina (S) e outros quatro grupos receberam alotetrahydrodeoxycorticosterona (ALLOT) nas doses de 0,10 (A) ou 0,20 (B) mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 4,0 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol foi observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose 2,0 g/kg, i.p. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

*Fatores farmacodinâmicos na influência de neuroesteróides na
tolerância rápida*

Experimento 4: Efeito do pré-tratamento com epipregnanolona sobre a facilitação da tolerância rápida ao etanol produzida pelo sulfato de pregnenolona e pelo sulfato de dehidroepiandrosterona no teste do Rota-rod.

Para este experimento, o objetivo foi investigar se o neuroesteróide, epipregnanolona, um antagonista do sítio de neuroesteróides no receptor GABA-A, interferiria na facilitação da tolerância rápida à incoordenação motora ao etanol produzida pelo sulfato de pregnenolona e pelo sulfato de dehidroepiandrosterona. Animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em dois grupos: A e B. Cada grupo foi tratado com epipregnanolona nas doses de 0,15 (Figura 8A) e 0,30 mg/kg (Figura 8B) e, após 15 minutos, cada um dos grupos foi subdividido em dois, recebendo cada um, sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) ou salina, respectivamente. Após 30 minutos cada grupo foi novamente dividido, recebendo etanol (1,9 g/kg) ou salina. A seguir, a incoordenação motora foi avaliada aos 30, 60 e 90 minutos e os animais retornaram posteriormente às suas gaiolas. No Dia 2, todos os animais foram tratados com a mesma dose de etanol (1,9 g/kg), e a incoordenação motora foi avaliada. Em outros grupos de animais, procedimento similar foi seguido, exceto quanto ao sulfato de dehidroepiandrosterona, que foi utilizado na dose de 0,15 mg/kg (Figura 9A e 9B).

Resultados

Os resultados desse experimento estão representados na Figura 7. A ANOVA multivariada revelou efeitos significantes para os fatores: tratamento com etanol (Fig. 8A: $F_{(1,72)} = 172,238$; $p < 0,0001$; Fig. 8B: $F_{(1,72)} = 150,543$; $p < 0,0001$), tratamento com sulfato de pregnenolona (Fig. 8A: $F_{(1,72)} = 13,94$; $p < 0,0003$), pré-tratamento com epipregnanolona (Fig. 8A: $F_{(1,72)} = 4,955$; $p < 0,0292$) e dia (Fig. 8A: $F_{(1,72)} = 135,996$; $p < 0,0001$; Fig. 8B: $F_{(1,72)} = 306,231$; $p < 0,0001$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que o pré-tratamento com epipregnanolona não bloqueou o efeito estimulatório da tolerância rápida pelo sulfato de pregnenolona.

Similarmente, a Figura 9 ilustra a influência da epipregnanolona sobre a facilitação da tolerância pelo sulfato de dehidroepiandrosterona. No Dia 1, a administração prévia de epipregnanolona, foi capaz de bloquear a facilitação da tolerância rápida pelo sulfato de dehidroepiandrosterona no Dia 2. A ANOVA multivariada detectou efeitos significantes para os fatores: tratamento com etanol (Fig. 9A: $F_{(1,72)} = 239,534$; $p < 0,0001$; Fig. 9B: $F_{(1,72)} = 253,119$; $p < 0,0001$), tratamento com sulfato de dehidroepiandrosterona (Fig. 9A: $F_{(1,72)} = 12,792$; $p < 0,0006$; Fig. 9B: $F_{(1,72)} = 4,961$; $p < 0,0291$) e dia (Fig. 9A: $F_{(1,72)} = 155,331$; $p < 0,0001$; Fig. 9B: $F_{(1,72)} = 197,450$; $p < 0,0001$). A

análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que o tratamento prévio com as duas doses de epipregnanolona bloqueou o efeito estimulatório da tolerância rápida pelo sulfato de dehidroepiandrosterona.

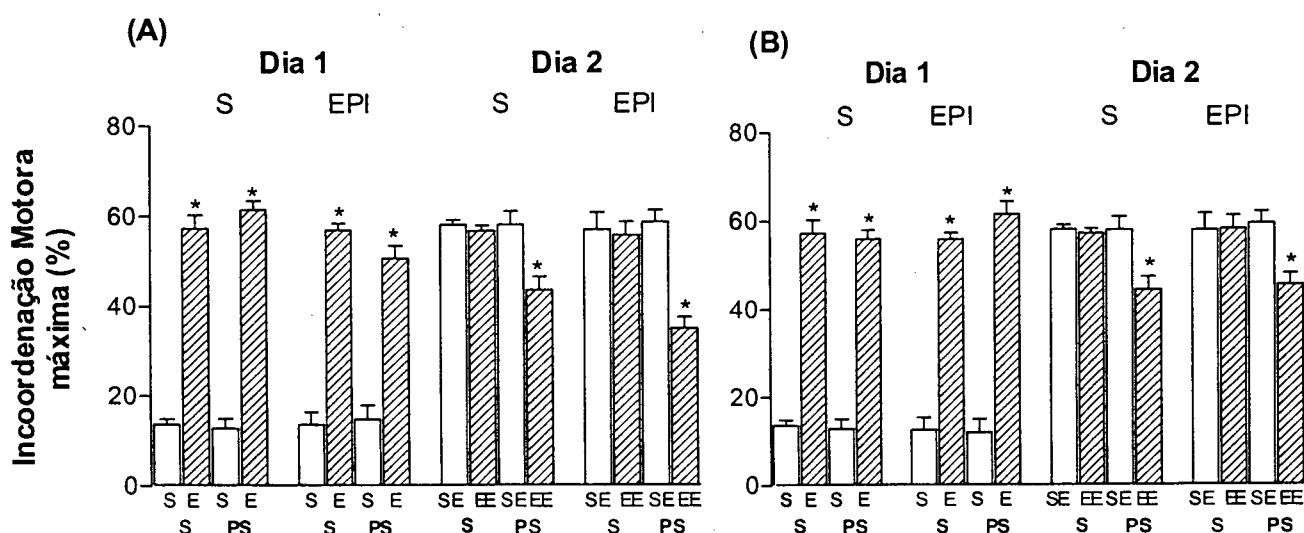


Figura 8 – Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a facilitação do sulfato de pregnenolona na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. Um foi injetado com epipregnanolona (EPI) 0,15 (A) ou 0,30 (B) mg/kg e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com sulfato de pregnenolona (PS) 0,08 mg/kg e a outra com salina (S). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 1,9 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 1,9 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

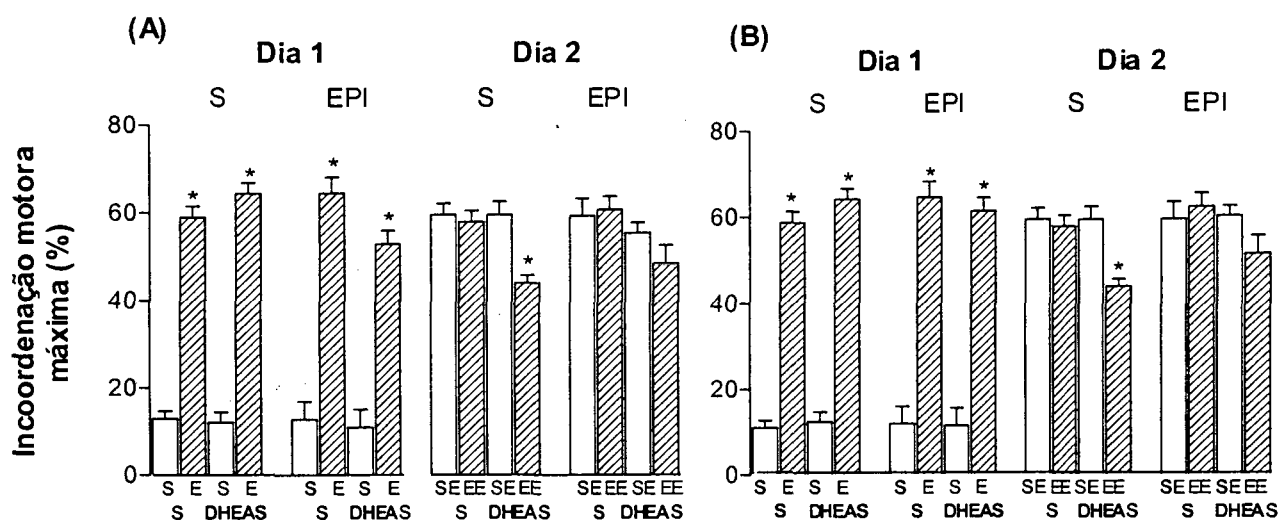


Figura 9 – Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a facilitação do sulfato de dehidroepiandrosterona na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. Um foi injetado com epipregnanolona (EPI) 0,15 (A) ou 0,30 (B) mg/kg e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) 0,15 mg/kg e a outra com salina (S). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 1,9 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 1,9 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 5: Efeito do pré-tratamento com epipregnanolona sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol produzida pela alotetrahydrodeoxicorticosterona no teste do Rota-rod.

Para este experimento, o objetivo também foi investigar se o neuroesteróide, epipregnanolona, um antagonista do sítio de neuroesteróides, interferiria no bloqueio da tolerância rápida à incoordenação motora ao etanol produzida pela alotetrahydrodeoxicorticosterona. Animais previamente

treinados e selecionados, foram divididos em dois grupos: A e B. Cada grupo foi tratado com epipregnanolona nas doses de 0,15 (Figura 10A) e 0,30 mg/kg (Figura 10B), e após 15 minutos, cada um dos grupos foi subdividido em dois, recebendo, cada um alotetrahydrodeoxicorticosterona (0,10 mg/kg) ou salina, respectivamente. Após 30 minutos cada grupo foi novamente dividido, recebendo etanol (2,25 g/kg) ou salina. A seguir, a incoordenação motora foi avaliada aos 30, 60 e 90 minutos e os animais retornaram posteriormente às suas gaiolas. No Dia 2, todos os animais foram tratados com a dose mesma dose de etanol (2,25 g/kg), e a incoordenação motora foi reavaliada.

Resultados

A Figura 10 mostra a influência da epipregnanolona sobre o bloqueio da tolerância rápida pela alotetrahydrodeoxicorticosterona. A ANOVA multivariada revelou significante os fatores tratamento com etanol (Fig. 10A: $F_{(1,72)} = 143,915$; $p < 0,0001$; Fig.10B: $F_{(1,72)} = 132,662$; $p < 0,0001$), dia (Fig. 10A: $F_{(1,72)} = 154,859$; $p < 0,0001$; Fig. 10B: $F_{(1,72)} = 144,976$; $p < 0,0001$) e interação pré-tratamento x tratamento x dia (Fig. 10A: $F_{(1,36)} = 11,868$; $p < 0,0009$; Fig. 10B: $F_{(1,72)} = 5,326$; $p < 0,0239$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que o pré-tratamento com epipregnanolona (0,15 mg/kg)

bloqueou o efeito inibitório da tolerância rápida pela alotetrahydrodeoxicorticosterona. No entanto, a dose 0,30 mg/kg de epipregnanolona não foi capaz de bloquear o efeito inibitório da tolerância rápida pela alotetrahydrodeoxicorticosterona (Figura 10B).

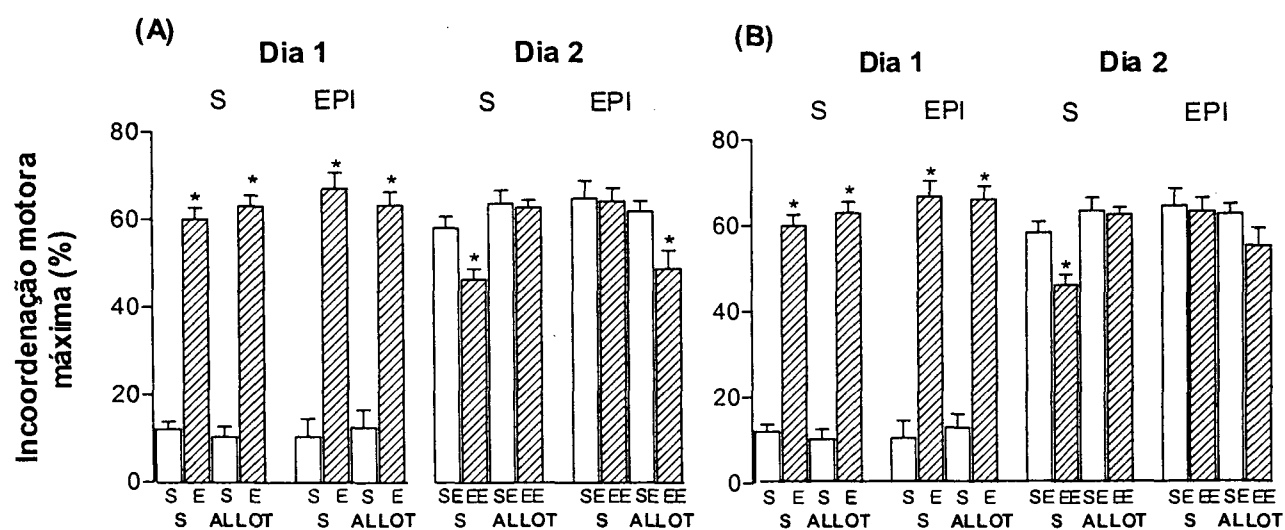


Figura 10 – Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a interferência da alotetrahydrodeoxicorticosterona na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. Um foi injetado com epipregnanolona (EPI) 0,15 (A) ou 0,30 (B) mg/kg e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com alotetrahydrodeoxicorticosterona (ALLOT) 0,10 mg/kg e a outra com salina (S). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 2,25 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 2,25 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 6: Efeitos do pré-tratamento com epipregnanolona sobre a facilitação da tolerância rápida ao etanol produzida pelo sulfato de pregnenolona e pelo sulfato de dehidroepiandrosterona no teste da temperatura.

Para este experimento, o objetivo foi investigar se a associação entre os neurosteróides influenciaria a facilitação da tolerância rápida ao efeito hipotérmico pelo sulfato de pregnenolona (0,15 mg/kg) e sulfato de dehidroepiandrosterona (0,20 mg/kg). Foi seguido um procedimento similar àquele usado no experimento 5, exceto que no Dia 1, grupos de animais foram previamente tratados com epipregnenolona na dose de 0,30 mg/kg e etanol na dose de 4,0 g/kg e a resposta hipotérmica foi medida aos 30, 60 e 90 minutos. No Dia 2, todos os animais receberam etanol na dose de 2,5 g/kg.

Resultados

A Figura 11 ilustra a influência da epipregnanolona sobre a facilitação da tolerância rápida pelo sulfato de pregnenolona. No Dia 1, a administração prévia de epipregnanolona, foi capaz de bloquear a facilitação da tolerância rápida pelo sulfato de pregnenolona no Dia 2. A ANOVA multivariada vias

revelou efeito significativo dos fatores: tratamento com etanol (Fig. 11: $F_{(1,72)} = 58,783$; $p < 0,0001$), dia (Fig. 11: $F_{(1,72)} = 6,982$; $p < 0,01$) e interação pré-tratamento x tratamento x dia (Fig. 11: $F_{(1,36)} = 5,375$; $p < 0,0232$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que o tratamento prévio com epipregnanolona bloqueou o efeito estimulatório da tolerância rápida pelo sulfato de pregnenolona.

Similarmente, a influência da epipregnanolona sobre a facilitação da tolerância pelo sulfato de dehidroepiandrosterona está representada na Figura 12. No Dia 1, a administração prévia de epipregnanolona, impediu a facilitação da tolerância rápida pelo sulfato de dehidroepiandrosterona no Dia 2. A ANOVA multivariada vias detectou efeito significativo para os fatores: tratamento com etanol (Fig. 12: $F_{(1,72)} = 41,414$; $p < 0,0001$), tratamento com sulfato de dehidroepiandrosterona (Fig. 12: $F_{(1,72)} = 7,258$; $p < 0,0087$) e dia (Fig. 12: $F_{(1,72)} = 5,096$; $p < 0,027$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que o tratamento prévio com epipregnanolona bloqueou o efeito estimulatório da tolerância rápida pelo sulfato de dehidroepiandrosterona.

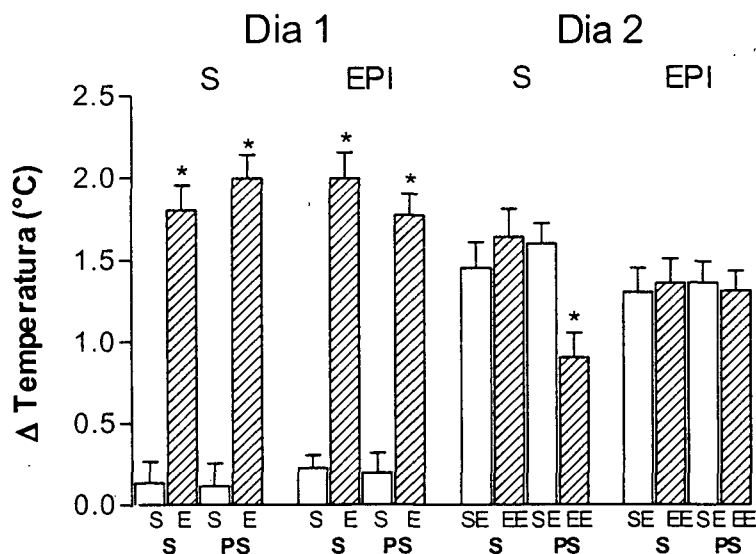


Figura 11 – Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a facilitação do sulfato de pregnenolona na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. O primeiro foi injetado com epipregnanolona (EPI) 0,30 mg/kg e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com sulfato de pregnenolona (PS) 0,15 mg/kg e a outra com salina (S). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 4,0 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 2,5 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

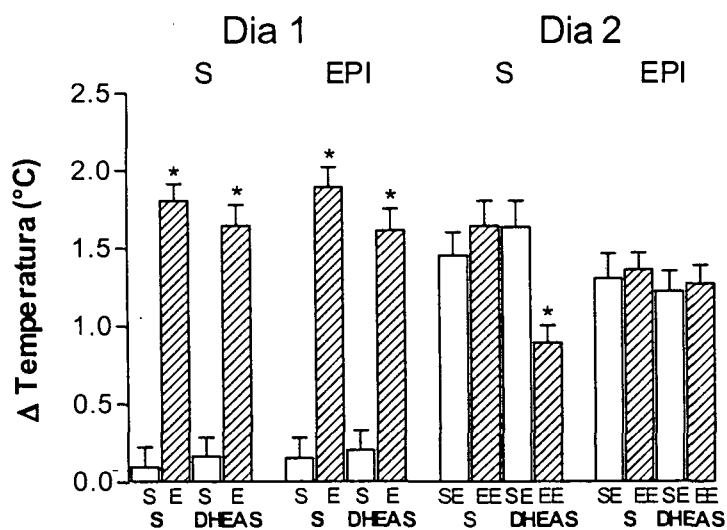


Figura 12 – Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a facilitação do sulfato de dehidroepiandrosterona na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. O primeiro foi injetado com epipregnanolona (EPI) 0,30 mg/kg e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) 0,20 mg/kg e a outra com salina (S). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 4,0 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 2,5 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 7: Efeito do pré-tratamento com epipregnanolona sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol produzido pela alotetrahydrodeoxicorticosterona no teste da temperatura.

Para este experimento, o objetivo foi investigar se a associação entre os neurosteróides também influenciaria no bloqueio da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do álcool pela alotetrahydrodeoxicorticosterona (0,20 mg/kg). Foi seguido um procedimento similar ao descrito no experimento anterior, exceto que no Dia 1, grupos de animais foram previamente tratados com epipregnenolona na dose de 0,30 mg/kg e etanol na dose de 4,0 g/kg e a resposta hipotérmica foi medida aos 30, 60 e 90 minutos. No Dia 2, todos os animais receberam etanol na dose de 2,0 g/kg.

Resultados

A Figura 13 mostra a influência da epipregnanolona sobre o bloqueio da tolerância rápida pela alotetrahydrodeoxicorticosterona. A administração prévia de epipregnanolona no Dia 1, impediu o bloqueio da tolerância rápida pela alotetrahydrodeoxicorticosterona observado no Dia 2. A ANOVA de três vias revelou efeito significativo para os fatores: tratamento com etanol (Fig. 13:

$F_{(1,72)} = 44,614$; $p < 0,0001$), tratamento com alotetrahydrodeoxicorticosterona (Fig. 13: $F_{(1,72)} = 6,241$; $p < 0,0147$) e pré-tratamento com epipregnanolona (Fig. 13: $F_{(1,72)} = 6,787$; $p < 0,0111$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com epipregnanolona bloqueou a inibição da tolerância rápida pela alotetrahydrodeoxicorticosterona.

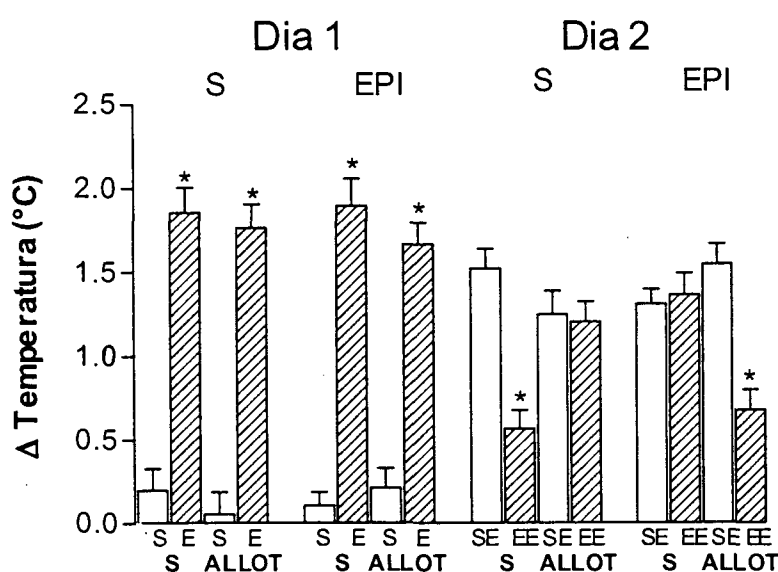


Figura 13 – Efeito da administração prévia de epipregnanolona sobre a interferência da alotetrahydrodeoxicorticosterona na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. O primeiro foi injetado com epipregnanolona (EPI) 0,30 mg/kg e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com alotetrahydrodeoxicorticosterona (ALLOT) 0,20 mg/kg e a outra com salina (S). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 4,0 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 2,0 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 8: Efeito da finasterida sobre a tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol.

Para este experimento, o objetivo foi investigar se a finasterida, um inibidor da enzima 5α -redutase, interferiria na aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol. Animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em três grupos: A, B e C. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam salina ou finasterida. As doses de finasterida foram de 12,5 (Figura 14A), 25,0 (Figura 14B) e 50 (Figura 14C) mg/kg, respectivamente. Após uma hora e meia (1,5 hr), cada um dos subgrupos foi redividido em dois, recebendo cada um 2,25 g/kg de etanol ou salina. A seguir, o prejuízo motor foi avaliado aos 30, 60 e 90 minutos e os animais retornaram posteriormente às suas gaiolas. No Dia 2, todos os animais foram tratados com a mesma dose de etanol (2,25 g/kg), e o prejuízo motor foi avaliado.

Resultados

A Figura 14 representa a influência da finasterida sobre o desenvolvimento da tolerância rápida. A administração prévia de finasterida

na dose de 50,0 mg/kg, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol no Dia 2. Houve redução do prejuízo motor nos grupos controles tratados com etanol em ambos os dias (EE), confirmando que a dose de 2,25 g/kg de etanol produz tolerância rápida. A ANOVA de três vias revelou efeito significativo para os fatores: tratamento com etanol (Fig. 14A: $F_{(1,36)} = 41,833$, $p < 0.0001$; Fig. 14B: $F_{(1,36)} = 23,966$, $p < 0.0001$; Fig. 14C: $F_{(1,36)} = 30,085$, $p < 0.0001$); pré-tratamento com finasterida (Fig. 14B: $F_{(1,36)} = 5,932$, $p < 0.0199$) e dia (Fig. 14A: $F_{(1,36)} = 37,837$, $p < 0.0001$; Fig. 14B: $F_{(1,36)} = 47,877$, $p < 0.0001$; Fig. 14C: $F_{(1,36)} = 58,613$, $p < 0.0001$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com finasterida, na dose 50,0 mg/kg, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 1, comparado aos grupos controles. Contudo, as doses 12,5 e 25,0 mg/kg não foram capazes de bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida (Figura 14A e 14B).

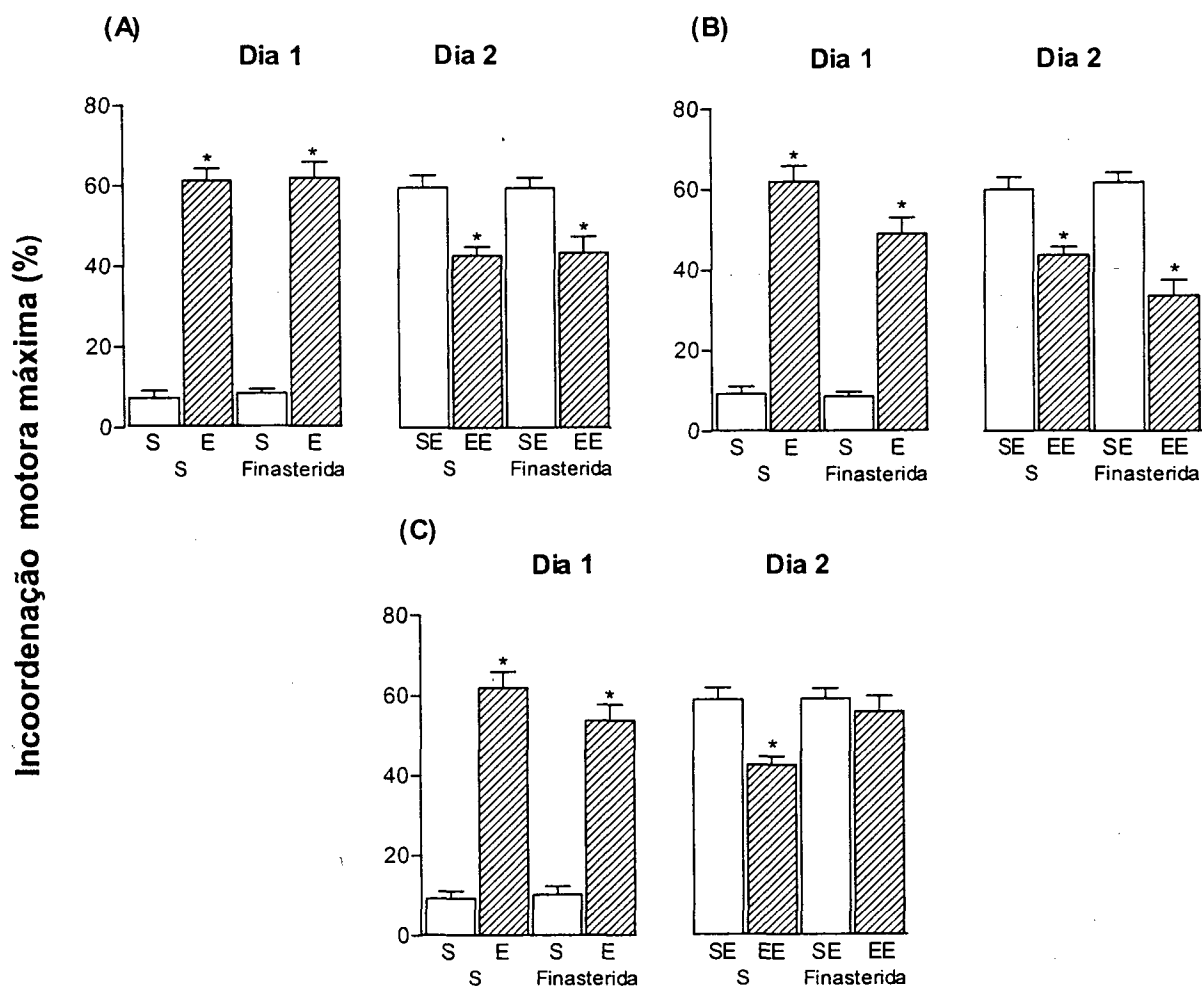


Figura 14 - Efeito da finasterida no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol. Quatro grupos receberam salina (Sal) e outros quatro grupos receberam finasterida nas doses de 12,5 (A), 25,0 (B) ou 50,0 (C) mg/kg, i.p., uma hora e meia antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 2,25 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol é observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol 2,25 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 9: Efeito da indometacina sobre a tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol.

Para este experimento, o objetivo foi investigar se a indometacina, um inibidor da enzima 3α -hidroxiesteróide redutase, interferiria na aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol. Animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em dois grupos: A e B. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam salina ou indometacina. As doses de indometacina foram de 0,1 (Figura 15A) e 0,3 (Figura 15B) mg/kg, respectivamente. Após 20 minutos, cada um dos subgrupos foi redividido em dois, recebendo, cada um 2,25 g/kg de etanol ou salina. A seguir, o prejuízo motor foi avaliado aos 30, 60 e 90 minutos e os animais retornaram posteriormente às suas gaiolas. No Dia 2, todos os animais foram tratados com a mesma dose de etanol (2,25 g/kg), e o prejuízo motor foi avaliado.

Resultados

A Figura 15 mostra a influência da indometacina sobre o desenvolvimento da tolerância rápida. A administração prévia de indometacina não foi capaz de bloquear o desenvolvimento da tolerância

rápida à incoordenação motora do etanol no Dia 2. Entretanto, houve redução do prejuízo motor nos grupos controles tratados com etanol em ambos os dias (EE), confirmando que a dose de 2,25 g/kg de etanol produz tolerância rápida. A ANOVA de três vias considerou significativa os fatores tratamento com etanol: (Fig. 15A: $F_{(1,36)} = 19,225$, $p < 0.0001$; Fig. 15B: $F_{(1,36)} = 41,055$, $p < 0.0001$) e dia (Fig. 15A: $F_{(1,36)} = 61,385$, $p < 0.0001$; Fig. 15B: $F_{(1,36)} = 45,187$, $p < 0.0001$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com indometacina não foi capaz de bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida (Figura 15A e 15B).

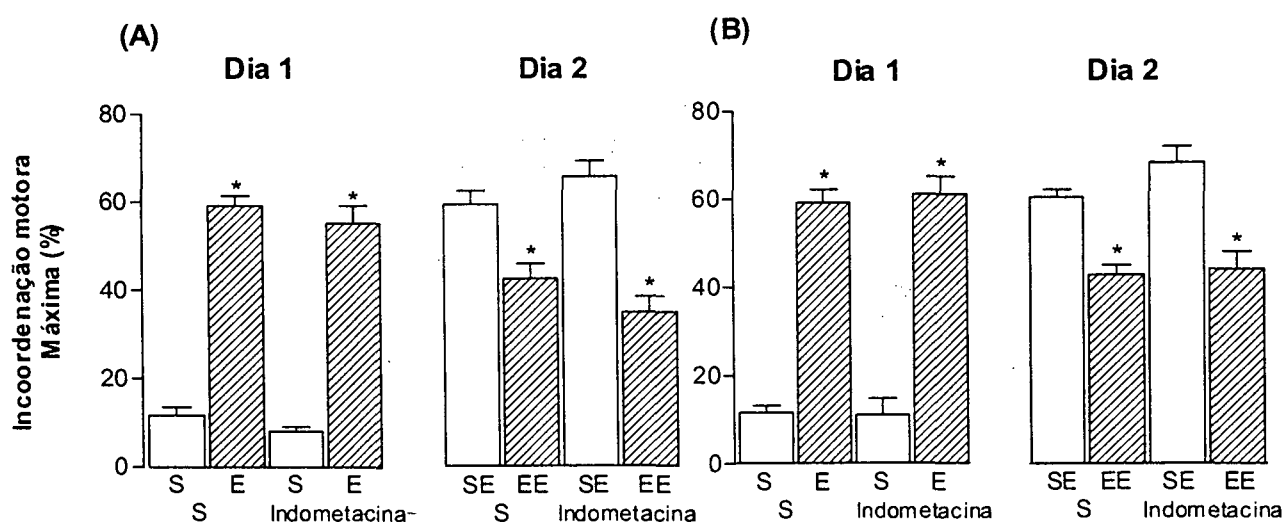


Figura 15 - Efeito da indometacina no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol. Quatro grupos receberam salina (Sal) e outros quatro grupos receberam indometacina nas doses de 0,1 (A) ou 0,3 (B) mg/kg, i.p., 20 min antes da administração de salina (S) ou etanol (E) 2,25 g/kg, i.p., no Dia 1. A tolerância rápida aos efeitos do etanol é observada no Dia 2, quando todos os grupos foram tratados com etanol 2,25 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 10: Efeito da administração prévia de (+)bicuculina sobre a tolerância rápida à incoordenação motor induzida pelo etanol.

Para este experimento, o objetivo foi investigar se a (+)bicuculina, um modulador positivo do receptor GABA-A, interferiria na aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol. Animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em dois grupos: A e B. Cada grupo foi subdividido em dois, os quais receberam salina ou (+)bicuculina. As doses de (+)bicuculina foram de 0,75 mg/kg (Figura 16A) e 1,0 mg/kg (Figura 16B), respectivamente. Após 30 minutos, cada um dos subgrupos foi redividido em dois, recebendo cada um 2,25 g/kg de etanol ou salina. A seguir, a incoordenação motora foi avaliada aos 30, 60 e 90 minutos e os animais retornaram posteriormente às suas gaiolas. No Dia 2, todos os animais foram tratados com a mesma dose de etanol e a resposta à incoordenação motora foi avaliada.

Resultados

A Figura 16 ilustra a influência da (+)bicuculina sobre o desenvolvimento da tolerância rápida. No Dia 2, a administração prévia de (+)bicuculina nas respectivas doses, não interferiu no desenvolvimento da

tolerância rápida à incoordenação motora do etanol. Como esperado, no Dia 2 do experimento, houve redução da incoordenação motora, de forma significativa, nos grupos controle administrados com etanol em ambos os dias (EE) mostrando que a dose de 2,25 g/kg de etanol produz tolerância rápida. A ANOVA de três vias revelou efeito significativo para os fatores: tratamento com etanol (Fig. 16A: $F_{(1,36)} = 99,523$, $p < 0.0001$; Fig. 16B: $F_{(1,36)} = 77,800$, $p < 0.0001$); dia (Fig. 16A: $F_{(1,36)} = 60,548$, $p < 0.0001$; Fig. 16B: $F_{(1,36)} = 68,947$, $p < 0.0001$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com (+)bicuculina (0,75 e 1,0 mg/kg) não interferiu no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, no Dia 1, comparado aos grupos controle.

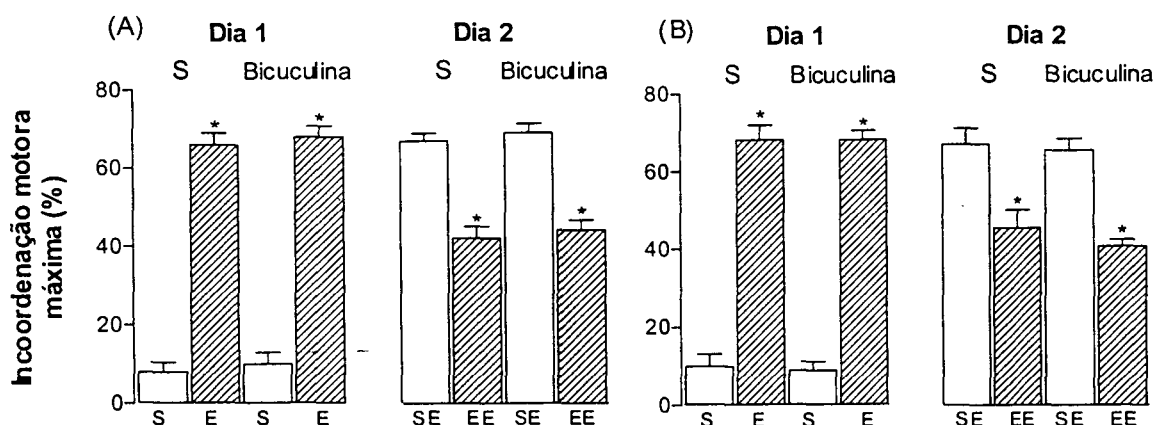


Figura 16 - Efeito da administração prévia de (+)bicuculina sobre a tolerância rápida à incoordenação motora do etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. Um foi injetado com (+)bicuculina 0,75 mg/kg (A) ou 1,0 mg/kg (B) e o outro com salina (S). Trinta minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 2,25 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 2,25 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 11: Efeito da administração prévia de (+)bicuculina sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pela epipregnanolona.

Para este experimento, o objetivo foi investigar se a (+)bicuculina influenciaria no bloqueio da tolerância rápida à incoordenação motora pela epipregnanolona. Animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em dois grupos: A e B. Cada grupo foi tratado com (+)bicuculina nas doses de 0,75 mg/kg (Figura 17A) e 1,0 mg/kg (Figura 17B) e, após 15 minutos, cada um dos grupos foi subdividido em dois, recebendo cada um epipregnanolona (0,15 mg/kg) ou salina, respectivamente. Após 30 minutos cada grupo foi novamente dividido, recebendo etanol (2,25 g/kg) ou salina. A seguir, a incoordenação motora foi avaliada aos 30, 60 e 90 minutos e os animais retornaram posteriormente às suas gaiolas. No Dia 2, todos os animais foram tratados com a mesma dose de etanol (2,25 g/kg), e a incoordenação motora foi avaliada.

Resultados

A Figura 17 ilustra a influência da (+)bicuculina sobre o bloqueio da tolerância rápida pela epipregnanolona. A ANOVA de quatro vias revelou

efeito significativo para os fatores: tratamento com etanol (Fig. 17A: $F_{(1,72)} = 317,917$; $p < 0,0001$; Fig. 17B: $F_{(1,72)} = 122,740$; $p < 0,0001$), pré-tratamento com (+)bicuculina (Fig. 17A: $F_{(1,72)} = 6,307$; $p < 0,0142$; Fig. 17B: $F_{(1,72)} = 6,189$; $p < 0,0151$), dia (Fig. 17A: $F_{(1,72)} = 241,401$; $p < 0,0001$; Fig. 17B: $F_{(1,72)} = 137,811$; $p < 0,0001$) e interação pré-tratamento x tratamento x dia (Fig. 17B: $F_{(1,72)} = 4,257$; $p < 0,0426$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que o pré-tratamento com bicuculina (1,0 mg/kg) bloqueou o efeito inibitório da tolerância rápida pela epipregnanolona. Entretanto, a dose 0,75 mg/kg de bicuculina não foi capaz de bloquear o efeito inibitório da tolerância rápida pela epipregnanolona (Figura 17A).

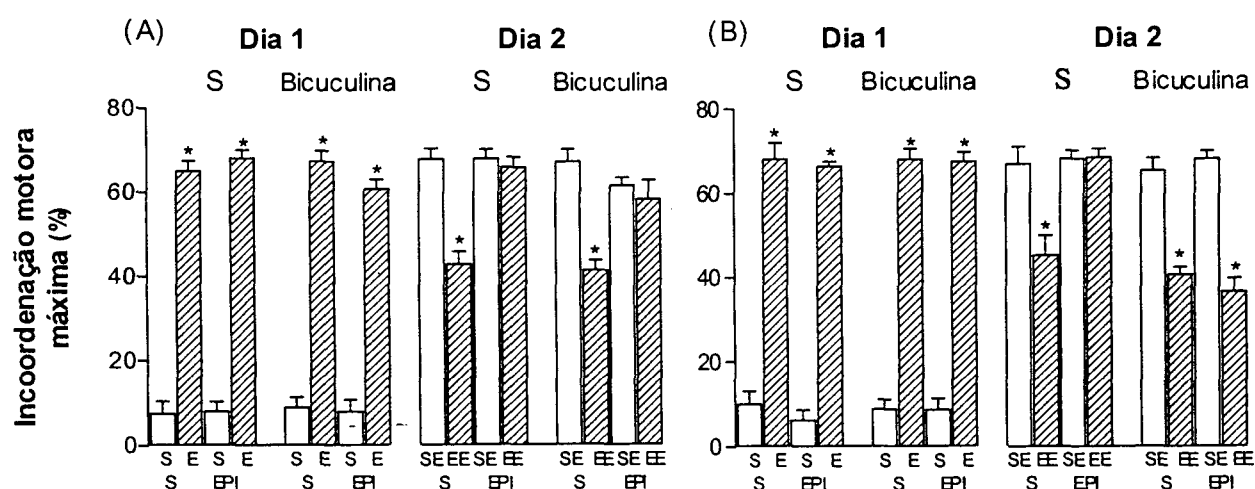


Figura 17 - Efeito da administração prévia de (+)bicuculina sobre a interferência da epipregnanolona na tolerância rápida à incoordenação motora do etanol. Os animais foram divididos em dois grupos; um foi injetado com (+)bicuculina 0,75 mg/kg (A) ou 1,0 mg/kg (B) e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com epipregnanolona (EPI) 0,15 mg/kg e a outra com salina (S). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 2,25 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 2,25 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 12: Efeito da administração prévia do sulfato de pregnenolona sobre o bloqueio da tolerância rápida ao etanol pelo (+)MK-801.

Este experimento foi realizado com o propósito de investigar a interação entre o sistema NMDA e o neuroesteróide sulfato de pregnenolona no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, utilizando-se o (+)MK-801, um antagonista não-competitivo do receptor NMDA. Animais, treinados e selecionados conforme protocolo, foram divididos em dois grupos. O primeiro recebeu como primeiro tratamento, sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) e o segundo salina. Quinze minutos após a administração, metade dos animais de cada grupo recebeu o segundo tratamento com (+)MK-801 (0,06 mg/kg) e a outra metade, salina. Quarenta e cinco minutos após a administração de sulfato de pregnenolona, cada grupo foi dividido em dois subgrupos que receberam o tratamento com etanol (2,25 g/kg) ou salina. Os animais foram submetidos ao rota-rod, trinta minutos após a última injeção, retornando posteriormente às suas gaiolas, de acordo com protocolo já descrito.

Resultados

A figura 18 ilustra a influência do sulfato de pregnenolona sobre o bloqueio da tolerância rápida pelo (+)MK-801. A administração prévia de

sulfato de pregnenolona, no Dia 1, foi capaz de impedir o bloqueio da tolerância rápida pelo (+)MK-801 no Dia 2. A ANOVA de quatro vias revelou efeito significativo dos fatores: tratamento com etanol (Fig. 18: $F_{(1,72)} = 179,716$; $p < 0,0001$), pré-tratamento com sulfato de pregnenolona (Fig. 18: $F_{(1,72)} = 30,595$; $p < 0,0001$), pré-tratamento com (+)MK-801 (Fig. 18: $F_{(1,72)} = 6,593$; $p < 0,0123$), dia (Fig. 18: $F_{(1,72)} = 156,221$; $p < 0,0001$) e interação pré-tratamento x tratamento x dia (Fig. 18: $F_{(1,36)} = 6,574$; $p < 0,0124$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) indicou que a injeção de (+)MK-801 bloqueou a tolerância rápida no Dia 2, e a administração de sulfato de pregnenolona antes do pré-tratamento com (+)MK-801, impediu esse bloqueio.

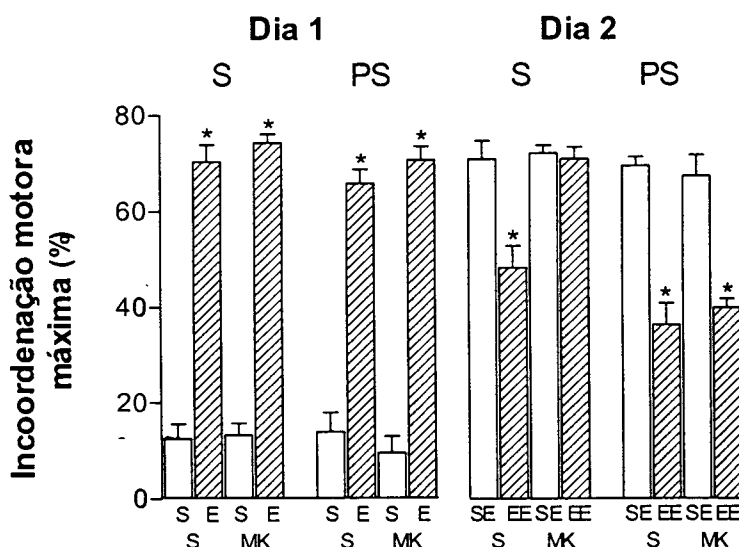


Figura 18 – Efeito da administração prévia do sulfato de pregnenolona sobre a interferência do (+)MK-801 na tolerância rápida ao etanol. Os animais foram divididos em dois grupos. Um foi injetado com sulfato de pregnenolona (PS) 0,08 mg/kg e o outro com salina, após a primeira administração, metade de cada grupo foi tratada com (+)MK-801 (MK) 0,06 mg/kg e a outra com salina (S). Quarenta e cinco minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 2,25 g/kg ou salina (S). No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 2,25 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

*Fatores cognitivos na influência de neuroesteróides na tolerância
rápida*

Experimento 13: Efeito da administração de sulfato de pregnenolona *antes* ou *após* o teste sobre a tolerância rápida ao etanol no teste do rota-rod.

Para este experimento, o objetivo foi verificar se a facilitação da tolerância rápida pelo sulfato de pregnenolona ocorreria de forma semelhante, quando administrada *após* o teste no rota-rod. Animais treinados e selecionados foram divididos em três grupos. No Dia 1, o primeiro e o terceiro grupos foram pré-tratados com salina e o segundo grupo foi pré-tratado com sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg). Após 30 minutos cada grupo foi novamente dividido, recebendo etanol (1,9 g/kg) ou salina, respectivamente. A seguir, a incoordenação motora foi avaliada aos 30, 60 e 90 minutos e os animais retornaram posteriormente às suas gaiolas. Depois do teste, aos 120 minutos, os dois primeiros grupos receberam injeção de salina e o terceiro grupo recebeu sulfato de pregnenolona. No Dia 2, todos os animais foram tratados com a mesma dose de etanol (1,9 g/kg), e a incoordenação motora foi avaliada.

Resultados

A Figura 19 representa a influência do sulfato de pregnenolona sobre o desenvolvimento da tolerância rápida quando administrada após o teste. A administração prévia de sulfato de pregnenolona na dose de 0,08 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol no Dia 2. Entretanto, não houve redução do prejuízo motor nos grupos controles tratados com etanol em ambos os dias (EE), confirmando que a dose de 1,9 g/kg de etanol não produz tolerância rápida. Para o grupo administrado com sulfato de pregnenolona *antes* do teste com etanol, a ANOVA de três vias considerou significativa os fatores: tratamento com etanol ($F_{(1.36)} = 46,478$, $p < 0,0001$) e dia ($F_{(1.36)} = 57,412$, $p < 0,0001$), além de uma interação pré-tratamento x tratamento x dia ($F_{(1.36)} = 5,988$, $p < 0,0194$;). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com sulfato de pregnenolona, na dose 0,08 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 2, comparado aos grupos controles. No entanto, para o grupo administrado com sulfato de pregnenolona *após* o teste com etanol, a ANOVA de três vias revelou efeito significativo dos fatores: tratamento com etanol ($F_{(1.36)} = 98,975$, $p < 0,0001$) e dia ($F_{(1.36)} = 126,846$, $p < 0,0001$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) revelou que o tratamento com sulfato de pregnenolona

após o teste, na dose 0,08 mg/kg, não foi capaz de facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 1, comparado aos grupos controle.

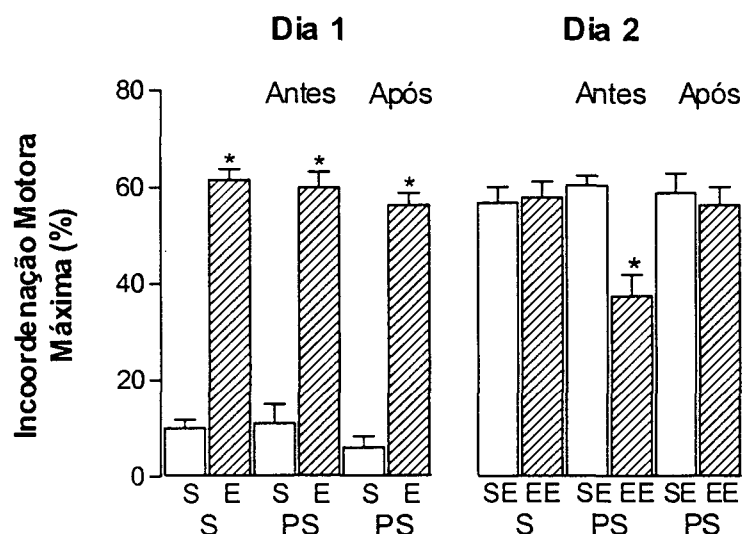


Figura 19 – Comparação dos efeitos da administração de sulfato de pregnenolona *antes* ou *após* o teste sobre o desenvolvimento da tolerância rápida à incoorenação motora produzida pelo etanol. Os animais foram divididos em três grupos: o primeiro e o terceiro grupos receberam salina e o segundo recebeu sulfato de pregnenolona 0.08 mg/kg. Trinta minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 1,9 g/kg ou salina (S). Após o teste os dois primeiros grupos receberam uma injeção de salina e o terceiro grupo recebeu sulfato de pregnenolona. No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 1,9 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 14: Efeito da administração de epipregnanolona *antes* ou *após* o teste sobre a tolerância rápida ao etanol no teste do rota-rod.

Para este experimento, o objetivo foi verificar se o bloqueio da tolerância rápida pela epipregnanolona ocorreria de forma semelhante, quando

administrada *após* o teste no rota-rod. Animais treinados e selecionados foram divididos em três grupos. No Dia 1, o primeiro e o terceiro grupos foram pré-tratados com salina e o segundo grupo foi pré-tratado com epipregnanolona (0,15 mg/kg). Após 30 minutos cada grupo foi novamente dividido, recebendo etanol (2,25 g/kg) ou salina, respectivamente. A seguir, a incoordenação motora foi avaliada aos 30, 60 e 90 minutos e os animais retornaram posteriormente às suas gaiolas. Depois do teste, aos 120 minutos, os dois primeiros grupos receberam injeção de salina e o terceiro grupo recebeu epipregnanolona. No Dia 2, todos os animais foram tratados com a mesma dose de etanol (2,25 g/kg), e a incoordenação motora foi avaliada.

Resultados

A Figura 20 representa a influência da epipregnanolona sobre o desenvolvimento da tolerância rápida quando administrada após o teste. A administração prévia de epipregnanolona na dose de 0,15 mg/kg, foi capaz de bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora do etanol no Dia 2. Entretanto, houve redução do prejuízo motor nos grupos controles tratados com etanol em ambos os dias (EE), confirmando que a dose de 2,25 g/kg de etanol produz tolerância rápida. Para o grupo administrado

com epipregnanolona *antes* do teste com etanol, a ANOVA de três vias considerou significantes os fatores: tratamento com etanol ($F_{(1,36)} = 92,356$; $p < 0,0001$), pretratamento com epipregnanolona ($F_{(1,36)} = 34,769$; $p < 0,0001$) e dia ($F_{(1,36)} = 196,011$; $p < 0,0001$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com epipregnanolona, na dose 0,15 mg/kg, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 2, comparado aos grupos controles. No entanto, para o grupo administrado com epipregnanolona *após* o teste com etanol, a ANOVA de três vias considerou significativa os fatores: tratamento com etanol ($F_{(1,36)} = 36,437$, $p < 0,0001$) e dia ($F_{(1,36)} = 76,762$, $p < 0,0001$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o pós-tratamento com epipregnanolona, na dose 0,15 mg/kg, não bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 2, comparado aos grupos controle.

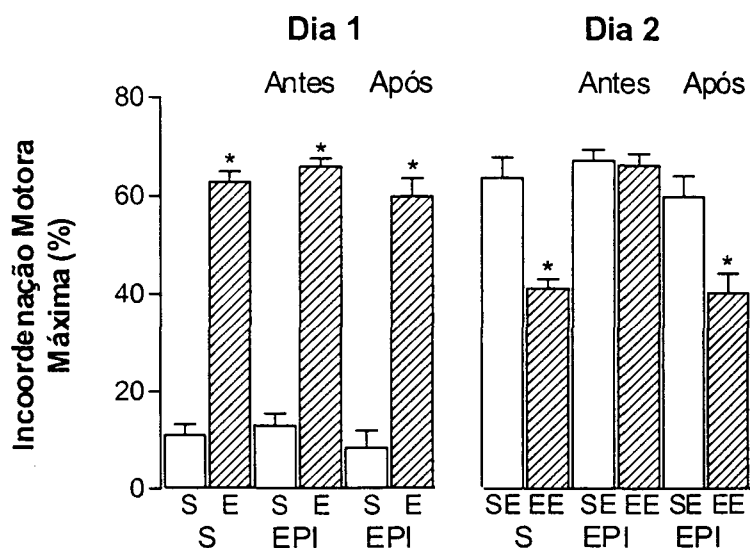


Figura 20 – Comparação dos efeitos da administração de epipregnanolona *antes* ou *após* o teste sobre o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora produzida pelo etanol. Os animais foram divididos em três grupos: o primeiro e o terceiro grupos receberam salina e o segundo recebeu epipregnanolona 0.15 mg/kg. Trinta minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 2,25 g/kg ou salina (S). Após o teste os dois primeiros grupos receberam uma injeção de salina e o terceiro grupo recebeu epipregnanolona. No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 2,25 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 15: Efeito da administração de sulfato de pregnenolona *antes* ou *após* o teste sobre a tolerância rápida ao etanol no teste da temperatura.

Para este experimento, o objetivo foi também investigar se a facilitação da tolerância rápida ao etanol pelo sulfato de pregnenolona ocorreria de forma semelhante, quando administrada *após* o teste da temperatura. Foi seguido um procedimento similar àquele usado no experimento 13, exceto que no Dia 1,

grupos de animais foram previamente tratados com sulfato de pregnenolona na dose de 0,15 mg/kg e etanol na dose de 4,0 g/kg e a resposta hipotérmica foi medida aos 30, 60 e 90 minutos. No Dia 2, todos os animais receberam etanol na dose de 2,5 g/kg.

Resultados

A Figura 21 representa a influência do sulfato de pregnenolona sobre o desenvolvimento da tolerância rápida quando administrada após o teste. A administração prévia de sulfato de pregnenolona na dose de 0,15 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol no Dia 2. Entretanto, não houve redução da resposta hipotérmica nos grupos controles tratados com etanol em ambos os dias (EE), confirmando que a dose de 2,5 g/kg de etanol não produz tolerância rápida. Para o grupo administrado com sulfato de pregnenolona *antes* do teste com etanol, a ANOVA de três vias considerou significativa os fatores: tratamento com etanol ($F_{(1,36)} = 23,838$, $p < 0,0002$) e dia ($F_{(1,36)} = 11,335$, $p < 0,0018$), além de uma interação pré-tratamento x tratamento x dia ($F_{(1,36)} = 11,434$, $p < 0,0017$;). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com

sulfato de pregnenolona, na dose 0,15 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 2, comparado aos grupos controles. No entanto, para o grupo administrado com sulfato de pregnenolona *após* o teste com etanol, a ANOVA de três vias revelou efeito significativo dos fatores: tratamento com etanol ($F_{(1.36)} = 40,415$, $p < 0,0005$) e dia ($F_{(1.36)} = 16,279$ $p < 0,0003$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) revelou que o tratamento com sulfato de pregnenolona após o teste, na dose 0,15 mg/kg, não foi capaz de facilitar o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 1, comparado aos grupos controle.

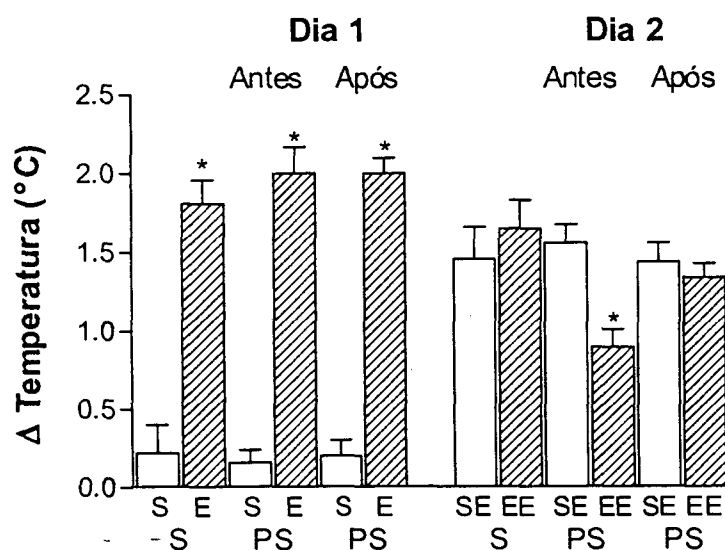


Figura 21 – Comparação dos efeitos da administração de sulfato de pregnenolona *antes* ou *após* o teste sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Os animais foram divididos em três grupos: os dois primeiros receberam salina e o terceiro recebeu sulfato de pregnenolona 0,15 mg/kg. Trinta minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 4,0 g/kg ou salina (S). Após o teste os dois primeiros grupos receberam uma injeção de salina e o terceiro grupo recebeu sulfato de pregnenolona. No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 2,5 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 16: Efeito da administração de epipregnanolona *antes* ou *após* o teste sobre a tolerância rápida ao etanol no teste da temperatura.

Este experimento foi realizado com intuito de verificar se o bloqueio da tolerância rápida pela epipregnanolona ocorreria de forma semelhante, quando administrada *após* o teste da temperatura. Foi seguido um procedimento similar ao descrito no experimento anterior, exceto que no Dia 1, grupos de animais foram previamente tratados com epipregnenolona na dose de 0,30 mg/kg e etanol na dose de 4,0 g/kg e a resposta hipotérmica foi medida aos 30, 60 e 90 minutos. No Dia 2, todos os animais receberam etanol na dose de 2,0 g/kg.

Resultados

A Figura 22 representa a influência da epipregnanolona sobre o desenvolvimento da tolerância rápida quando administrada após o teste. A administração prévia de epipregnanolona na dose de 0,30 mg/kg, foi capaz de bloquear o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol no Dia 2. Entretanto, houve redução da resposta hipotérmica nos grupos controles tratados com etanol em ambos os dias (EE), confirmando que a dose

de 2,0 g/kg de etanol produz tolerância rápida. Para o grupo administrado com epipregnanolona *antes* do teste com etanol, a ANOVA de três vias considerou significantes os fatores: tratamento com etanol ($F_{(1,36)} = 29,083$ $p < 0,0005$), pretratamento com epipregnanolona ($F_{(1,36)} = 6,2847$; $p < 0,0168$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o tratamento prévio com epipregnanolona, na dose 0,30 mg/kg, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 2, comparado aos grupos controles. No entanto, para o grupo administrado com epipregnanolona *após* o teste com etanol, a ANOVA de três vias considerou significativa os fatores: tratamento com etanol ($F_{(1,36)} = 15,0384$, $p < 0,0004$) e dia ($F_{(1,36)} = 16,978$, $p < 0,0021$). A análise *post-hoc* (teste de Tukey) confirmou que o pós-tratamento com epipregnanolona, na dose 0,30 mg/kg, não bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida, no Dia 2, comparado aos grupos controle.

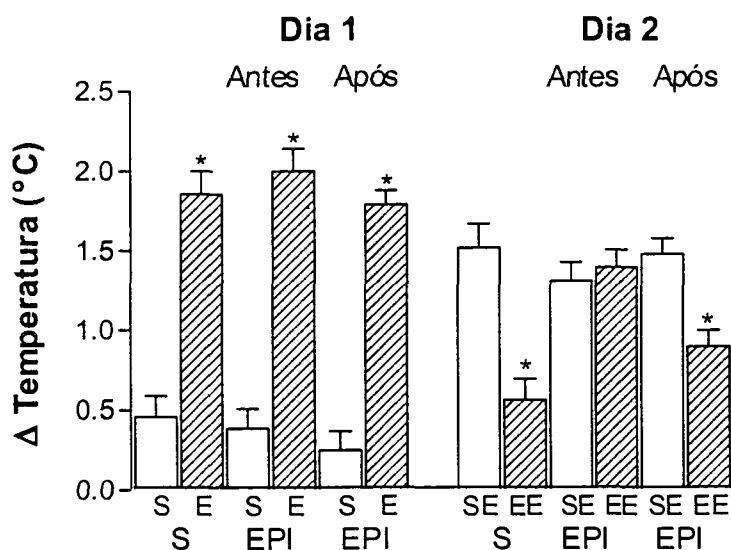


Figura 22 – Comparação dos efeitos da administração de epipregnanolona *antes* ou *após* o teste sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Os animais foram divididos em três grupos: os dois primeiros receberam salina e o terceiro recebeu epipregnanolona 0,30 mg/kg. Trinta minutos após a primeira injeção os grupos foram redivididos e tratados com etanol (E) 4,0 g/kg ou salina (S). Após o teste os dois primeiros grupos receberam uma injeção de salina e o terceiro grupo recebeu epipregnanolona. No Dia 2, todos os grupos foram tratados com etanol 2,0 g/kg. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 17: Efeito da administração de sulfato de pregnenolona nos dias 1 e/ou 2 sobre a tolerância rápida ao etanol no teste do rota-rod

Considerando -a hipótese de que a tolerância tem um componente relacionado com a aprendizagem, existiria a possibilidade de que a facilitação da tolerância pelo sulfato de pregnenolona pudesse envolver aprendizagem dependente do estado. Portanto, camundongos treinados foram selecionados, sendo que a metade deles recebeu salina e a outra sulfato de pregnenolona

(0,08 mg/kg). Trinta minutos após a administração os animais foram divididos em dois grupos, sendo em um administrado salina e no outro etanol, na dose de 1,9 g/kg. Os animais foram testados no aparelho rota-rod, como descrito anteriormente. No dia 2 do teste, cada um dos grupos tratados com salina ou etanol no Dia 1, foi novamente dividido em dois; um deles recebeu salina e o outro, sulfato de pregnenolona. Após trinta minutos, todos os grupos foram tratados com 1,9 g/kg de etanol e retestados no rota-rod. Desta forma, foram submetidos ao teste um grupo experimental pré-tratado com sulfato de pregnenolona, nos Dias 1 e 2, e outro somente no dia 2.

Resultados

A Figura 23, ilustra o efeito do pré-tratamento com sulfato de pregnenolona no Dia 1 e/ou Dia 2. No Dia 1, todos os grupos pré-tratados com salina não apresentaram perda da capacidade motora, enquanto os tratados com etanol apresentaram prejuízo motor significativo. O pré-tratamento com sulfato de pregnenolona não alterou o efeito do etanol na coordenação motora dos animais. No Dia 2, os animais tratados com salina no Dia 1, ao receberem etanol, apresentaram prejuízo motor significativo, e os tratados com etanol em ambos os dias não desenvolveram tolerância rápida, exceção feita aos grupos tratados com sulfato de pregnenolona, antes do etanol no Dia 1. ANOVA de

três vias revelou efeito significativo dos fatores: tratamento com etanol: (Fig. 23: $F_{(1,72)} = 193,493$, $p < 0,0001$) e dia (Fig. 23: $F_{(1,72)} = 158,802$, $p < 0,0001$). A análise *post hoc* confirmou que a facilitação da tolerância pelo sulfato de pregnenolona não é dependente de estado, já que não foi alterada quando os animais receberam sulfato de pregnenolona em ambos os dias do experimento. Além disso, essa facilitação somente ocorre quando o sulfato de pregnenolona é administrado no Dia 1, não havendo interferência na tolerância quando esta droga é administrada apenas no Dia 2.

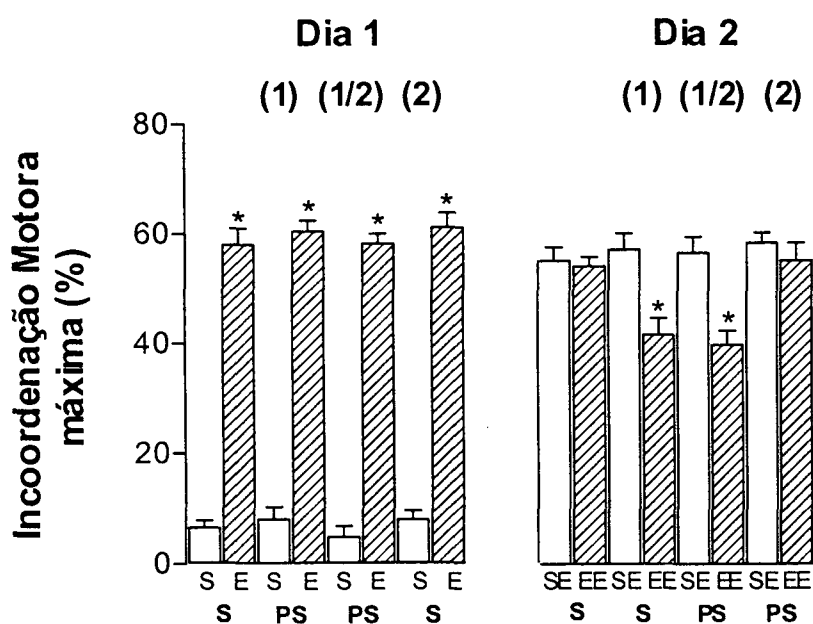


Figura 23 – Influência da administração de sulfato de pregnenolona no Dia 1 e/ou Dia 2 sobre a incoordenação motora ao etanol em camundongos submetidos ao teste do rota-rod. No Dia 1, quatro grupos de animais receberam salina (S) e os outros quatro sulfato de pregnenolona (PS; 0,08 mg/kg), após trinta minutos, dois grupos administrados com salina ou PS receberam etanol (E; 1,9 g/kg) e os demais salina. No dia 2, os grupos tratados com salina e etanol no Dia 1 receberam um pré-tratamento com salina ou PS e trinta minutos após essa administração todos os animais receberam etanol e foram testados no rota-rod. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

Experimento 18: Efeito da administração de sulfato de pregnenolona nos dias 1 e/ou 2 sobre a tolerância rápida ao etanol no teste da temperatura

Para este experimento, o objetivo foi também verificar se a facilitação da tolerância rápida ao etanol pelo sulfato de pregnenolona pudesse envolver aprendizagem dependente do estado neste modelo. Foi seguido um procedimento similar àquele usado no experimento 17, exceto que no Dia 1, grupos de animais foram previamente tratados com sulfato de pregnenolona na dose de 0,15 mg/kg e etanol na dose de 4,0 g/kg e a resposta hipotérmica foi medida aos 30, 60 e 90 minutos. No Dia 2, todos os animais receberam etanol na dose de 2,5 g/kg.

Resultados

A Figura 24, ilustra o efeito do pré-tratamento com sulfato de pregnenolona no Dia 1 e Dia 2. No Dia 1, todos os grupos pré-tratados com salina não apresentaram hipotermia, enquanto os tratados com etanol apresentaram hipotermia significativa. O pré-tratamento com sulfato de pregnenolona não alterou o efeito do etanol na temperatura corporal dos animais. No Dia 2, os animais tratados com salina no Dia 1, ao receberem etanol, apresentaram hipotermia significativa, e os tratados com etanol em

ambos os dias não desenvolveram tolerância rápida, exceção feita aos grupos tratados com sulfato de pregnenolona, antes do etanol no Dia 1. A ANOVA de três vias revelou efeito significativo dos fatores: tratamento com etanol: (Fig. 24: $F_{(1,72)} = 193,493$, $p < 0,0001$) e dia (Fig. 24: $F_{(1,72)} = 158,802$, $p < 0,0001$). A análise *post hoc* confirmou que a facilitação da tolerância rápida ao etanol pelo sulfato de pregnenolona não é dependente de estado, já que não foi alterada quando os animais receberam sulfato de pregnenolona em ambos os dias do experimento. Além disso, essa facilitação somente ocorre quando o sulfato de pregnenolona é administrado, no Dia 1, não havendo interferência na tolerância quando esta droga é administrada apenas no Dia 2.

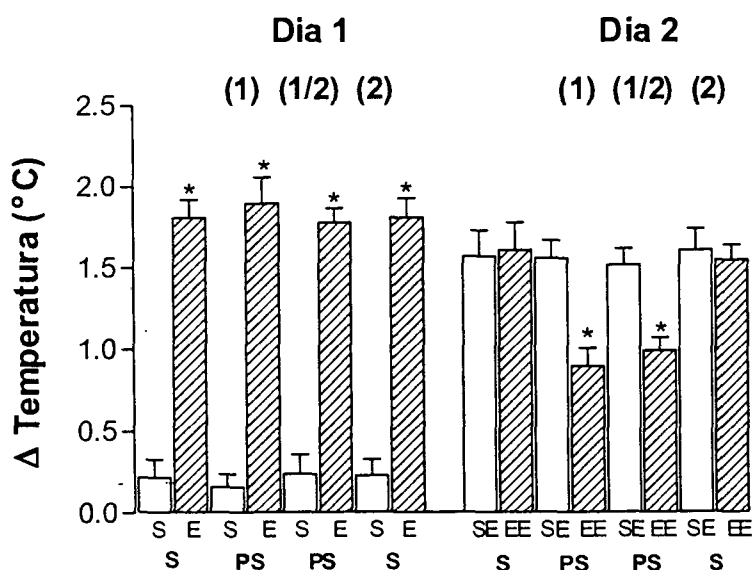


Figura 24 – Influência da administração de sulfato de pregnenolona no Dia 1 e/ou Dia 2 sobre a hipotermia produzida pelo etanol em camundongos. Quatro grupos de animais receberam salina (S) e os outros quatro sulfato de pregnenolona (PS; 0,15 mg/kg), após trinta minutos, dois grupos administrados com salina ou PS receberam etanol (E; 4,0 g/kg) e os demais salina. No dia 2, os grupos tratados com salina e etanol no Dia 1 receberam um pré-tratamento com salina ou PS e trinta minutos após essa administração todos os animais receberam etanol (2,5 g/kg) e foram testados no rota-rod. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle (Teste de Tukey).

*Fatores farmacocinéticos na influência de neuroesteróides na
tolerância rápida*

Experimento 19: Dosagem do álcool

A fim de verificar a possível interação farmacocinética entre o etanol e os neuroesteróides sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg) e epipregnanolona (0,15 mg/kg), oito grupos de animais foram submetidos aos seguintes tratamentos: salina + etanol (SE; 1,9 g/kg); etanol + etanol (EE; 1,9 g/kg); sulfato de pregnenolona + salina (PSS; 1,9 g/kg); sulfato de pregnenolona + etanol (PSE; 1,9 g/kg); salina + etanol (SE; 2,25 g/kg); etanol + etanol (EE; 2,25 g/kg); epipregnanolona + salina (EPIS; 2,25 g/kg); epipregnanolona + etanol (EPIE; 2,25 g/kg). No Dia 2, o sangue foi coletado após 120 minutos e a dosagem alcoólica realizada como descrito no procedimento geral.

Resultados

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

Tabela 1. Efeito do sulfato de pregnenolona e epipregnanolona na concentração de etanol no sangue (mg/dl) no Dia 2 submetidos ao teste do rota-rod. Os resultados estão expressos pelas médias \pm E.P.M. de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, comparado aos grupos tratados com etanol (1,9 g/kg) (ANOVA de uma via).

TRATAMENTO	ALCOOLEMIA (mg/dl)
Controle (1,9 g/kg)	
SS	148,3 \pm 3,5
EE	154,8 \pm 4,7
Sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg)	
PSS	147,1 \pm 4,0
PSE	151,6 \pm 2,5
Controle (2,25 g/kg)	
SS	172,7 \pm 2,4 *
EE	177,5 \pm 3,9
Epipregnanolona (0,15 mg/kg)	
EPIS	166,4 \pm 5,8
EPIE	170,2 \pm 4,3

Imunoquantificação da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA-A após a adaptação comportamental durante a exposição prolongada de álcool

Experimento 20: Efeito da administração da epipregnanolona sobre a indução de tolerância crônica ao etanol.

A fim de verificar se o neuroesteróide epipregnanolona, bloquearia a aquisição da tolerância crônica ao etanol avaliada no modelo do rota-rod, animais previamente treinados e selecionados, foram divididos em dois grupos, os quais receberam salina e epipregnanolona (0,15 mg/kg). Após 30 minutos, cada um dos grupos foi subdividido em dois, que receberam etanol (2,5 g/kg) ou salina, respectivamente. A seguir, foram submetidos à avaliação no rota-rod e, findo o teste, os animais retornaram às gaiolas; tal procedimento ocorreu durante doze dias. No décimo terceiro dia, todos os animais foram tratados com etanol (2,5 g/kg), sendo novamente testados no aparelho do rota-rod.

Resultados

A administração de epipregnanolona bloqueou o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol, avaliada no teste do rota-rod (Figura 25). No Dia 1, a ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol $F_{(1,28)} = 368,111$; $p < 0,0001$. No Dia 13 do experimento, houve redução do prejuízo motor, de forma significativa, no grupo controle administrado com

etanol + etanol (EE). A ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol $F_{(1,28)} = 32,129$; $p < 0,0001$. O grupo pré-tratado com epipregnanolona 0,15 mg/kg antes do etanol, no Dia 1, não apresentou tolerância, no Dia 13. A ANOVA de duas vias revelou o efeito do pré-tratamento com epipregnanolona $F_{(1,28)} = 34,969$; $p < 0,0016$ e a interação pré-tratamento x tratamento $F_{(1,28)} = 19,363$; $p < 0,0093$. A análise *post-hoc* indicou que a epipregnanolona na dose 0,15 mg/kg, impediu o desenvolvimento da tolerância crônica (teste de Tukey). A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito do tempo de tratamento $F_{(1,84)} = 27,097$; $p < 0,0001$.

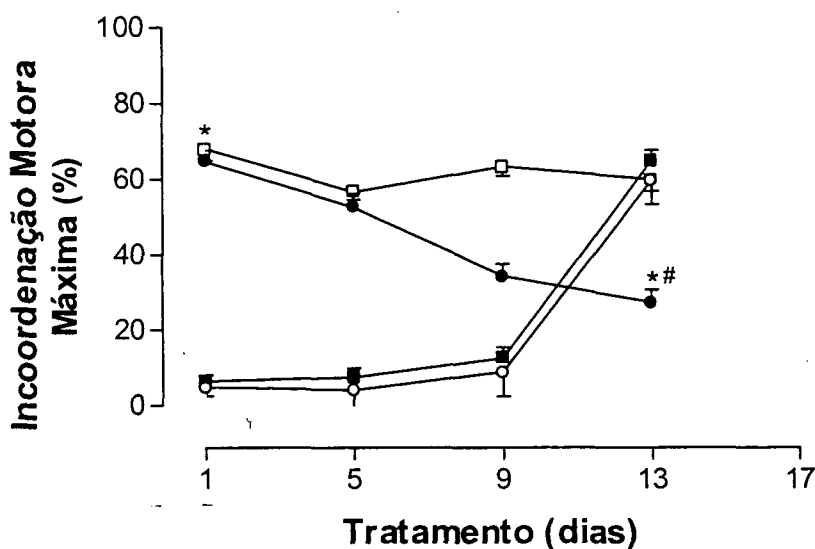


Figura 25 – Efeito da epipregnanolona no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol. Dois grupos receberam salina e outros dois grupos receberam epipregnanolona na dose de 0,15 mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina ou etanol 2,5 g/kg, i.p., no Dia 1-12. A tolerância crônica aos efeitos do etanol foi observada no Dia 13, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose (2,5 g/kg, i.p.). O símbolo (O) representa o desempenho do grupo SS (S + S), (●) do grupo SE (S + E), (■) do grupo EPIS (EPI + S) e (□) do grupo EPIE (EPI + E). Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle; # $p < 0,05$ comparado com os Dias 1 e 5 (SE) (Teste de Tukey).

Experimento 21: Efeito da administração do sulfato de pregnenolona sobre a indução de tolerância crônica ao etanol.

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

Resultados

A administração de sulfato de pregnenolona facilitou o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol, avaliada no teste do rota-rod (Figura 26). No Dia 1, a ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol $F_{(1,28)} = 385,85$; $p < 0,0001$. No Dia 13 do experimento, houve redução do prejuízo motor de forma significativa no grupo

administrado com etanol + etanol (EE), em relação ao grupo controle. A ANOVA de duas vias demonstrou o efeito do tratamento com etanol $F_{(1,28)} = 186,326$; $p < 0,0001$. O grupo pré-tratado com sulfato de pregnenolona 0,08 mg/kg antes do etanol, no Dia 1, apresentou desenvolvimento da tolerância, no Dia 13. A ANOVA de duas vias revelou o efeito do pré-tratamento com sulfato de pregnenolona $F_{(1,28)} = 6,921$; $p < 0,0137$ e a interação pré-tratamento x tratamento foi significativa $F_{(1,28)} = 16,661$; $p < 0,0001$. A análise *post-hoc* indicou que o sulfato de pregnenolona na dose 0,08 mg/kg, facilitou o desenvolvimento da tolerância crônica (teste de Tukey). A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito do tempo de tratamento $F_{(1,84)} = 15,626$; $p < 0,0001$.

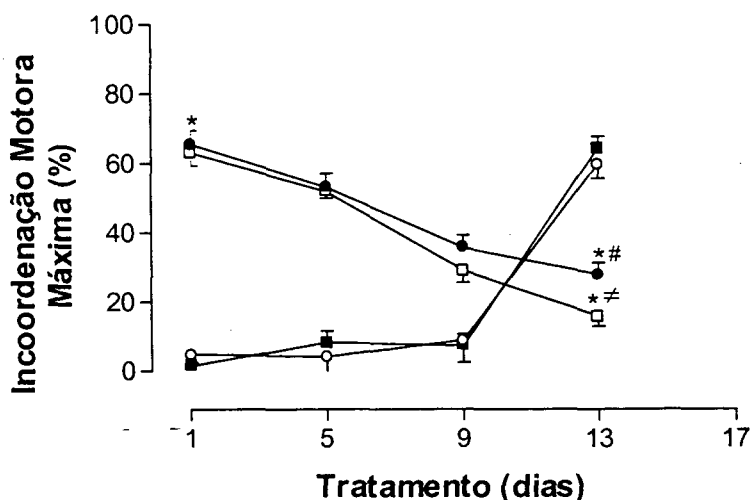
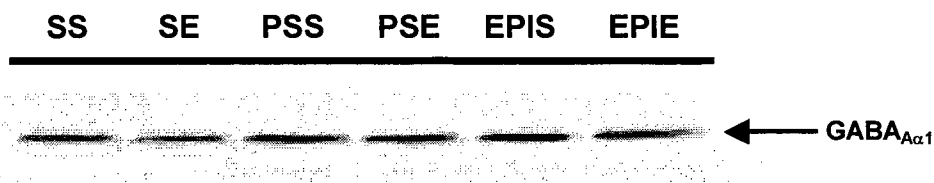


Figura 26 – Efeito do sulfato de pregnenolona no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol. Dois grupos receberam salina e outros dois grupos receberam sulfato de pregnenolona na dose de 0,08 mg/kg, i.p., 30 min antes da administração de salina ou etanol 2,5 g/kg, i.p., no Dia 1-12. A tolerância crônica aos efeitos do etanol foi observada no Dia 13, quando todos os grupos foram tratados com etanol na dose (2,5 g/kg, i.p.). O símbolo (O) representa o desempenho do grupo SS (S + S), (●) do grupo SE (S + E), (■) do grupo PSS (PS + S) e (□) do grupo PSE (PS + E). Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo controle; # $p < 0,05$ comparado com os Dias 1 e 5 (SE); \neq $p < 0,05$ comparado ao grupo SE (Teste de Tukey).

Experimento 22: Imunoquantificação da subunidade α_1 do receptor GABA-A durante o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol em animais tratados com neuroesteróides.

A análise de *Immunoblotting* foi realizada para a quantificação da subunidade α_1 dos receptores GABA-A hipocâmpais e corticais durante o último dia do teste de exposição ao etanol. Os animais foram sacrificados no décimo terceiro dia, 30 minutos após a administração do etanol. A imunodeteção da subunidade α_1 dos receptores GABA-A hipocâmpais e corticais foi avaliada através do anticorpo anti-GABA-A- α_1 . Nenhuma diferença significativa dessa subunidade foi observada em homogenados hipocâmpais (Figura 27) e corticais (Figura 28) a partir de camundongos expostos ao etanol ou controle.

(A)



(B)

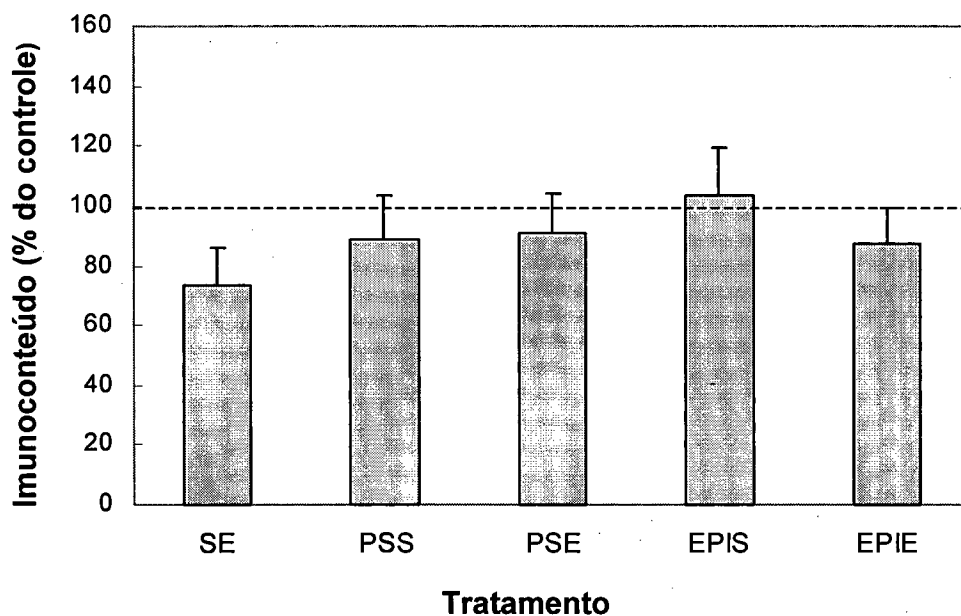
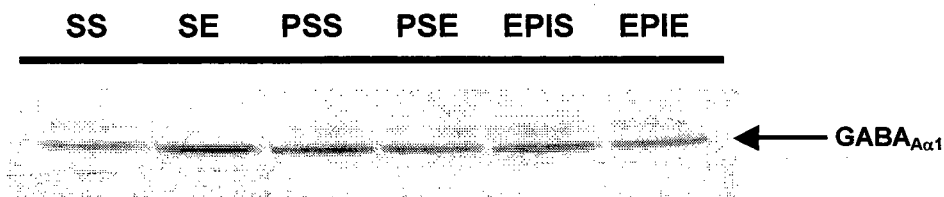


Figura 27 – Imunoquantificação da subunidade α_1 do receptor GABA-A em hipocampo de camundongos. Os animais foram tratados durante 12 dias com SS (S+S); SE (S+E); PSS (PS+S); PSE (PS+E); EPIS (EPI+S) e EPIE (EPI+E). Os hipocampos foram retirados e homogeneizados no 13º dia, 30 minutos após a administração de etanol. As proteínas (100 μg /poço) foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose para a realização da imunodeteção da subunidade α_1 do receptor GABA-A. **A)** *Imunoblotting* representativo mostrando a subunidade α_1 do receptor GABA-A. **B)** Quantificação da subunidade α_1 do receptor GABA-A através da densitometria das bandas. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. das densidades óticas das bandas e foram normalizados como percentual relativo ao controle (SS; considerado 100%). $n=6$ por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA, seguida do teste de Duncan.

(A)



(B)

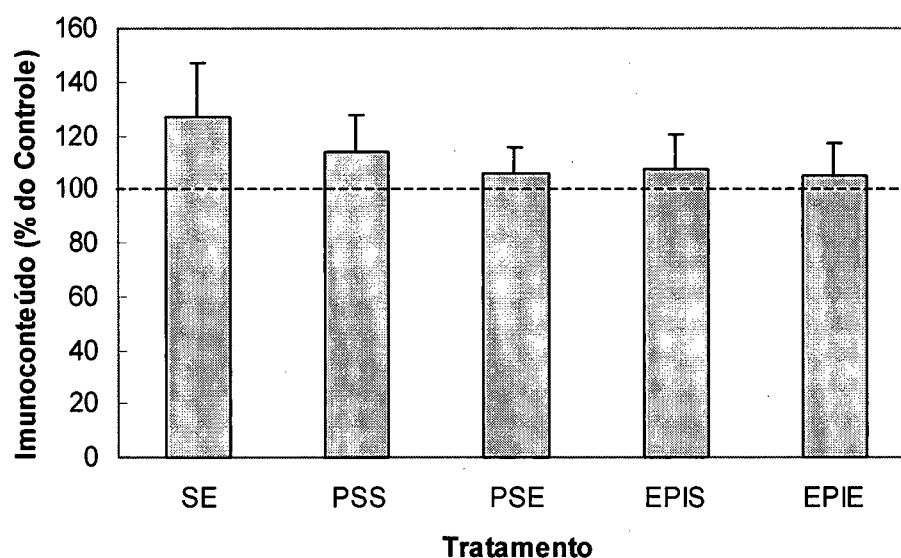


Figura 28 – Imunoquantificação da subunidade α_1 do receptor GABA-A em córtex de camundongos. Os animais foram tratados durante 12 dias com SS (S+S); SE (S+E); PSS (PS+S); PSE (PS+E); EPIS (EPI+S) e EPIE (EPI+E). Os córtex foram retirados e homogeneizados no 13^o dia, 30 minutos após a administração de etanol. As proteínas (100 μ g/poço) foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose para a realização da imunodeteção da subunidade α_1 do receptor GABA-A. **A)** *Imunoblotting* representativo mostrando a subunidade α_1 do receptor GABA-A. **B)** Quantificação da subunidade α_1 do receptor GABA-A através da densitometria das bandas. Os resultados são expressos pelas médias \pm E.P.M. das densidades óticas das bandas e foram normalizados como percentual relativo ao controle (SS; considerado 100%). $n=6$ por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA, seguida do teste de Duncan.

VII - DISCUSSÃO

Durante muitos anos, as investigações a respeito do etanol têm se direcionado para o fenômeno da tolerância. Como já mencionado na Introdução, a tolerância é um fenômeno complexo que se desenvolve como resultado da adaptação do organismo à presença de uma droga em certas circunstâncias, e pode desenvolver-se em diferentes graus para diferentes efeitos dessa droga (Grant *et al.*, 1990; Kalant e Khanna, 1990; Hoffman e Tabakoff, 1996). Pesquisadores estão interessados em estudar a tolerância por muitas razões, como por exemplo, seu papel na plasticidade neuronal e na neuroadaptação (Kalant e Khanna, 1990; Kalant, 1985; 1996), além de seu papel na dependência de drogas.

Estudos mostram que a tolerância ao etanol pode ser influenciada por vários fatores como, por exemplo, a variação nos protocolos experimentais (Kalant e Khanna, 1990). A tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol tem sido estudada desde 1979 (Crabbe *et al.*, 1979). Estes pesquisadores mostraram que, camundongos recebendo etanol em dois dias consecutivos, desenvolvem tolerância rápida à hipotermia no segundo dia. Os resultados obtidos por Crabbe *et al.* (1979) foram semelhantes aos obtidos por Ritzmann e Tabakoff (1976), no qual observou-se tolerância ao efeito

hipotérmico para esta droga mesmo após cinco dias. Além disso, estudos realizados por Khanna *et al.* (1991a) e Bitrán e Kalant (1991), também demonstraram que ratos recebendo etanol vinte e quatro horas após a primeira administração desta droga, desenvolveram tolerância rápida à incoordenação motora quando submetidos aos testes do plano inclinado (tilt-plane) e da esteira móvel (moving-belt).

O presente estudo demonstrou o desenvolvimento da tolerância rápida, tanto ao efeito do etanol na coordenação motora, quanto ao efeito hipotérmico em camundongos. Além disso, nossos dados confirmam trabalhos prévios obtidos sobre a tolerância rápida aos efeitos de hipotermia e incoordenação motora do etanol em ratos e camundongos, e sugerem que o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol requer experiência com a específica resposta examinada, como já observado por outros autores (Alkana *et al.*, 1983; Crabbe *et al.*, 1979; Khanna *et al.*, 1996). Assim, o fato de que a tolerância rápida para a hipotermia em camundongos ter sido obtida somente com as doses de 2,0 g/kg e 2,25 g/kg de etanol, no segundo dia, corrobora os resultados obtidos em outros experimentos, nos quais a tolerância rápida aos efeitos de hipotermia e incoordenação motora do etanol foram obtidos numa certa faixa de doses desta droga (Khanna *et al.*, 1996; Barbosa e Morato, 2000; Zaleski *et al.*, 2001).

Existem evidências de que o estresse *per se* pode causar hipertermia em animais, mas em combinação com o etanol pode potencializar o efeito hipotérmico desta droga (Cunnigham e Bischof, 1987). No presente estudo, entretanto, os animais foram manipulados durante três dias antes do experimento a fim de habituá-los ao procedimento. Portanto, é improvável que o estresse tenha afetado nossos resultados.

Após padronizado o modelo de tolerância rápida à hipotermia causada pelo etanol, a influência dos neuroesteróides foi avaliada neste teste. Um importante resultado deste estudo, foi que a administração de sulfato de pregnenolona, um modulador positivo do receptor NMDA e um modulador negativo do receptor GABA-A (Mienville e Vicini, 1989; Wu *et al.*, 1991), e do sulfato de dehidroepiandrosterona, um modulador negativo do receptor GABA-A (Demirgorem *et al.*, 1991; Majewska *et al.*, 1990b) estimularam significativamente o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol. Ao contrário, o pré-tratamento com epipregnanolona e alotetrahydrodeoxicorticosterona, moduladores positivos do receptor GABA-A (Melchior e Ritzmann, 1996; Baulieu *et al.*, 1990; Baulieu e Robel, 1990; Majewska *et al.*, 1986; Majewska, 1992; Prince e Simonds, 1993), significativamente bloquearam o desenvolvimento da tolerância. Estes dados são consistentes com nossos estudos prévios sobre as tolerâncias

rápida e crônica ao prejuízo motor induzido pelo etanol no teste do rota-rod, no qual o sulfato de pregnenolona e o sulfato de dehidroepiandrosterona estimularam a tolerância, enquanto que, a epipregnanolona, bloqueou a tolerância ao etanol (Barbosa, 1999; Barbosa e Morato, 2000). Tal resultado sugere que o efeito desses neuroesteróides pode ser generalizado para a tolerância rápida a estes dois efeitos do álcool.

As doses utilizadas de neuroesteróides *per se* não alteraram a temperatura corporal dos animais, os quais apresentaram resultados similares aos dos grupos controle, e também não se observou qualquer efeito residual na temperatura corporal dos animais no segundo dia. Assim, os efeitos destes neuroesteróides parecem ser farmacodinâmicos e não farmacocinéticos, uma vez que trabalhos prévios deste e de outros laboratórios têm mostrado que a administração aguda de neuroesteróides não interfere com a farmacocinética do etanol em camundongos e ratos (Melchior e Allen, 1992; Barbosa, 1999). Além disso, estudos mostram que a concentração de etanol no sangue tem correlação com aquela do cérebro (Sunhara *et al.*, 1978; Khanna *et al.*, 1993a). Portanto, nossos resultados sugerem que a administração destes neuroesteróides influenciou os processos funcionais relacionados com o desenvolvimento da tolerância rápida ao efeito hipotérmico do etanol.

Parece estar bem estabelecido que a tolerância rápida tem um componente predominantemente funcional antes de metabólico (Crabbe *et al.*, 1979; Khanna *et al.*, 1996) e pode sofrer influência do aprendizado (Bitrán e Kalant, 1991). Nossos resultados demonstraram que os efeitos desses neuroesteróides na tolerância rápida não se devem a uma interferência na farmacocinética do etanol no Dia 2 após o teste, pois a concentração sangüínea de etanol foi similar entre os grupos controle, sugerindo que esta forma de tolerância seja funcional. Embora, não se possa excluir totalmente o componente disposicional na tolerância observada, pois os níveis das drogas foram medidos no final do teste e não ao longo do experimento (Khanna *et al.*, 1991a), nossos dados estão de acordo com a literatura sugerindo que a tolerância rápida é predominantemente funcional (Crabbe *et al.*, 1979; Khanna *et al.*, 1991a; 1991b; 1996).

Após observar a influência dos efeitos dos neuroesteróides sobre a tolerância ao efeito hipotérmico do etanol, a interação entre diferentes neuroesteróides no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora e hipotermia ao etanol foi avaliada. Nesse experimento, a administração de epipregnanolona (0,15 e 0,30 mg/kg) não bloqueou a ação estimulante do sulfato de pregnenolona (0,08 mg/kg), mas bloqueou a ação estimulante do sulfato de dehidroepiandrosterona (0,15 mg/kg) sobre a

tolerância rápida à incoodenação motora causada pelo etanol. Além disso, o pré-tratamento com epipregnanolona bloqueou a ação inibitória da alotetrahydrodeoxicorticosterona (0,10 mg/kg) no desenvolvimento da tolerância ao etanol.

Os resultados obtidos com o efeito hipotérmico do etanol foram similares àqueles obtidos com o teste do prejuízo motor. Entretanto, o pré-tratamento com epipregnanolona na dose de 0,30 mg/kg bloqueou a ação estimulatória do sulfato de pregnenolona (0,15 mg/kg) e do sulfato de dehidroepiandrosterona (0,20 mg/kg) sobre a tolerância rápida à hipotermia produzida pelo etanol, enquanto que bloqueou a ação inibitória da alotetrahydrodeoxicorticosterona (0,20 mg/kg) sobre o desenvolvimento da tolerância ao etanol. Todos os resultados foram obtidos com doses de neuroesteróides que *per se* não interferem com a coordenação motora ou com a temperatura corporal dos animais no Dia 1 e não produzem algum efeito residual no Dia 2. As diferenças entre as ações da epipregnanolona nos testes de hipotermia e incoordenação motora talvez decorram das diferenças nas doses de etanol necessárias para produzir tolerância rápida em um e outro teste.

Nossos resultados são consistentes com dados da literatura que têm sugerido que a epipregnanolona, em estudos *in vitro* e *in vivo*, comporta-se

como um antagonista específico do sítio de neuroesteróides no receptor GABA-A (Prince e Simmonds, 1992; 1993; Melchior e Ritzmann, 1996). Nestes estudos foi demonstrado que a epipregnanolona antagonizou de modo competitivo a potenciação da ligação do [³H]flunitrazepam induzida por pregnanolona e alopregnanolona (Prince e Simmonds, 1992; 1993). Melchior e Ritzmann (1996) mostraram que a epipregnanolona (um agonista parcial do receptor GABA-A) bloqueou a ação inibitória da pregnanolona (um modulador positivo do receptor GABA-A) sobre o prejuízo da memória produzido pelo etanol. Além disso, outras pesquisas mencionam que a epipregnanolona antagonizou a potenciação das correntes de cloreto mediada pela pregnanolona (Petty e Simmonds, 1991).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que o pré-tratamento com os sulfatos de pregnenolona ou dehidroepiandrosterona bloqueou a ação inibitória do muscimol (um agonista do receptor GABA-A) na tolerância rápida à incoordenação motora, sugerindo que a ação estimulatória da tolerância exercida por estes neuroesteróides pode ser mediada via uma ação antagonista no receptor GABA-A (Barbosa, 1999). Esses resultados são consistentes com estudos mostrando que moduladores negativos deste receptor atuam de maneira não competitiva diminuindo a atividade do receptor GABA-A (Majewska, 1992; Majewska *et al.*, 1986;

Mienvile e Vicine, 1989). Assim, o presente estudo mostra que a epipregnanolona bloqueia a ação estimulante da tolerância pelos sulfatos de pregnenolona e de dehidroepiandrosterona, bem como bloqueia a ação inibitória da tolerância pela alotetrahydrodeoxicorticosterona, sugerindo uma interação diferencial entre os neuroesteróides sobre o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.

Investigações recentes têm demonstrado um papel significativo para os neuroesteróides nos efeitos do etanol (Morrow *et al.*, 1998; 1999; 2001; VanDoren *et al.*, 2000; Barbaccia *et al.*, 1999). VanDoren e colaboradores (2000) investigaram se a alopregnanolona (modulador positivo do receptor GABA-A) pode contribuir para os vários efeitos do etanol. Os efeitos sedativo/hipnótico produzidos por altas doses de etanol são mediados, em parte, pelos receptores GABA-A e podem ser potencializados por agonistas e bloqueados por antagonistas deste receptor (Martz *et al.*, 1983). Estes pesquisadores verificaram que o pré-tratamento com finasterida (25 mg/kg), um inibidor da formação da alopregnanolona, não teve efeito sobre o aumento dos níveis deste neuroesteróide no córtex cerebral induzido pelo etanol em doses hipnóticas (3,5 g/kg) e, conseqüentemente, não teve efeito sobre o tempo de sono induzido pelo etanol. No entanto, o pré-tratamento com finasterida (50 mg/kg) bloqueou completamente o efeito

anticonvulsivante do etanol (2,0 g/kg), sem bloquear a incoordenação motora induzida por essa droga. Esses dados sugerem que a alopregnanolona pode modular ou mediar alguns efeitos do etanol relacionados com o receptor GABA-A, representando um novo mecanismo de ação para o etanol, bem como, um importante papel modulatório para os neuroesteróides no sistema nervoso central.

Por outro lado, estudos realizados por Barbaccia *et al.* (1999), relataram que uma dose baixa de etanol (1 g/kg), aumentou os níveis de alopregnanolona e alotetrahydrodeoxicorticosterona no córtex cerebral e no hipocampo em uma linhagem de ratos que prefere álcool, quando comparados com aqueles apresentados por uma linhagem de ratos que não prefere álcool. Ademais, outras pesquisas têm mostrado que a administração aguda de etanol reduziu os níveis de sulfato de dehidroepiandrosterona no cérebro de ratos (Baulieu e Robel, 1996) e bloqueou o aumento da LTP mediado pelo receptor NMDA em fatias do hipocampo produzido por este neuroesteróide (Randall *et al.*, 1995).

A partir desses estudos, testou-se, em nosso modelo, os efeitos da inibição da síntese de neuroesteróides no desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora causado pelo etanol, utilizando-se a finasterida, um inibidor da enzima 5 α -redutase, que catalisa a conversão da

progesterona em 5α -dihidroprogesterona e a indometacina, um inibidor da 3α -hidroxiesteróide redutase, que catalisa a conversão da 5α -dihidroprogesterona em alopregnanolona e alotetrahidrodeoxicorticosterona. Nossos resultados mostraram que o tratamento prévio com 50 mg/kg de finasterida, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, enquanto que as doses menores não apresentaram efeito nesse teste.

Considerando que a finasterida e a indometacina inibem a formação de alopregnanolona (Morrow *et al.*, 1998; 1999) e que a administração aguda de álcool aumenta os níveis deste neuroesteróide no córtex cerebral (VanDoren, 2000), nossa hipótese era que o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora produzida pelo etanol seria bloqueado pela administração prévia daqueles inibidores de enzima da formação de neuroesteróides. Assim, a inibição da enzima 5α -redutase pela finasterida resultou no bloqueio da tolerância rápida. Esse efeito da finasterida na tolerância pode estar relacionado com uma redução dos níveis de alopregnanolona, neuroesteróide modulador positivo do GABA-A. Embora não tenhamos realizado a dosagem dos níveis cerebrais de alopregnanolona no presente estudo, nossos resultados sugerem que, o bloqueio da síntese desse neuroesteróide pela finasterida bloqueia a tolerância rápida à incoordenação motora causada pelo álcool.

Com respeito ao nosso estudo com a indometacina, no entanto, não observamos bloqueio da tolerância com doses consideradas suficientes para bloquear a conversão 5α -dihidroprogesterona em alopregnanolona (Costa *et al.*, 1994). Estudos realizados por Morrow e colaboradores (1998) mostraram que a administração de indometacina, um inibidor da enzima 3α -hidroxiesteróide, aumentou, ao invés de diminuir, os níveis de alopregnanolona no córtex cerebral. Esse efeito poderia ocorrer pelo fato da indometacina bloquear a oxidação da alopregnanolona ao invés de bloquear a redução da 5α -dihidroprogesterona em alopregnanolona (Morrow *et al.*, 1999). Assim, os resultados obtidos com a indometacina em nosso modelo não foram conclusivos.

Como mencionado, várias pesquisas têm sugerido que os receptores GABA-A e NMDA são sensíveis à modulação pelos neuroesteróides (Majewska *et al.*, 1986; 1988; Mienville e Vicini, 1989; Schumacher e McEwen, 1989; Wu *et al.*, 1991; Bowlby, 1993; Park-Chung *et al.*, 1997; Yaghoubi *et al.*, 1998). Nosso estudo recente mostrou que o tratamento prévio com sulfato de pregnenolona bloqueou a inibição da tolerância rápida causado pela administração de muscimol, em camundongos tratados com etanol, enquanto que, o tratamento com MK-801 bloqueou a facilitação da tolerância por esse neuroesteróide (Barbosa, 1999). Como o sulfato de

pregnenolona é modulador negativo do receptor GABA-A e positivo do receptor NMDA, este resultado sugere que a facilitação da tolerância por este neuroesteróide pode estar relacionada com estes receptores.

Para melhor demonstrar a participação do receptor GABA-A nesses efeitos dos neuroesteróides, no presente estudo, verificou-se se a ação da epipregnanolona na tolerância rápida ao prejuízo motor causado por etanol (2,25 g/kg) seria afetada por (+)bicuculina, um antagonista do receptor GABA-A. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com (+)bicuculina, bloqueou, de modo dependente da dose, o efeito inibitório da tolerância causado por epipregnanolona (0,15 mg/kg). Assim, a dose de 1,0 mg/kg de (+)bicuculina bloqueou, enquanto que a dose de 0,75 mg/kg não teve efeito sobre a ação da epipregnanolona na tolerância. Esses dados reforçam a idéia de que este neuroesteróide influencia a tolerância ao álcool por um mecanismo que envolve o complexo receptor GABA-A, sugerida em nosso estudo prévio (Barbosa, 1999).

Esses resultados foram obtidos com doses da (+)bicuculina que não alteram a aquisição da tolerância rápida à incoordenação motora causada pelo etanol, nem a coordenação motora dos grupos controles no primeiro dia do teste. Além disso, essas doses da (+)bicuculina não promoveram qualquer efeito residual na coordenação motora dos animais no segundo dia,

sugerindo que essa droga afetou apenas a modulação pelos neuroesteróides na tolerância ao etanol.

Com respeito à participação do receptor NMDA na modulação da tolerância rápida ao álcool por neuroesteróides, estudo prévio mostrou que o (+)MK-801 bloqueou a estimulação da tolerância ao álcool por sulfato de pregnenolona (Barbosa, 1999). Esse efeito poderia ser interpretado como sendo uma soma algébrica entre as ações do (+)MK-801 e do sulfato de pregnenolona.

No presente estudo, o pré-tratamento com sulfato de pregnenolona (0,08 g/kg) bloqueou o efeito inibitório da tolerância rápida causado pelo (+)MK-801 (0,06 mg/kg), em camundongos tratados com etanol na dose de 2,25 g/kg (que produz tolerância *per se*). Este resultado reforça os dados obtidos no estudo anterior, sugerindo que a ação do sulfato de pregnenolona em nosso modelo esteja ligada ao receptor NMDA. Assim, esses resultados, em conjunto, são consistentes com estudos prévios que sugerem que os neuroesteróides moduladores positivos estimulam e potencializam a ligação do GABA e benzodiazepinas a membranas neuronais, aumentando o transporte de cloreto (Majewska *et al.*, 1986; Schumacher e McEwen, 1989), enquanto que, os neuroesteróides moduladores positivos do receptor NMDA aumentam as correntes induzidas pelo NMDA, aumentando a concentração

de cálcio intracelular mediado pelo receptor NMDA (Maione *et al.*, 1992; Irwin *et al.*, 1992). Além disso, há evidências de que os neuroesteróides moduladores positivos do receptor NMDA atuam em distintos sítios sobre este complexo receptor (Park-Chung *et al.*, 1997; Yaghoubi, *et al.*, 1998).

Por outro lado, há também evidências de que os receptores NMDA e GABA-A estejam envolvidos com os processos de aprendizagem e memória (Bliss e Collingridge, 1993; Morrisett e Swartzwelder, 1993). Trabalhos mostram que a atividade GABAérgica tem papel fundamental na indução da LTP (Wigstrom e Gustafsson, 1985; Collingridge *et al.*, 1992), uma vez que a hiperpolarização causada pela liberação de GABA intensifica o bloqueio do receptor NMDA por sítios regulatórios de íons Mg^{++} presentes no canal do complexo NMDA. A LTP e a memória são sensíveis à inibição neuronal, mediada pelo GABA e por agonistas do receptor GABA-A (Collingridge *et al.*, 1990; Sarter *et al.*, 1995; Evans e Viola-McCabe, 1996), enquanto que podem ser facilitadas por antagonistas GABA-A e por agonistas inversos do sítio de reconhecimento dos benzodiazepínicos (Izquierdo e Medina, 1995; Seabrook *et al.*, 1998). Há evidências de que o etanol potencializa as ações do GABA no receptor GABA-A (Tabakoff e Hoffmam, 1996), podendo contribuir para o prejuízo da aprendizagem e memória (White *et al.*, 1997; Vandergriff *et al.*, 1995; Givens, 1995). Já, o envolvimento do receptor

NMDA nos processos de aprendizagem e memória, tem sido demonstrado pelo fato de que antagonistas deste receptor bloqueiam a LTP e prejudicam o aprendizado e a memória (Collingridge *et al.*, 1992; Estall *et al.*, 1993; Izquierdo, 1991; 1995). Estudos *in vitro* mostram que o etanol inibe o influxo de cálcio mediado pelo receptor NMDA, atuando como um antagonista deste receptor (Lovinger *et al.*, 1989; Hoffman e Tabakoff, 1994; Schummers *et al.*, 1997).

Recentemente, existem informações a respeito do envolvimento dos receptores GABA-A, GABA-B e NMDA nas ações do etanol e a participação destes sistemas no desenvolvimento da tolerância a esta droga (Szabó *et al.*, 1994; Barreto *et al.*, 1998; Barbosa, 1999; Zaleski *et al.*, 2001). Estudos obtidos em nosso e em outros laboratórios sugerem que, o desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos de incoordenação motora e hipotermia do etanol é inibido por drogas que prejudicam a memória, tais como, a dizocilpina (MK-801) e a cetamina ou o muscimol (Khanna *et al.*, 1991b; 1992b; 1993a;- Barbosa, 1999; Barreto *et al.*, 1998), e estimulados por drogas que melhoram a memória, tais como a D-cicloserina (Khanna *et al.*, 1993b; 1995a).

Além disso, vários trabalhos têm mencionado que os neuroesteróides moduladores positivos do receptor GABA-A prejudicam a memória,

enquanto aqueles com influência negativa neste receptor ou exercendo modulação positiva no receptor NMDA, melhoram a aprendizagem e a memória (Mathis *et al.*, 1994; 1996; Meyer e Gruol, 1994; Flood *et al.*, 1999). Flood e colaboradores (1992; 1988), utilizando camundongos tratados com sulfato de pregnenolona e dehidroepiandrosterona, mostraram uma melhora da memória, avaliada no labirinto em T (T-maze). Estudos realizados por Mathis e colaboradores (1994; 1996) verificaram que a administração do sulfato de pregnenolona, em camundongos, reverteu o prejuízo da performance induzido por antagonistas do receptor NMDA, quando testados no rota-rod e na caixa de Skinner. Ademais, a influência destes neuroesteróides sobre a memória pode ser mediada via receptor sigma (Monnet *et al.*, 1995; Maurice *et al.*, 1997; Phan *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 2000).

Com base nesses dados, estudou-se a importância do fator aprendido na modulação do desenvolvimento tolerância rápida pelos neuroesteróides, sulfato de pregnenolona, um modulador negativo do receptor GABA-A (Mienville e Vicini, 1989), e epipregnanolona, um modulador positivo do receptor GABA-A (Melchior e Ritzmann, 1996). Se a modulação da tolerância rápida por neuroesteróides ocorresse durante o teste no primeiro dia, a administração dos neuroesteróides *após* o teste, não afetaria a

tolerância rápida. Portanto, verificou-se o efeito desses neuroesteróides na tolerância rápida administrando-os em um grupo de animais *antes* do teste e em outro grupo *após* o teste, no Dia 1. No segundo dia, observou-se que a administração de epipregnanolona *antes* do teste com etanol (2,25 g/kg), bloqueou a tolerância rápida à incoordenação motora causada pelo etanol, confirmando os experimentos anteriores. O grupo que recebeu epipregnanolona *após* o teste do rota-rod, desenvolveu tolerância rápida.

Utilizando-se o sulfato de pregnenolona, observou-se que a administração deste neuroesteróide *antes* do teste com etanol (1,9 g/kg), facilitou o desenvolvimento da tolerância rápida ao prejuízo motor induzido pelo etanol. Todavia, o grupo que recebeu sulfato de pregnenolona *após* o teste do rota-rod, não apresentou facilitação do desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. Portanto, a epipregnanolona e o sulfato de pregnenolona, respectivamente, só são capazes de bloquear ou facilitar a tolerância rápida ao etanol se forem administradas no animal *antes* da prática enquanto intoxicados, no primeiro dia do experimento.

Os resultados obtidos com o efeito hipotérmico do etanol foram similares àqueles obtidos com o prejuízo motor. Assim, nossos resultados sugerem que, embora a incoordenação motora e a hipotermia sejam controladas por estruturas distintas do sistema nervoso central, deve haver

um mecanismo associativo comum que contribua para a tolerância a estes efeitos do etanol que são influenciados pelos neuroesteróides.

Um estudo complementar a este resultado, foi realizado com o intuito de verificar se a facilitação causada pelo sulfato de pregnenolona sobre a tolerância rápida, estaria relacionada com o *aprendizado dependente de estado* (Khanna *et al.*, 1995a; Barreto, 1997). Os resultados demonstraram que os camundongos pré-tratados com sulfato de pregnenolona, no Dia 1, apresentaram tolerância rápida. Já os camundongos que receberam este neuroesteróide somente no Dia 2, não desenvolveram tolerância à incoordenação motora causada pelo etanol, comprovando resultados anteriores, com relação à necessidade do tratamento ser realizado antes da prática intoxicada. Os animais pré-tratados com sulfato de pregnenolona em ambos os dias (Dia 1 e Dia 2), apresentaram tolerância rápida, e estes resultados foram similares aos obtidos com o grupo que recebeu sulfato de pregnenolona, somente no Dia 1.

Os resultados obtidos com o efeito hipotérmico produzido pelo etanol foram semelhantes aos obtidos com a incoordenação motora produzida por esta droga. Portanto, nossos resultados sugerem que a facilitação da tolerância rápida ao etanol não deve estar relacionada com um aprendizado dependente de estado, uma vez que o grupo que recebeu o tratamento com o

neuroesteróide somente no segundo dia do teste, não evidenciou uma facilitação da tolerância rápida. Desta forma, estes experimentos mostraram que a facilitação da tolerância rápida pelos neuroesteróides está relacionada com algum processo que ocorre durante o teste, sob efeito do etanol, no Dia 1.

Como relatado na Introdução, a tolerância crônica é observada após dias, semanas ou meses de exposição ao etanol (Chandler *et al.*, 1998) e ambos os componentes disposicional e funcional estão geralmente incluídos neste tipo de tolerância. Khanna *et al.*, (1991a; 1992a; 1996), encontraram resultados semelhantes entre as tolerâncias crônica e rápida aos efeitos hipotérmico e de incoordenação motora produzidos pelo etanol. Outros trabalhos mostram que, o tratamento prévio com (+)MK-801 ou com cetamina bloqueiam de modo similar estes dois tipos de tolerância (Khanna *et al.*, 1992c; 1994; Szabó *et al.*, 1994). Recentemente, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o sulfato de pregnenolona e epipregnanolona estimulou e bloqueou, respectivamente, o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol, de maneira similar ao obtido com o modelo da tolerância rápida (Barbosa, 1999; Barbosa e Morato, 2000).

No presente estudo, tentamos correlacionar as alterações comportamentais verificadas após o desenvolvimento da tolerância crônica à

incoordenação motora produzida pelo etanol com possíveis alterações na subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA-A durante o tratamento crônico com etanol e neuroesteróides. Observou-se que o tratamento com etanol na dose de 2,5 g/kg durante treze dias levou ao desenvolvimento de tolerância. Esta dose foi escolhida para o estudo da influência dos neuroesteróides sulfato de pregnenolona e epipregnanolona nesse modelo.

Os resultados mostraram que o pré-tratamento com sulfato de pregnenolona, durante doze dias, facilitou significativamente o desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol, enquanto que o tratamento prévio com epipregnanolona bloqueou significativamente a tolerância ao etanol. Estes resultados foram obtidos com doses de neuroesteróides que *per se* não interferiram com a coordenação motora dos camundongos durante os doze dias de tratamento, sem causar efeitos residuais na coordenação motora basal ao longo do experimento. Portanto, nossos resultados foram semelhantes aos obtidos previamente em nosso e em outros laboratórios, confirmando que a tolerância rápida ao etanol pode ser utilizada como um modelo preditivo da tolerância crônica (Barbosa e Morato, 2000; Khanna *et al.*, 1991a; 1992c; 1996).

Há evidências de que a exposição crônica ao etanol produz efeitos comportamentais semelhantes aos da exposição crônica aos

benzodiazepínicos e barbitúricos. O uso prolongado de álcool produz tanto tolerância quanto dependência. Ambas estão correlacionadas com uma diminuição na sensibilidade das respostas mediadas pelo receptor GABA-A no córtex cerebral (Morrow *et al.*, 1988; Sanna *et al.*, 1993), em culturas de neurônios da medula espinhal (Mheta e Ticku, 1988; Ticku, 1989) e nos núcleos do septo medial (Criswell *et al.*, 1993). Trabalhos mencionam que no córtex cerebral e no cerebelo, o uso prolongado de álcool diminui a potenciação da ação do GABA ou o influxo de íons cloreto estimulado pelo muscimol (Allan e Harris, 1987; Morrow *et al.*, 1988; Grobin, *et al.*, 1998). Entretanto, a potenciação do influxo de íons cloreto mediada pelos neuroesteróides alopregnanolona e alotetrahydrodeoxicorticosterona está aumentada em ratos dependentes de etanol (Devaud *et al.*, 1996).

Enquanto que resultados de estudos comportamentais e funcionais claramente sugerem que a administração crônica de álcool altera a função do receptor GABA-A, dados de estudos de *binding* não proporcionam uma explicação para estes efeitos. Além disso, alterações não consistentes nos sítios de reconhecimento do receptor GABA-A têm sido observadas. Muitos estudos têm demonstrado que a administração crônica de etanol altera a expressão de várias subunidades do receptor GABA-A, sugerindo que estas alterações possam ser responsáveis pelas alterações na função do receptor

GABA-A (Morrow *et al.*, 1990b; 1992; Montpied *et al.*, 1991; Mhatre e Ticku, 1992; Mhatre *et al.*, 1993; Devaud *et al.*, 1995; 1997; Grobin *et al.*, 2000; Papadeas *et al.*, 2001).

As alterações na função e expressão do receptor GABA-A são dependentes da região, bem como do tempo de tratamento de etanol, e têm sido estudados principalmente em ratos. O consumo crônico com álcool durante 40 dias (Matthews *et al.*, 1998) ou 60 dias (Mahmoudi *et al.*, 1997), resultou em aumento da expressão da subunidade $\alpha 4$ no hipocampo de ratos, enquanto que o tratamento com 14 dias não alterou o nível de peptídeo desta subunidade. No entanto, o nível de RNAm e de peptídeo da subunidade $\alpha 4$ foi significativamente aumentado no córtex cerebral após 14 - 40 dias de consumo de etanol e durante a abstinência (Devaud *et al.*, 1995; 1997). A expressão do nível de RNAm e de peptídeo da subunidade $\alpha 1$ no hipocampo não foi alterada após tratamento crônico com etanol durante 14 ou 28 dias (Charlton *et al.*, 1997) ou 40 dias (Matthews *et al.*, 1998), enquanto diminuiu significativamente o nível de RNAm e de peptídeo da subunidade $\alpha 1$ no córtex cerebral após 14 dias (Devaud *et al.*, 1997) e 40 dias de tratamento (Matthews *et al.*, 1998). Estudos realizados por Charlton *et al.* (1997), demonstraram que o tratamento com etanol durante 2 a 4 semanas diminuiu a expressão do nível de RNAm da subunidade $\alpha 1$ e $\alpha 5$ no córtex cerebral e

no cerebelo de ratos. Já no hipocampo, o tratamento com etanol durante 1 a 4 semanas não alterou a expressão do nível de RNAm da subunidade $\alpha 1$, enquanto que após 12 semanas aumentou a expressão desta subunidade. Entretanto, Hirouchi *et al.* (1993) mostraram que camundongos expostos à inalação contínua com etanol por mais de 5 dias, apresentaram aumento significativo no nível de RNAm da subunidade $\alpha 1$, retornando aos níveis normais 8 horas após o término da inalação com etanol. Em conjunto, os resultados de todos esses estudos indicam que a expressão das subunidades do receptor GABA-A é regulada de modo diferente pelo etanol no hipocampo comparado ao córtex cerebral e cerebelo. Portanto, a regulação da expressão deste receptor pelo álcool varia de acordo com as regiões cerebrais.

Vários estudos sugerem que os sítios de ligação dos neuroesteróides no receptor GABA-A têm um importante papel na dependência e na abstinência ao etanol (Devaud *et al.*, 1996; Mehta e Ticku, 1999; Janak *et al.*, 1998; Bowen *et al.*, 1999; Finn *et al.*, 2000; VanDoren *et al.*, 2000). Recentemente, foi demonstrado que os neuroesteróides sulfatados e não sulfatados modulam a função do receptor GABA-A através de sítios distintos neste receptor (Sousa e Ticku, 1997; Park-Chung *et al.*, 1999). Entretanto, não se sabe se tais neuroesteróides afetam as mudanças neuroquímicas após

a administração crônica de etanol ou após a abstinência. Estudos de *binding* realizados por Mehta e Ticku (2001), mostraram que os neuroesteróides dehidroepiandrosterona e sulfato de dehidroepiandrosterona modulam a atividade do receptor GABA-A no córtex cerebral e no cerebelo de modo diferente em ratos dependentes de etanol. Isto sugere que o sítio de ligação destes neuroesteróides associados ao receptor GABA-A tem um importante papel na dependência do álcool e que alguma mudança neuroquímica após o uso prolongado de etanol pode ser mediada através destes sítios de ligação. No entanto, a base molecular para os diferentes efeitos destes neuroesteróides em modular a farmacologia dos receptores GABA-A ainda não está totalmente conhecida. Além disso, pesquisas recentes mostraram que a alopregnanolona diminuiu a expressão do nível de RNAm das subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ e β do receptor GABA-A (Yu *et al.*, 1996), enquanto que aumentou o nível de RNAm da subunidade $\alpha 4$ (Grobin e Morrow, 2000). Entretanto, a nosso ver não existem estudos sobre os efeitos da associação de neuroesteróides e álcool no imunocontéudo da subunidade $\alpha 1$ em camundongos.

Nossos resultados mostraram que não houve diferença no imunocontéudo da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA-A no hipocampo e no córtex de camundongos no décimo terceiro dia de tratamento com etanol

(2,5 g/kg), quando comparado aos grupos controle. Também, não se observou nenhuma alteração no imunoconteúdo desta subunidade após o tratamento crônico com os neuroesteróides sulfato de pregnenolona e epipregnanolona comparado aos respectivos grupos controle. Isto sugere que o uso prolongado de etanol resulta em tolerância crônica a esta droga, e que o tratamento crônico com sulfato de pregnenolona e epipregnanolona, respectivamente, facilita e bloqueia a tolerância. Porém, o desenvolvimento da tolerância crônica não parece estar relacionado a mudanças no conteúdo da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA-A no hipocampo e no córtex cerebral de camundongos.

É importante ressaltar que, em testes preliminares, o anticorpo reconheceu a banda específica mostrando uma linearidade na imunoreação na faixa de proteína de 50-150.

Além do conteúdo da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA-A, também foi quantificado o conteúdo de duas proteínas de choque térmico (*heat shock protein*) de 27 kDa e 70 kDa. Os resultados mostraram que não houve diferença no conteúdo destas proteínas após os respectivos tratamentos (dados não mostrados).

Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que os efeitos dos neuroesteróides no desenvolvimento da tolerância rápida aos efeitos do

etanol são influenciados por vários fatores e que o desenvolvimento da tolerância crônica não parece estar associado a alterações no conteúdo da subunidade $\alpha 1$ dos receptores GABA-A.

VI - CONCLUSÕES

1. Os neuroesteróides influenciam o desenvolvimento da *tolerância rápida* à hipotermia produzida pelo etanol.
2. A EPI bloqueou a ação estimulante da *tolerância rápida* pelo PS e DHEAS, bem como bloqueou a ação inibitória pela ALLOT, sugerindo uma interação diferencial entre os neuroesteróides na modulação do desenvolvimento da *tolerância rápida* ao etanol.
3. A finasterida bloqueou o desenvolvimento da *tolerância rápida* à incoordenação motora produzida pelo etanol, sugerindo um papel significativo para os neuroesteróides neste efeito do etanol.
4. A (+)bicuculina bloqueou o efeito inibitório da *tolerância rápida* ao etanol induzido pela EPI, sugerindo que este neuroesteróide influencia a tolerância por um mecanismo que envolve o complexo receptor GABA-A.
5. O PS bloqueou o efeito inibitório da *tolerância rápida* ao etanol causado pelo (+)MK-801 (reforçando estudos prévios), sugerindo que

este neuroesteróide influencia a tolerância por um mecanismo que envolve o receptor NMDA.

6. Os neuroesteróides influenciaram o desenvolvimento da *tolerância rápida* durante a execução do teste sob o efeito do etanol, no primeiro dia.
7. A facilitação da *tolerância rápida* ao etanol pelo PS, provavelmente, não se relaciona com um *aprendizado dependente de estado*, pois a administração de PS *antes* do etanol no primeiro dia do teste ou em *ambos* os dias, facilitou a tolerância, enquanto que a administração de PS *apenas* no segundo dia do experimento, não a facilitou.
8. Os efeitos dos neuroesteróides na *tolerância rápida* não se devem a uma interferência na farmacocinética do etanol no Dia 2 após o teste, pois a concentração sanguínea de etanol foi similar entre todos os grupos, sugerindo que esta forma de tolerância seja funcional.
9. O desenvolvimento da *tolerância crônica* não parece estar associado com mudanças no conteúdo da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA-A no hipocampo e no córtex cerebral de camundongos.

ABSTRACT

Our previous study showed that neurosteroids might either facilitate or block rapid tolerance (RT) and chronic tolerance (CT) to the incoordinating effects of ethanol (EtOH). The aim of the present study was to extend the investigation on the factors involved in the modulation of the tolerance to the effects of EtOH by neurosteroids. Initially, we defined the doses of EtOH that did or did not produce RT to EtOH-induced hypothermia. In a second step, we investigated whether pregnenolone sulfate (PS; 0.08 or 0.15 mg/kg), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS; 0.15 or 0.20 mg/kg) and allotetrahydrodeoxicorticosterone (ALLOT; 0.10 or 0.20 mg/kg) injected before EtOH (4.0 g/kg) on Day 1 influenced the development of RT to EtOH. Pretreatment with PS or with DHEAS significantly facilitated the acquisition of RT, whereas pretreatment with ALLOT significantly blocked the development of RT to the hypothermic effect. Considering the RT to ethanol-induced motor impairment, epipregnanolone (EPI; 0.15 mg/kg) reversed the stimulatory action of DHEAS (0.15 mg/kg), but did not affect the actions of PS (0.08 mg/kg). Moreover, EPI prevented the blockade of RT by ALLOT (0.10 mg/kg). In relation to the RT observed for EtOH-induced hypothermia, the results showed that pretreatment with EPI (0.30 mg/kg) significantly prevented the stimulatory action of DHEAS and PS, as well as the inhibitory action of ALLOT (0.20 mg/kg). Furthermore, pretreatment with finasteride blocked the development of RT to the incoordinating effect of EtOH, whereas pretreatment with indometacine did not affect this response. Administration of (+)bicuculine prevented the inhibitory action of ALLOT on RT to the incoordinating effect of EtOH. Pretreatment with PS reversed the inhibitory action of (+)-MK-801 on RT to the incoordinating effect of EtOH. Moreover, the stimulation of RT by PS seems to be unrelated to state-dependent-learning, since the administration before EtOH on both, Days 1 and 2 was similar to that produced by PS plus EtOH on Day 1 only. The injection of PS before the administration EtOH only on Day 2 did not affect RT. Furthermore, we investigated the effect of chronic EPI or PS treatment on CT induced by EtOH administration during 13 days. It was observed that the neurosteroid EPI blocked while PS stimulated the development of CT to the incoordinating effect of EtOH. In addition, GABA-A receptor $\alpha 1$ subunit expression was not altered in hippocampus and cerebral cortex homogenates from EtOH-exposed mice. Taken together, our results suggest that the effects of neurosteroids on the modulation of RT to EtOH are mediated by several factors. Also, our results suggest that administration of EtOH during 13 days, which results in the development of CT to EtOH in mice, is not associated with changes in the immunoccontent of $\alpha 1$ subunit in the hippocampus and cerebral cortex.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkana, R.L.; Finn, D.A.; Malcolm, R.D. The importance of experience in the development of tolerance to ethanol hypothermia. *Life Sciences*, 32: 2685-2692 1983.
- Allan, A.M. e Harris, R.A. Acute chronic ethanol treatment alters GABA receptor-operated chloride channels. *Pharmacol Biochem Behav*, 27: 665-670, 1987.
- American Psychiatric Association. Artes Médicas. Porto Alegre, 1995.
- Baldo, B.A. Protein blotting: research, applications and its place in protein separation methodology In: Chranbach, A.; Dunn, M.J.; Radola B.J. (Eds), *Advances in Electrophoresis*, VCH Press, v.7, pp. 407-478, 1994.
- Barbaccia, M.L.; Affricano, D.; Trabucchi, M.; Purdy, R.H.; Colombo, G.; Agabio, R.; Gessa, G.L. Ethanol markedly increases GABAergic neurosteroids in alcohol-preferring rats. *Eur J Pharmacol*, 384: R1-R2; 1999.
- Barbosa, A.D.E. Influência dos neuroesteróides sobre a tolerância rápida ao etanol em camundongos. Tese Mestrado em Farmacologia – Centro de Ciências Biológicas, Universidade de Santa Catarina, 1999.
- Barbosa, A.D.E. e Morato, G.S. Effect of epipregnanolone and pregnenolone sulfate an chronic tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 67: 459-464, 2000.
- Barreto, P.S. Influência do bloqueio do receptor NMDA e da síntese do óxido nítrico sobre a tolerância rápida ao etanol em camundongos submetidos ao teste do rotarod. Tese Mestrado em Farmacologia – Centro de Ciências Biológicas, Universidade de Santa Catarina, 1997.
- Barreto, P.S.; Lemos, T.; Morato, G.S. NMDA-receptor antagonists block the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Addiction Biology*, 3: 55-64, 1998.
- Baulieu, E.E. Steroid hormones in the brain: several mechanisms? In: Fuxe K., (eds) *Steroid hormone regulation in the brain. Pergamon Press, Oxford*, 3-14, 1981.
- Baulieu, E.E. Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell*, 71: 3-10, 1991.
- Baulieu, E.E. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Rec Prog Res*, 52: 1-32, 1997.
- Baulieu, E.E. e Robel, P. Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Molec Biol*, 37: 395-403; 1990.
- Baulieu, E.E. e Robel, P. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids. *J Endocrinol*, 150: S221-S239, 1996.
- Bienkowski, P. e Kostowski, W. Discriminative stimulus properties of ethanol in the rat effects of neurosteroids and picrotoxin. *Brain Res*, 753(2): 348-352, 1997.
- Bitrán, M. e Kalant, H. Learning factor in rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment. *Pharmacol Biochem Behav*, 39: 917-922, 1991.
- Bliss, T.V.P. e Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361: 31-39, 1993.

- Blume, T.W.; Green, S.; Joanning, H.; Quinn, W.S. Social role negotiation skills for substance-abusing adolescents: a group model. *J Subst Abuse Treat*, 11(3): 197-204, 1994.
- Bongers, I.M.; Van Oers, H.A.; Van de Goor, I.A.; Garretsen, H.F. Alcohol use and problem drinking: prevalences in the general Rotterdam population. *Subst Use Misuse*, 32(11): 1491-512, 1997.
- Bonnert, T.P.; McKernan, R.M.; Farrar, S.; Le Bourdelles, B.; Heavens, R.P.; Smith, D.W.; Hewson, L.; Rigby, M.R.; Sirinathsinghji, D.J.S.; Brown, N.; Wafford, K.A.; Whiting, P.J. ϕ , a novel α -aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 9891-9896, 1999.
- Bowen, C.A.; Purdy, R.H.; Grant, H.A. An investigation of endogenous neuroactive steroid-induced modulation of ethanol's discriminative stimulus effects. *Behav Pharmacol*, 10(3): 297-311, 1999.
- Bowlby, M.R. Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-d-aspartate receptor channels in hippocampal neuron. *Molec Pharmacol*, 43: 813-819, 1993.
- 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 H₁ stimulated phosphorylation of Ser⁸, Ser¹⁹, Ser³¹ and Ser⁴⁰. *J Neurochem*, 64: 1370-1378, 1995.
- Carette, B. e Poulain, P. Excitatory effect of dehydroepiandrosterona, its sulphate esther and pregnenolone sulphate, applied by iontophoresis and pressure, on single neurons in the septo-optic area of the guinea pig. *Neurosci Lett*, 45: 205-210, 1984.
- Chan, A.W.K.; Schanley, D.L.; Aleo, M.D.E; Leong, F.W. Cross tolerance between ethanol and chlordiazepoxide. *Alcohol*, 2: 209-213, 1985.
- Chandler, J.L.; Harris, A.R.; Crews, T.F. Ethanol tolerance and synaptic plasticity. *Tips*, 19: 491-495, 1998.
- Chang, G.; Behr, H.; Goetz, M.A. et al. Women and alcohol abuse in primary care. Identification and intervention. *Am J Addict*, 6(3): 183-92, 1997.
- Charlton, M.E.; Sweetnam, P.M.; Fitzgerald, L.W.; Terwilliger, R.Z.; Nestler, E.J.; Duman, R.S. Chronic ethanol administration regulates the expression of GABAA receptor alpha 1 and alpha 5 subunits in the ventral tegmental area and hippocampus. *J Neurochem*, 68: 121-127, 1997.
- Chen, C.S. A study-of the alcohol-tolerance effect and an introduction of a new behavioral technique. *Psychopharmacology (Berl.)*, 12: 433-440, 1968.
- Clark, W.B. e Hilton, M.E. eds. *Alcohol in America: Drinking practices and problems*. Albany: State University of New York Press, 1991.
- Cloninger, C.R. Neurogenetic adaptative mechanisms in alcoholism. *Science*, 236: 410-416, 1987.
- Collingridge, G.L.; Harvey, J.; Frenguelli, B.G.; Bortolotto, Z.I.B.; Davies, C.H. Amino acid receptors and long term potentiation: targets for the development of cognitive enhancers. *Int Acad Biomed Res*, 2: 41-49, 1992.
- Collingridge, G.L. e Singer, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci*, 11: 290-296, 1990.

- Collins, E. e Sim, A.T.R. Regulation of neuronal PP1 and PP2A during development. *Methods in Molecular Biology*, 93: 79-102, 1998.
- Compagnone, N.A.; Bulfone, A.; Rubenstein, J.L.; Mellon, S.H. Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology*, 136(11): 5212-5223, 1995.
- Compagnone, N.A. e Mellon, S.H. Dehydroepiandrosterone: a potential signaling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 4678-4683, 1998.
- Compagnone, N.A. e Mellon, S.H. Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21: 1-56, 2000.
- Cordeiro, R., Lima Filho, E.C., Almeida, I.M. Blood pressure among tannery workes. *Rev. Saúde Pública*, 32: 467-476, 1998.
- Corpéchet, C.; Synguelakis, M.; Talha, S.; Axelson, M.; Sojövall, J.; Vihko, R.; Baulieu, E.E.; Robel, P. Pregnenolone and its sulphate ester in the rat brain. *Brain Res*, 270: 119-125, 1983.
- Costa, E.; Auta, J.; Guidotti, A.; Korneyev, A. The pharmacology of neurosteroidogenesis. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 49: 385-389, 1994.
- Crabbe, J.C.; Rigter, H.; Uijlen, J.; Strijbos, C. Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. *J Pharmacol Exper Ther*, 208: 128-133, 1979.
- Crews, F.T.; Morrow, A.L.; Criswell, H.; Breese, G. Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol*, 39: 283-367, 1996.
- Criswell, H.E.; Simson, P.E.; Johnson, K.B.; Breese, G.R. Chronic ethanol decreases the ability of GABA to inhibit ethanol-sensitive neurons in the medial septum. *Alcohol Clin Exp Res*, 17: 477, 1993.
- Cuningham, C.L. e Bischof, L.L. Stress and ethanol-induced hypothermia. *Physiol Behav*, 40: 377-382, 1987.
- Czlonkowska, A.I.; Krzascik, P.; Sienkiewicz-Jarosz, H.; Siemiakowski, M.; Szyndler, J.; Bidzinski, A.; Plaznik, A. The effects of neurosteroids on picrotoxin-, bicuculine- and NMDA-induced seizures, and a hypnotic effect of ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67: 345-353, 2000.
- Davies, P.A.; Hanna, M.C.; Hales, T.G.; Kirkness, E.F. Insensitivity to anaesthetic agents conferred by class of GABA-A receptor subunit. *Nature*, 385: 820-823, 1997.
- De Kloet, E.R.; Vreugdenhil, E. Oitzl, M.S. Joels, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Ver*, 19: 269-301, 1998.
- De Meio, R. Sulfate activation and transfert. *Metabolisme of Sulfur Compoumnds*, New York: Academic Press, v.7, pp. 287-359, 1975.
- Demirgoren, S.; Majewska, M.D.; Spivak, C.E.; London, E.D. Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABA_A receptor. *Neuroscience*, 45: 127-135, 1991.
- Deutsch, S.I.; Kaushik, M.; Huntzinger, J.A.; Novitzki, M.R.; Mastropaolo, J. Potentiation of ethanol via interference with calcium channels. *Pharmacol Biochem Behav*, 38: 665-668, 1991.

- Devaud, L.L.; Smith, F.D.; Grayson, D.R.; Morrow, A.L. Chronic ethanol consumption differentially alters the expression of γ -aminobutyric acid_A receptor subunit mRNAs in rat cerebral cortex: competitive, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Mol Pharmacol*, 48: 861-868, 1995.
- Devaud, L.L.; Purdy, R.H.; Finn, D.A.; Morrow, A.L. Sensitization of γ -aminobutyric acid_A receptors to neuroactive steroids in rats during ethanol withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther*, 278: 510-517, 1996.
- Devaud, L.L.; Fritschy, J.M.; Sieghart, W.; Morrow, A.L. Bi-directional alterations of GABA-A receptors subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. *J Neurochem*, 69: 126-130, 1997.
- Diamond, I. e Gordon, A.S. Celular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Reviews*, 77: 1-20, 1997.
- Diamond, I e Messing, R.O. Neurologic effects of alcoholism. *West J Med*, 161: 279-287, 1994.
- Eckardt, M.J.; File, S.E.; Gessa, G.L.; Grant, K.A.; Guerri, C.; Hoffman, P.L.; Kalant, H.; Koob, G.F.; Li, T.K.; Tabakoff, B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(5):998-1040, 1998.
- Ehlers, C.L.; Kancko, W.M.; Wall, T.L. Effects of dizolcilpine (MK-801) and ethanol on the EEG and event-related potentials (ERPS) in rats. *Neuropharmacology*, 31: 369-378, 1992.
- Erickson, C.K. e Graham, D.T. Alterations in cortical and reticular acetylcholine release by ethanol in vivo. *J Ppharmacol Exp Ther*, 185: 583-593, 1973.
- Erwin, V.G. e Dietrich, A.R. Genetic selection and characterization of mouse lines for acute functional tolerance to ethanol. *J pharmacol Exp Ther*, 279: 1310-1317, 1996.
- Estall, B.L.; Grant, S.J.; Cicala, G.A. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 46: 959-962, 1993.
- Evans, M.S. e Viola-McCabe, K.E. Midazolam Inhibits Long-Term Potentiation Through modulation of GABA_A Receptors. *Neuropharmacology*, 35(3): 347-357, 1996.
- Faingold, C.L.; N'Goueno, P.; Riaz, A. Ethanol and neurotransmitter interactions from molecular to integrative effects. *Prog Neurobiol*, 55 (5): 509-535, 1998.
- Ferreira, V.M.; 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*, 25(10): 1536-1541, 2001.
- Fink, K.; Gothert, M. Both ethanol and ifenprodil inhibit NMDA-evoked release of various neurotransmitters at different, yet proportional potency: Potential relation to NMDA receptor subunit composition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 354: 312-319, 1996.
- Finn, D.A.; Gallaher, E.J.; Crabbe, J.C. Diferential change in neuroactive steroid sensitivity during ethanol withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther*, 292: 394-405, 2000.

- Flood, J.F. e Roberts, E. Deydroepiandrosterone sulfate improves memory in aging mice. *Brain Res*, 488: 178-181, 1988.
- Flood, J.F.; Morley, J.E.; Roberts, E. Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 1567-1571, 1992.
- Flood, J.F.; Farr, S.A.; Johnson, D.A.; Li, P.; Morley, J.E. Peripheral steroid sulfatase inhibition potentiates improvement of memory retention for hippocampally administered dehydroepiandrosterone sulfate but not pregnenolone sulfate. *Psychoneuroendocrinology*, 24: 799-811, 1999.
- Forster, L.M.; Tannhauser, M.; Barros, H.M. Drug use among street children in southern Brazil. *Drug Alcohol Depend*, 43: 57-62, 1996.
- Frye, G.D.; Chapin, R.E.; Vogel, R.A.; Mailman, R.B.; Kilts, C.D.; Mueller, R.A.; Breese, G.R. Effects of acute and chronic 1,3-butanediol treatment on central nervous system function: a comparison with ethanol. *J Pharmacol Exp Ther*, 216: 306-314, 1981.
- Garro, A.J.; Espina, N.; Lieber, C.S. Chronic alcohol consumption has been associated with increased risk of cancers of the upper digestive and respiratory tracts. Suppression of the immune response may be one way in which alcohol influences the cancer-causing process. *Alcohol Health & Research World*, 16: 81-86, 1992.
- Gatto, G.J.; Murphy, J.M.; Waller, M.B.; McBride, W.J.; Lumeng, L.; Li, T.K. Chronic ethanol tolerance through free-choice drinking in the P line of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 28: 111-115, 1987.
- Givens, B.S. e Breese, G.R. Site-specific enhancement of γ -aminobutyric acid-mediated inhibition of neuronal activity by ethanol in the rat medial septum. *J Pharmacol Exp Ther*, 254: 528-538, 1990.
- Givens, B.S. e McMahon, K. Effects of ethanol on nonspatial working memory and attention in rats. *Behav Neurosci*, 111: 275-282, 1997.
- Głowa, J.R.; Crawley, J.; Suzdak, P.D.; Paul, S.M. Ethanol and the GABA receptor complex: studies with the partial inverse benzodiazepine receptor agonist Ro 15-4513. *Pharmacol-Biochem Behav*, 31: 767-772, 1988.
- Gordis, E. Alcohol and tolerance. *NIAAA Alcohol Alert*, 28: 1-4, 1995.
- Grant, B.F. Prevalence and correlates of alcohol use and DSM-IV alcohol dependence in the United States: results of the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J Stud Alcohol*, 58(5): 464-73, 1997.
- Grant, K.A.; Valverius, P.; Hudspith, M.; Tabakoff, B. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur J Pharmacol*, 176: 289-296, 1990.
- Grobin, A.C.; Fritschy, J.M.; Morrow, A.L. Chronic ethanol administration alters immunoreactivity for GABA(A) receptor subunits in rat cortex in a region-specific manner. *Alcohol Clin Exp Res*, 24: 1137-1144, 2000.
- Grobin, A.C.; Matthews, D.B.; Devaud, L.L.; Morrow, A.L. The role of GABA_A receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology*, 139: 2-19, 1998.

- Grobin, A.C. e Morrow, A.L. 3α -hydroxy- 5α -pregnan-20-one exposure reduces GABA_A receptor $\alpha 4$ subunit mRNA levels. *European J Pharmacology*, 409, R1-R2, 2000.
- Grobin, A.C.; Papadeas, S.T.; Morrow, A.L. Regional variations in the effects of chronic ethanol administration on GABA_A receptor expression: potential mechanisms. *Neurochem Int*, 37: 453-461, 2000.
- Heuser, G. e Eidelberg, E. Steroid induced convulsions in experimental animals. *Endocrinology*, 69: 915-924, 1961.
- Hevers, W.; Luddens, H. The diversity of GABA-A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA-A channel subtypes. *Mol Neurobiol*, 18: 35-86, 1998.
- Hirouchi, M.; Hashimoto, T.; Kuriyama, K. Alteration of GABA_A receptor $\alpha 1$ -subunit mRNA in mouse brain following continuous ethanol inhalation. *Eur J Pharmacol*, 247: 127-130, 1993.
- Hodge, C.W. e Cox, A.A. The discriminative stimulus effects of ethanol are mediated by NMDA and GABA-A receptors in specific limbic brain regions. *Psychopharmacology*, 139: 95-107, 1998.
- Hoffman, P.L. e Tabakoff, B. The role of the NMDA receptor in ethanol withdrawal. *EXS*, 71: 61-70, 1994.
- Hoffman, P.L. e Tabakoff, B. Alcohol dependence: A commentary on mechanisms. *Alcohol*, 31:333-334, 1996.
- Hoffman, P.L.; Tabakoff, B.; Szabo, G.; Suzdak, P.D.; Paul, S.M. Effect of an imidazobenzodiazepine, Ro 15-4513, on the incoordination and hypothermia produced by ethanol and pentobarbital. *Life Sci*, 41: 611-619, 1987.
- Irwin, R.P.; Maragakis, N.J.; Rogawski, M.A.; Purdy, R. ; Farb, D.H.; Paul, S.M. Pregnenolone sulfate augments NMDA receptor mediated increases in intracellular Ca²⁺ in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett*. 141: 30-34, 1992.
- Ishak, K.G.; Zimmerman, J.; Ray, M.B. Alcoholic liver disease: Pathologic, pathogenic and clinical aspects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 15:45-66, 1991.
- Ishii, T.; Moriyoshi, K.; Sugihara, H.; Sakurada, K.; Kadotani, H.; Yokoi, M.; Akazawa, C.; Shigemoto, R.; Mizuno, N.; Nakanishi, S. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem*, 268: 2836-2843, 1993.
- Izquierdo, I. Role of NMDA receptors in memory. *Trends pharmacol Sci*. 21, 1991.
- Izquierdo, I. e Medina, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem*, 63(1): 19-32, 1995.
- Janak, P.H.; Redfern, J.E.M.; Samson, H.H. The reinforcing effects of ethanol are altered by the endogenous neurosteroid, allopregnanolone. *Alcoholism Clin Exp Res*, 22: 1106-1112, 1998.
- Johnson, J.W. e Ascher, P. Glicine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325: 529-531, 1987.
- Johnston, G.A. GABA_A receptor pharmacology. *Pharmacol Ther*, 69: 173-198, 1996.

- Kalant, H. Tolerance, learning and neurochemical adaptation. *Can J Physiol Pharmacol*, 63: 1485-1494, 1985.
- Kalant, H. Current state of knowledge about the mechanisms of alcohol tolerance. *Addict Biol*, 1: 133-141, 1996.
- Kalant, H. Research on tolerance: What can we learn from history? *Alcohol Clin Expres*, 22: 67-76, 1998.
- Kalant, H. e Khanna, J.M. Methods for the study of tolerance. *Mod Meth Pharmacol*, Vol 6, 43-66, 1990.
- Khanna, J.M.; Kalant, H.; Shah, G.; Weiner, J. Rapid tolerance as an index of chronic tolerance. *Pharmacol Biochem Behav*, 38: 427-432, 1991a.
- Khanna, J.M.; Wu, P.H.; Weiner, J.; Kalant, H. NMDA antagonist inhibits rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 26: 643-645, 1991b.
- Khanna, J.M.; Kalant, H.; Weiner, J.; Chau, A. Rapid tolerance and cross-tolerance as predictors of chronic tolerance and cross-tolerance. *Pharmacol Biochem Behav*, 41: 355-360, 1992a.
- Khanna, J.M.; Kalant, H.; Shah, G.; Chau, A. Effect of (+) MK-801 and ketamine on rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 28: 311-314, 1992b.
- Khanna, J.M.; Kalant, H.; Weiner, J.; Chau, A.; Shah, G. Ketamine retards chronic but not acute tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 42: 347-350, 1992c.
- Khanna, J.M.; Shah, G.; Weiner, J.; Wu, P.H.; Kalant, H. Effect of NMDA antagonists on rapid tolerance to ethanol. *European J Pharmacol*. 230: 23-31, 1993a.
- Khanna, J.M.; Kalant, H.; Shah, G.; Chau, A. Effect of D-cycloserine on rapid tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 45: 983-986, 1993b.
- Khanna, J.M.; Morato, G.S.; Chau, A.; Shah, G.; Kalant, H. Effect of NMDA antagonists on rapid and chronic tolerance to ethanol: importance of intoxicated practice. *Pharmacol Biochem Behav*, 48: 755-763, 1994.
- Khanna, J.M.; Kalant, H.; Morato, G.S.; Chau, A.; Shah, G. D-cicloserine enhances rapid tolerance to ethanol motor incoordinated. *Pharmacol Biochem Behav*, 52: 609-611, 1995a.
- Khanna, J.M.; Morato, G.S.; Chau, A.; Shah, G. Influence of nitric oxide synthase inhibition on the development of rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 37(6): 599-604, 1995b.
- Khanna, J.M.; Chau, A.; Shah, G. Characterization of the phenomenon of rapid tolerance to ethanol. *Alcohol*, 13(6): 621-628, 1996.
- Khanna, J.M.; Shah, G.; Chau, A. Effect of NMDA antagonists on rapid tolerance to ethanol under two different testing paradigms. *Pharmacol Biochem Behavior*, 57(4): 693-697, 1997.
- Kokate, T.G.; Banks, M.K.; Magoo, T.; Yamaguchi, S.I.; Rogawski, M.A. Finasteride, a 5 α -reductase inhibitor, blocks the anticonvulsant activity of progesterone in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 288: 679-684, 1999.
- Koltchine, V.; Anantharam, V.; Wilson, A.; Bayley, H.; Treistmam, S.N. Homomeric assemblies of NMDAR1 splice variants are sensitive to ethanol. *Neurosci Lett*, 152, 13-16, 1993.

- Krystal, J.H.; Petrakis, I.L.; Webb, E.; Cooney, N.L.; Karper, I.P.; Namanworth, S. Dose-related ethanol-like effects of the NMDA antagonist, ketamine, in recently detoxified alcoholics. *Archives of General Psychiatry*, 55: 354-360, 1998.
- Kuner, T.; Schoepfer, R.; Korpi, E.R. Ethanol inhibits glutamate-induced currents in heteromeric NMDA receptor subtypes. *NeuroReport*, 5: 297-300, 1993.
- Lambertt, J.J.; Belelli, D.; Hill-Venning, C.; Peters, J.A. Neurosteroids and GABA-A receptor function. *Trends Pharmacol Sci*, 16: 295-303, 1995.
- Laube, B.; Hiari, H.; Sturgess, M.; Betz, H.; Kuhse, J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron*, 18: 493-503, 1997.
- Laube, B.; Kuhse, J.; Betz, H. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci*, 18: 2954-2961, 1998.
- Lê, A.D. e Kalant, H. Learning as a factor in ethanol tolerance. In: Erinoff, L. (Ed) Neurobiology of drug abuse: learning and memory. NIDA Res Monogr No 97, Washington DE, US Government printing Office, 193-207, 1990.
- Lê, A.D.; Khanna, J.M.; Kalant, H.; Leblanc, A.E. Effect of tryptophan on the acquisition of tolerance to ethanol-induced motor impairment and hypothermia. *Psychopharmacology*, 61: 125-129, 1979.
- Lê, A.D.; Khanna, J.M.; Kalant, H. Role of Pavlovian conditioning in the development of tolerance and cross-tolerance to the hypothermic effect of ethanol and hydralazine. *Psychopharmacology*, 92: 210-214, 1987.
- Lê, A.D.; Kalant, H.; Khanna, J.M. Role of intoxicated practice in the development of ethanol tolerance. *Psychopharmacology*, 99: 366-370, 1989.
- Lê, A.D. e Kiianmaa, K. Characteristics of ethanol tolerance in alcohol drinking (AA) and alcohol avoiding (ANA) rats. *Psychopharmacology*, 94: 479-483, 1988.
- LeBlanc, A.E.; Gibbins, R.J.; Kalant, H. Behavioral augmentation of tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacology*, 30: 117-112, 1973.
- LeBlanc, A.E.; Kalant, H.; Gibbins, R.J. Acute tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacology*, 41: 43-49, 1975.
- Lephart, E.D.; Ladle, D.R.; Jacobson, N.A.; Rhees, R.W. Inhibition of brain 5 α -reductase in pregnant rats: Effects on enzymatic and behavioral activity. *Brain Res*, 739: 356-360, 1996.
- Lieber, C.S. Mechanisms of ethanol-drug-nutrition interactions. *J Toxicol Clin Toxicol*, 32: 631-681, 1994.
- Lovinger, D.M. Development decrease in ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in rat neocortical neurons: Relation to the actions of ifenprodil. *J Pharmacol Exp Ther*, 274, 164-172, 1995.
- Lovinger, D.M.; White, G.; Weight, F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 243: 1721-1724, 1989.
- Lovinger, D.M.; 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.
- Mahmoudi, M.; Kang, M.H.; Tillakaratne, N.; Tobin, A.J.; Olsen, R.W. Chronic intermittent ethanol treatment in rats increases GABA α 4-subunit

- expression: possible relevance to alcohol dependence. *J Neurochem*, 68: 2485-2489, 1997.
- Maione, S.; Berrino, L.; Vitagliano, S.; Leyva, J.; Rossi, F. Pregnenolone sulfate increases the convulsant potency of N-methyl-D-aspartate in mice. *Eur J Pharmacol*, 219: 477-479, 1992.
- Majchrowicz, E. Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes. *Psychopharmacologia*, 43: 245-254, 1975.
- Majewska, M.D. Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABA-A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol*, 38: 379-395, 1992.
- Majewska, M.D.; Demirgoren, S.; London, E.D. Binding of pregnenolone sulfate to rat brain membranes suggests multiple sites of steroid action at the GABA_A receptor. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol Sect*, 189: 307-315, 1990a.
- Majewska, M.D.; Demirgoren, S.; Spivak, C.E.; London, E.D. The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABA_A receptor. *Brain Res*, 526: 143-146, 1990b.
- Majewska, M.D.; Harrison, N.L.; Schwartz, R.D.; Barker J.L.; Paul, S.M. Steroid hormone metabolites are benzodiazepine-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 232, 1004, 1986.
- Majewska, M.D. e Schwartz, R.D. Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the γ -aminobutyric acid receptor complex in brain? *Brain Res*, 404: 355-360, 1987.
- Majewska, M.D.; Mienville, J.D.; Vicini, S. Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonises electrophysiological responses to GABA in neurones. *Neurosci Lett*, 90, 279, 1988.
- Mansfield, J.G. e Cunningham, C.L. Conditioning and extinction of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in rats. *J Comp Physiol*, 94: 962-969, 1996.
- Marszalec, W.; Aistrup, G.L.; Narahashi, T. Ethanol modulation of excitatory and inhibitory synaptic interactions in cultured cortical neurons. *Alcoholism Clin Exp Res*, 22: 1516-1524, 1998.
- Martz, A.; Dietrich, R.A.; Harris, R.A. Behavioral evidence for the involvement of aminobutyric acid in the actions of ethanol. *Eur J Pharmacol*, 89: 53-62, 1983.
- Mathis, C.; Paul, S.M.; Crawley, N. The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks NMDA antagonist-induced deficits in a passive avoidance memory task. *Psychopharmacology*, 116: 201-206, 1994.
- Mathis, C.; Vogel, E.; Cagniard, B.; Criscuolo, F.; Ungerer, A. The neurosteroids pregnenolone sulfate blocks deficits induced by a competitive NMDA antagonist in active avoidance and lever-press learning tasks in mice. *Neuropharmacology*, 35(8): 1057-1064, 1996.
- Massod, K.; Wu, C.; Brauneis, U.; Weight, F.F. Differential ethanol sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Mol Pharmacol*, 45: 324-329, 1994.
- Matthews, D.B.; Simson, P.E.; Best, P.J. Acute ethanol impairs spatial memory but not stimulus/response memory in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*, 19: 902-909, 1995.

- Matthews, D.B.; Devaud, L.L.; Fritschy, J.M.; Sieghart, W.; Morrow, A.L. Differential regulation of GABA_A receptor gene expression by ethanol in the rat hippocampus vs. Cerebral cortex. *J Neurochem*, 70: 1160-1166, 1998.
- Maurice, T., Junien, J.; Privat, A. Dehydroepiandrosterone sulfate attenuates dizocilpine-induced learning tasks in mice via σ_1 -receptors. *Behav Brain Res*, 83: 159-164, 1997.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol*, 28: 197-276, 1987.
- McEwen, B.C. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci*, 12: 141-147, 1991.
- McKernan, R.M.; Whiting, P.J. Which GABA_A-receptor subtypes really occurs in the brain? *Trends Neurosci*, 19: 139-143, 1996.
- Meguro, H.; Mori, H.; Araki, K.; Kushiya, E.; Kutsuwada, T.; Yamazaki, M.; Kumanishi, T.; Arakawa, M.; Sakimura, K.; Mishima, M. Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNA. *Nature (London)*, 357: 70-74, 1992.
- Mehta, A.K. e Ticku, M.K. Ethanol potentiation of GABAergic transmission in cultured spinal cord neurons involves γ -aminobutyric acid-gated chloride channels. *J Pharmacol Exp Ther*, 246: 558-564, 1988.
- Mehta, A.K. e Ticku, M.K. Chronic ethanol treatment alters the behavioral effects of Ro 15-4513, a partially negative ligand for benzodiazepine binding sites. *Brain Research*, 489: 93-100, 1989.
- Mehta, A.K. e Ticku, M.K. An update on GABA_A receptors. *Brain Research Review*, 29: 196-217, 1999.
- Mehta, A.K. e Ticku, M.K. Prevalence of the GABA-A receptor assemblies containing alpha 1-subunit in the rat cerebellum and cerebral cortex as determined by immunoprecipitation: lack of modulation by chronic ethanol administration. *Brain Res Mol Brain Res*, 67(1): 194-199, 1999.
- Mehta, A.K. e Ticku, M.K. Unsulfated and sulfated neurosteroids differentially modulate the binding characteristics of various radioligands of GABA_A receptors following chronic ethanol administration. *Neuropharmacology*, 40: 668-675, 2001.
- Melchior, C.L. e Allen, P.M. Interaction of pregnanolone and pregnenolone sulfate with ethanol and pentobarbital. *Pharmacol Biochem Behav*, 42: 605-611, 1992.
- Melchior, C.L. e Ritzmann, R.F. Dehydroepiandrosterone enhances the hypnotic and hypothermic effects of ethanol and pentobarbital. *Pharmacol Biochem Behav*, 43: 223-227, 1992.
- Melchior, C.L. e Ritzmann, R.F. Neurosteroids Block the Memory-Impairing Effects of Ethanol in Mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 53(1): 51-56, 1996.
- Melchior, C.L. e Tabakoff, B. Modification of environmentally-cued tolerance to ethanol in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 219: 175-180, 1981.
- Melchior, C.L. e Tabakoff, B. Features of environment-dependent tolerance to ethanol. *Psychopharmacology*, 87: 94-100, 1985.
- Mellamby, E. Alcohol: its absorption into and disappearance from the blood under different conditions. *MRC Special Report Series No. 31*. HMSO, London, 1919.

- Meyer, J. H. e Gruol, D. L. Dehydroepiandrosterone sulfate alters synaptic potentials in area CA1 of the hippocampal slice. *Brain Res*, 633: 253-261, 1994.
- Mhatre, M.C.; Ticku, M.K. Chronic ethanol administration alters γ -aminobutyric acid_A receptor gene expression. *Mol Pharmacol*, 42: 415-422, 1992.
- Mhatre, M.C.; Pena, G.; Sieghart, W.; Ticku, M.K. Antibodies specific for GABA_A receptor alpha subunits reveal that chronic alcohol treatment down-regulates alpha-subunit expression in rat brain regions. *J Neurochem*, 61: 1620-1625, 1993.
- Michael, S.; Robel, P.; Baulieu, E.E. Development and regeneration of the nervous system: A role for neurosteroids. *Neurosci*, 18: 6-21, 1996.
- Michaelis, E.K.; Freed, W.J.; Galton, N.; Foye, J.; Michaelis, M.L.; Philips, I.; Kleinman, J.E. Glutamate receptors changes in brain synaptic membranes from human alcoholics. *Neurochem Res*, 15: 1055-1063, 1990.
- Mienville, J.M. e Vicini, S. Pregnenolone sulfate antagonises GABA-A receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res*, 489, 190-194, 1989.
- Mihic, S.J. Acute effects of ethanol on GABA-A and glycine receptor function. *Neurochemistry International*, 35: 115-123, 1999.
- Mihic, S.J. e Harris, R.A. Alcohol actions at the GABA-A receptor/chloride channel complex. In: Deitrich, R.A.; Erwin, V.G. (Eds.), *Pharmacological effects of ethanol on the nervous system*. CRC Press, Boca Raton, pp. 51-72, 1996.
- Mihic, S.J.; Ye, Q.; Wick, M. J.; Koltchines, V.V.; Krasowski, M.D.; Finn, S.E.; Mascia, M.P.; Valenzuela, C.F.; Hanson, K.K.; Greenblatt, E.P.; Harris, R.A.; Harrinson, N.L. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA_A and glycine receptors. *Nature*, 389: 385-389, 1997.
- Mirshahi, T. e Woodward, J.J. Ethanol sensitivity of heteromeric NMDA receptors: Effects of subunit assembly, glycine and NMDAR1 Mg²⁺-insensitive mutants. *Neuropharmacology*, 34: 347-355, 1995.
- Monnet, F.P.; Mahé, V.; Robel, P.; Baulieu, E.E. Neurosteroids, via σ receptors, modulate the [³H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Prog Natn Acad Sci USA*, 92: 3774-3778, 1995.
- Montpied, P.; Morrow, A.L.; Karanian, J.W.; Ginns, E.I.; Martin, B.M.; Paul, S.M. Prolonged ethanol inhalation decreases gamma-aminobutyric acid_A receptor α subunit mRNAs in the rat cerebral cortex. *Mol Pharmacol*, 39: 157-163, 1991.
- Monyer, H.; Burnashev, N.; Laurie, D.J.; Sakmann, B.; Seeburg, P.H. Development and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12: 529-540, 1994.
- Morrisett, R.A. e Swartzwelder, H.S. Attention of Hippocampal Long-Term Potentiation by Ethanol: A Patch-clamp Analysis of Glutamatergic and GABAergic Mechanisms. *J Neurosci*, 13 (5): 2264-2272, 1993.
- Morrow, A.L.; Suzdak, P.D.; Karanian, J.K.; Paul, S.M. Chronic ethanol administration alters γ -aminobutyric acid, pentobarbital and ethanol-mediated ³⁶Cl-uptake in cerebral cortical synaptoneurosome. *J Pharmacol Exp Ther*, 246: 158-164, 1988.

- Morrow, A.L.; Montpied, P.; Lingford-Hughes, A.; Paul, S.M. Chronic ethanol and pentobarbital administration in the rat: Effects on GABA_A receptor function and expression in brain. *Alcohol*, 7: 237-244, 1990a.
- Morrow, A.L.; Place, J.R.; Purdy, R.H.; Paul, S.M. Characterization of steroid interactions with γ -aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites. *Molec Pharmacol*, 37: 263-270, 1990b.
- Morrow, A.L.; VaDoren, M.J.; Devaud, L.L. Effects of progesterone or neuroactive steroid? *Nature*, 395: 652-653, 1998.
- Morrow, A.L.; VaDoren, M.J.; Penland, S.N.; Matthew, D.B. The role of GABAergic neuroactive steroids in ethanol action, tolerance and dependence. *Brain Res Rev*, 37:98-109, 2001.
- Morrow, A.L.; Janis, G.C.; VanDren, M.J.; Matthews, D.B.; Samson, H.H.; Janak, P.H.; Grant, K.A. Neurosteroids mediate pharmacological effects of ethanol: A new mechanism of ethanol action? *Alcoholism Clin Exp Research*, 23: 1933-1940, 1999.
- Morse, R.M. e Flavin, D.K. The definition of alcoholism. *Journal of the American Medical Association*, 268: 1012-1014, 1992.
- Muza, G.M.; Bettiol, H.; Muccillo, G.; Barbieri, M.A. The consumption of psychoactive substances by sex, age and substance. *Rev Saude Pública*, 31: 21-29, 1997a.
- Muza, G.M.; Bettiol, H.; Muccillo, G.; Barbieri, M.A. The consumption of psychoactive substances by adolescents in schools in Ribeirão Preto, SP (Brazil). II – Distribution of consumption by social levels. *Rev Saude Pública*, 31: 163-170, 1997b.
- Myers, R.D. e Melchior, C.L. Alcohol drinking in rat after destruction of serotonergic and catecholaminergic neurons in the brain. *Chem Path Pharmac*, 10: 363-378, 1975.
- Myers, R.D. e Veale, W.L. Alcohol preference in the rat: reduction following depletion of brain serotonin. *Science*, 160: 1469-1471, 1968.
- Nace, E.P. Alcoholism: epidemiology, diagnosis, and biological aspects. *Alcohol*, 3: 83-87, 1986.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID- 10. Ed. Artes Médicas Sul, 1993.
- Pandey, S.C. Neuronal signaling systems and ethanol dependence. *Mol Neurobiol*, 17: 1-15, 1998.
- Papadeas, S.; Grobin, A.C.; Morrow, A.L. Chronic ethanol consumption differentially alters GABA(A) receptor alpha 1 and alpha 4 subunit peptide expression and GABA(A) receptor-mediated ³⁶Cl(-) uptake in mesocorticolimbic regions of rat brain. *Alcohol Clin Exp Res*, 25: 1270-1275, 2001.
- Park-Chung, M.; Wu, F.S.; Farb, D.H. 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: A negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol Pharmacol*, 46: 146-150, 1994.
- Park-Chung, M.; Wu, F.S.; Purdy, R.H.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. Distinct sites for positive and negative modulation of NMDA receptors by sulfated steroids. *Soc Neurosci Abst*, 22: 1280, 1996.

- Park-Chung, M.; Wu, F.S.; Purdy, R.H.; Malayev, A.A.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol*, 52(6): 1113-1123, 1997.
- Park-Chung, M.; Malayev, A.; Purdy, R.H.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. Sulfated and unsulfated steroids modulate γ -aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res*, 830: 72-87, 1999.
- Paul, S.M. e Purdy, R.H. Neuroactive steroids. *FASEB J*, 6: 2311-2322, 1992.
- Pechansky, F. Patterns of alcohol use among adolescents living in Porto Alegre, Brazil. *J Psychoactive Drugs*, 30: 45-51, 1998.
- Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83: 346-356, 1977.
- Petty, C.J. e Simmonds, M.A. Antagonism of 5 β -pregnan-3 α -ol 20-one by its 3 β -isomer on GABA-evoked currents in cultured neurones. *Fundam Clin Pharmacol*, 5: 384, 1991.
- Phan, V., Su, T., Privat, A.; Maurice, T. Modulation of steroids levels by adrenalectomy/castration and inhibition of neurosteroids synthesis enzymes effect σ 1 receptor-mediated behavior in mice. *Eur J Neurosci*, 11: 2385-2396, 1999.
- Porto, J.D., Aguilar, A.A., Rosa, H. Clinical and epidemiological study of calcifying chronic pancreatitis in Goiânia, GO, Brazil. *Arq Gastroenterol*, 36: 27-31, 1999.
- Potts, G.; Creange, J.E.; Harding, H.R.; Schane, H.P. Trilostane, an orally active inhibitor of steroid biosynthesis. *Steroids*, 32: 257-267, 1978.
- Prince, R.J. e Simmonds, M.A. 5 β -pregnan-3 β -ol-20-one, a specific antagonist at the neurosteroid site of the GABA_A receptor complex. *Neurosci Lett*, 135: 273-275, 1992.
- Prince, R.J. e Simmonds, M.A. Differential antagonism by epipregnanolone of alphaxolone and pregnanolone potentiation of [³H]flunitrazepam binding suggested more than one class of binding site for steroids at GABA_A receptors. *Neuropharmacology*, 32: 59-63, 1993.
- 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 the hippocampal slice. *Brain Res*, 701: 238-248, 1995.
- Raymond, F.A. New methodologies for pharmacological treatment trials for alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*, 20 (7): 3A-9A, 1996.
- Reynolds, J.N., Prasad, A., MacDonald, J.F. Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl-currents in neurons of the chick, rat and mouse central nervous system. *Eur J Pharmacol*, 224: 173-181, 1992.
- Ritzmann, R. e Tabakoff, B. Body temperature in mice: A quantitative measure of alcohol tolerance and physical dependence. *J Pharmacol Exp Ther*, 199: 158-170, 1976.
- Robel, P. e Baulieu, E.E. Neurosteroids biosynthesis and function. *TEM*, 5: 1-8, 1994.
- Robel, P.; Young, J.; Corpèchot, C.; Mayo, W.; Perchè, F.; Haug, M.; Simon, H.; Baulieu, E.E. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: Functional correlates. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 53 (1-6): 355-360, 1995.

- Roberts, E.; Bogola, L.; Flood, J.F.; Smith, G.E. Effects of dehydroepiandrosterone and its sulfate on brain tissue in culture and on memory in mice. *Brain Res*, 406: 357-362, 1987.
- Ross, R.K., Bernstein, L., Trent, L. et al. A prospective study of risk factors for traumatic deaths in a retirement community. *Prev Med*, 19(3): 323-334, 1990.
- Sanna, E.; Serra, M.; Cossu, A.; Colombo, G.; Follesa, P.; Cuccheddu, T.; Concas, A.; Biggio, G. Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA_A and NMDA receptor function in the rat brain. *Alcohol Clin Exp Res*, 17: 115-123, 1993.
- Sarter, M.; McGaughy, J.; Holley, L.A.; Dudchenko, P. Behavioral facilitation and cognition enhancement. In: *Benzodiazepine Receptor Inverse Agonists*. Sarter, M.; Nutt, D. J. and Lister, R. G. (eds). *Wiley-Liss*, 213-242, 1995.
- Schlecht, N.F.; Franco, E.L.; Pintos, J.; Negassa, A.; Kowalski, L.P.; Oliveira, B.V.; Curado, M.P. Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Am J Epidemiol*, 150: 1129-1137, 1999.
- Schuckit, M.A. e Gold, E.O. A simultaneous evaluation of multiple markers of ethanol/placebo challenges in sons of alcoholics and controls. *Arc Gen Psychiatry*, 45: 211-216, 1988.
- Schulteis, G.; Hyytia, P.; Heinrichs, S.C.; Koob, G.F. Effects of chronic ethanol administration on oral self-administration of ethanol or saccharin by Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 20: 164-171, 1996.
- Schumacher, M. e McEwen, B.S. Steroid and barbiturate modulation of the GABA-A receptor. *Mol Neurobiol*, 3: 275-280, 1989.
- Schummers, J.; Bentz, S.; Browning, M.D. Ethanol's Inhibition of LTP May Not Be Mediated Solely via Direct Effects on the NMDA Receptor. *Alcohol Clin Exp Res*, 21(3): 404-408, 1997.
- Sdao-Jarvie, K. e Vogel-Sprott, M. Response expectancies affect the acquisition and display of behavioral tolerance to alcohol. *Alcohol*, 8: 491-498, 1991.
- Seabrook, G.R.; Easter, A.; Dawson, G.R.; Bowery, B.J. Modulation of Long-term Potentiation in CA1 Region of Mouse Hippocampal Brain Slices by GABA_A Receptor Benzodiazepine Site Ligands. *Neuropharmacology*, 36(6): 823-830, 1998.
- Sellers, E.M. e Kalant, H. Alcohol intoxication and withdrawal. *N Eng J Med*. 294: 757-762, 1976.
- Shingai, R.; Sutherland, M.L.; Barnad, E.A. Effects of subunit types of the cloned GABA-A receptor on the response to a neurosteroid. *Eur J Pharmac*, 206: 77-80, 1991.
- Snell, L.D.; Tabakoff, B.; Hoffman, P.L. Radioligand binding to the N-methyl-D-aspartate receptor/ionophore complex alterations by ethanol in vitro and by chronic in vivo ethanol ingestion. *Brain Res*, 602: 91-98, 1993.
- Snell, L.D.; Nunley, K.R.; Lickteig, R.L.; Browning, M.D.; Tabakoff, B.; Hoffman, P.L. Regional and subunit specific changes in NMDA receptor mRNA and immunoreactivity in mouse brain following chronic ethanol ingestion. *Brain Res Mol Brain Res*, 40: 71-78, 1996.

- Snell, L.D.; Claffey, D.J.; Ruth, J.A.; Valenzuela, C.F.; Cardoso, R.; Wang, Z.; Levinson, S.R.; Sather, W.A.; Williamson, A.V.; Ingersoll, N.C.; Ovchinnikova, L.; Bhawe, S.V.; Hoffman, P.L.; Tabakoff, B. Novel structure having antagonist actions at both the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor and neuronal voltage-sensitive sodium channels: biochemical, electrophysiological, and behavioral characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, 292: 215-227, 2000.
- Sousa, A.; Ticku, M.K. Interactions of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate with the GABA_A receptor complex reveals that it may act via the picrotoxin site. *J Pharmacol Exp Ther*, 282: 827-833, 1997.
- Spivak, C.E. Desensitization and noncompetitive blockade of GABA-A receptors in ventral midbrain neurons by a neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate. *Synapse*, 16: 113-122, 1994.
- Sunhara, G.I.; Kalant, H.; Schofield, M.; Grupp, L. Regional distribution of ethanol in the rat brain. *Can J Physiol Pharmacol*, 56: 988, 1978.
- Szabó, G.; Tabakoff, B.; Hoffman, P.L. The NMDA receptor antagonist, Dizolcilpine, differentially affects environment-dependent and environment-independent ethanol tolerance. *Psychopharmacology*, 113: 511-517, 1994.
- Tabakoff, B. Alcohol and Tolerance: in *Alcohol Alert, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 28: 1-4, 1995.
- Tabakoff, B.; Hoffman, P.L.; Moses, F. Neurochemical correlates of ethanol withdrawal: alterations in serotonergic function. *J Pharm Pharmacol*, 29: 471-476, 1977.
- Tabakoff, B.; Cornell, N.; Hoffman, P.L. Alcohol tolerance. *Ann Emerg Med*, 15: 1005-1012, 1986.
- Tabakoff, B. e Hoffman, P.L. Alcohol Addiction: An enigma among us. *Neuron*, 16: 909-912, 1996.
- Ticku, M.K. Ethanol and the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Experientia*, 45: 413-418, 1989.
- Tingley, W.G.; Ehlers, M.D.; Kameyama, K.; Doherty, C.; Ptak, J.B.; Riley, C.T.; Haganir, R.L. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem*, 272: 5157-5166, 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*, 62: 1635-1638, 1994.
- Tsai, G. e Coyle, J.T. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu Rev Med*, 49: 173-184, 1998.
- Urso, T.; Gavalier, J.S.; Van Thiel, D.H. Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in na emergency room. *Life Sci*, 28: 1053-1056, 1981.
- Vandergriff, J.L.; Mathews, D.B.; Best, P.J.; Simson, P.E. Effects of ethanol and diazepam on spatial and non-spatial tasks in rats on na 8-arm maze. *Alcohol Clin Exp Res*, 19: 64, 1995.
- VanDoren, M.J.; Matthews, D.B.; Janis, C.G.; Grobin, A.C.; Devaud, L.L.; Morrow, A.L. Neuroactive steroid 3-alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one modulates

- electrophysiological and behavioral actions of ethanol. *J Neurosci*, 20: 1982-1989, 2000.
- Vanover, K.E.; Suruki, M.; Robledo, S.; Huber, M.; Wieland, S.; Lan, N.C.; Gee, K.W.; Wood, P.L.; Cater, R.B. Positive allosteric modulators of the GABA_A receptor: differential interaction of benzodiazepines and neuroactive steroids with ethanol. *Psychopharmacology*, 141:77-82, 1999.
- Vanover, K.E. Interaction of ethanol with excitatory amino acid receptor antagonists in mice. *Eur J Pharmacol*, 368: 137 – 142, 1999.
- Venkov, C.D.; Myers, P.R.; Tanner, M.A.; Su, M.; Vaughan, D.E. Ethanol increases endothelial nitric oxide production through modulation of nitric oxide synthase expression. *Thromb Haemost*, 81: 638-642, 1999.
- Weiner, J.L.; Zhang, L.; Carlen, P.L. Potentiation of GABA_A-mediated synaptic current by ethanol in hippocampal CA1 neurons: possible role of protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther*, 268: 1388-1395, 1994.
- 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*, 68: 1949-1959, 1997.
- White, A.M.; Simson, P.E.; Best, P.J. Comparison between the effects of ethanol and diazepam on spatial working memory in the rat. *Psychopharmacology*, 133: 256-261, 1997.
- Wigström, H. e Gustafsson, B. Facilitation of hippocampal long-lasting potentiation by GABA antagonists. *Acta Physiol Scand*, 125: 159-172, 1985.
- Williams, G.D. e DeBaakey, S.F. Changes in levels of alcohol consumption: United States, 1983 to 1988. *Br J Addict*, 87(4): 643-648, 1992.
- Wirkner, K.; Poelchen, W.; Koles, L.; Muhlberg, K.; Scheibler, P.; Allgaier, C.; Illes, P. Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels. *Neurochem Int*, 35: 153-162, 1999.
- Woodward, J.J. Ionotropic glutamate receptors as sites of action for ethanol in the brain. *Neurochem Int*, 35: 107-113, 1999.
- Wright, J.M.; Peoples, R.W.; Weight, F.F. Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. *Brain Res*, 738: 249-256, 1996.
- Wu, F.S.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. Pregnenolone sulfate: A positive allosteric modulator at the N-methyl-d-aspartate receptor. *Molec Pharmacol*, 40: 333-336, 1991.
- Yaghoubi, N., Malayev, A., Russek, S.J., Gibbs, T.T., Farb, D.H. Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. *Brain Res*, 24(1-2): 153-160, 1998.
- Yarnold, B.M. Use in 1992 of amphetamines among Miami's public school students. *Psychol Rep*, 81(2): 411-7, 1997.
- Young, J.; Corpechot, C.; Perch, F.; Eychenne, B.; Haug, M.; Baulieu, E.E.; Robel, P. Neurosteroids in the mouse brain: Behavioral and pharmacological effects of a 3 – hydroxy steroid dehydrogenase inhibitor. *Steroids*, 61: 144-149, 1996.

- Yu R, Follesa P, Ticku MK. Down-regulation of the GABA receptor subunits mRNA levels in mammalian cultured cortical neurons following chronic neurosteroid treatment. *Brain Res Mol Brain Res*, 41:163-8, 1996.
- Zaleski, M.J.B, Nunes-Filho, J.R., Lemos, T., Morato, G.S. GABA_B receptors play a role in the development of tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology*, 153: 415-424, 2001.
- Zaman, S.H.; Shingai, R.; Harvery, R.J.; Darlison, M.G.; Barnard, E.A. Effects of subunit types of the recombinant GABA-A receptor on the response to a neurosteroid. *Eur J Pharmac Molec Pharmac Sect*, 225: 321-330, 1992.
- Zou, L.B., Yamada K., Sasa, M., Nakata, Y., Nabeshima, T. Effects of sigma₁ receptor agonist SA4503 and neuroactive steroids on performance in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology*, 39: 1617-1627, 2000.