

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICOS E  
BIOQUÍMICOS DO ETANOL EM ROEDORES, NA  
PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE ANTAGONISTAS  
DOPAMINÉRGICO, GLUTAMATÉRGICO E OPIÓIDE**

**SILVÂNIA MARIA MENDES DE VASCONCELOS**

**Fortaleza-CE  
2001**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

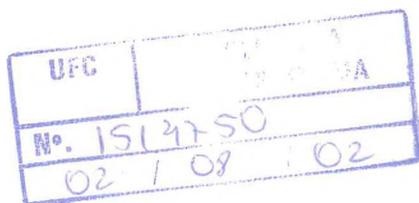
**EFEITOS COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICOS E  
BIOQUÍMICOS DO ETANOL EM ROEDORES, NA  
PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE ANTAGONISTAS  
DOPAMINÉRGICO, GLUTAMATÉRGICO E OPIÓIDE**

**SILVÂNIA MARIA MENDES DE VASCONCELOS**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em  
Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Glauce S. B. Viana

Fortaleza-CE



V45e Vasconcelos, Silvânia Maria Mendes

Efeitos comportamentais, neuroquímicos e bioquímicos do etanol em roedores, na presença e na ausência de antagonistas dopaminérgico, glutamatérgico e opióide/  
Silvânia Maria Mendes Vasconcelos. Fortaleza, 2001

245f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Glauce Socorro Barros Viana.

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará.  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

1. Etanol. 2. Farmacologia. I. Título.

CDD 615.7828

Esta tese encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca da Faculdade de Medicina da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja de conformidade com as normas da ética científica.

Sistema de Arquivos de Acesso

Dissertação aprovada em 10/09/2001

Banca Examinadora



---

Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

---

Prof. Dr. Luiz Eugênio A. M. Mello

---

Prof. Dr. Carlos Mauricio de Castro Costa

---

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

---

Profa. Dra. Glauce Socorro Barros Viana  
(Orientadora)

*A Deus que sempre  
ilumina o meu caminho*

*Aos meus pais;  
Aos meus bens Cláudio,  
Cláudio Felipe e Marianna  
Letícia por todo amor  
dedicado.*

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Glauce Socorro B. Viana, minha orientadora, que sempre repartiu com todos os seus conhecimento e amor pela pesquisa.

Às Dras Francisca Cléa Florenço de Sousa e Marta Fonteles pelo incentivo e amizade constantes.

Aos Profs. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa, Dr. Reinaldo Naoto Takahashi, Dr. Luiz Eugênio A. M. Mello, por terem gentilmente aceito o convite para participar da banca examinadora.

Ao professor Vietla Rao, pelo incentivo e comentários pertinentes.

À Profa. Maria Gorette pela colaboração nos experimentos bioquímicos e por sua incansável vontade e valiosa amizade.

Aos Profs. Dr. Manoel Odorico, Dra. Elizabete Moraes, Dr. Marcos Vale, Dr. Ronaldo pelo uso de aparelhos ou reagentes de seus laboratórios.

A todos os professores e funcionários que fazem o Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Às professoras Neiva Francilino, Lorita Pagluica, Grasiela Barroso e Zulene Vasconcelos minhas orientadoras durante a graduação que sempre estimularam minha carreira científica.

A todos os amigos do laboratório de Neurofarmacologia pela agradável convivência e a felicidade em realizar pesquisa.

A Vilanir que sempre ajuda a todos com total despreendimento

Aos bolsista do laboratório que ajudaram na execução desta tese, em especial ao Carlos Meton, Lorena, Raquel, Carlos Renato, Mirela, Glicio, Viviane, Roberto Falcão, Renata, Carlos Filho e Patrícia.

Aos amigos Danielle, Lissiana, Vera e Irisandro que ajudaram na preparação da apresentação.

À Dra. Artemísia pela colaboração e ajuda

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS	xx
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxvi
INTRODUÇÃO GERAL	1
1- O Álcool e o alcoolismo	1
2- Aspectos Farmacocinéticos do álcool	3
3-Toxicidade do álcool	6
3.1- Órgãos e sistemas afetados pelo álcool	8
3.1.1- Sistema Nervoso	8
3.1.2- Sistema Cardiovascular	9
3.1.3- Trato gastrointestinal	9
3.1.4- Fígado	9
3.1.5- Sistema hematopoético	10
3.1.6- Sistema endócrino	10
4- Ações do álcool nas lipoproteínas, apolipoproteínas e enzimas de função hepática	10
5-Ações do álcool sobre sistemas de neurotransmissores	13
5.1- Sistema dopaminérgico	13
5.1.1- Produção e distribuição de DA no encéfalo	13
5.1.2- Ação da DA na célula	16
5.1.3- O álcool e o sistema dopaminérgico	19
5.2- Sistema serotoninérgico	21
5.2.1- Produção e distribuição da serotonina no cérebro	21
5.2.2- Ação da serotonina na célula	23
5.2.3- O álcool e o sistema serotoninérgico	24
5.3- Sistema noradrenérgico	25
5.3.1- Distribuição no cérebro	25
5.3.2- Ação celular da NE no cérebro	26
5.3.3- O álcool e o sistema noradrenérgico	27
5.4- Sistema glutamatérgico	28
5.4.1- Biossíntese do glutamato	29

5.4.2- Ação do glutamato na célula	32
5.4.3- O álcool e o sistema glutamatérgico	36
6- Principais estratégias terapêuticas para o alcoolismo	37
6.1- Drogas usadas para tratar a síndrome de abstinência aguda do álcool	38
6.2- Drogas usadas para reduzir a depressão	38
6.3- Drogas usada para induzir aversão ao álcool	39
6.4- Drogas usada para reduzir as convulsões da síndrome de abstinência	39
6.5- Drogas usadas para reduzir a ingestão de álcool	40
6.6- Drogas usada para reduzir a recompensa	40
6.7- Drogas usada para reduzir o desejo mórbido ( <i>Craving</i> )	40
OBJETIVOS	42
MATERIAIS E MÉTODOS	44
1- Animais	44
2- Preparo das drogas	44
2.1- Etanol	44
2.2- Ketamina	45
2.3- Haloperidol	45
2.4- Naltrexona	45
3- Tratamento dos grupos experimentais	45
- Protocolo 1	46
- Protocolo 2	46
4- Material utilizado nos experimentos	49
5- Testes comportamentais	50
5.1- Teste de campo aberto na arena (para ratos)	50
5.2- Teste da atividade locomotora na caixa de comportamento (para camundongos)	51
5.3- Teste de <i>Rota-Rod</i> (para camundongos)	51
6- Dissecção da área cerebral (corpo estriado)	51
7- Determinação da densidade dos receptores dopaminérgicos	52
- Receptores D <sub>1</sub> - símile	53
- Receptores D <sub>2</sub> - símile	53
- Método	53
- Procedimento experimental	54

- Soluções reagentes	55
8- Dosagem de proteína	56
8.1- Método	56
8.2- Soluções Reagentes	56
9- Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC	57
- Método	57
- Procedimento experimental	58
- Soluções reagentes	59
10- Determinação de Aminoácidos	59
- Método	59
- Procedimento experimental	60
- Soluções reagentes	60
11- Análise bioquímica	62
- Obtenção das amostras	62
- Métodos	62
11.1- Glicose (Tiestz, 1970)	62
11.2- Triglicerídios (Tonks, 1970)	63
11.3- Colesterol Total (Tonks, 1970)	65
11.4- Colesterol HDL (Tonks, 1970)	66
11.5- Apolipoproteínas APO A 1 e APO B (Tonks, 1970; Tiestz, 1970)	67
11.6- Alanina Aminotransferase (ALT/TGP/GPT) (Tonks, 1970; Tiestz, 1970)	68
11.7- Aspartato Aminotransferase (AST/TGO/GOT) (Tonks, 1970; Tiestz, 1970)	69
12- Análise estatística	70
CAPÍTULO 1- Efeitos do etanol sozinho ou associado com drogas antagonistas glutamatérgica, dopaminérgica e opióide em testes comportamentais em ratos e camundongos	72
Introdução	73
Objetivos	75
Resultados	76
Discussão	94
Conclusões	100

CAPÍTULO 2- Determinação das concentrações de monoaminas e metabólitos em corpo estriado de ratos após administração de etanol sozinho e/ ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide	101
Introdução	102
Objetivos	103
Resultados	104
Discussão	128
Conclusões	138
CAPÍTULO 3- Densidade de receptores dopaminérgicos (D1 e D2-símile) em corpo estriado de ratos após administração de etanol sozinho e/ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide	140
Introdução	141
Objetivos	142
Resultados	143
Discussão	159
Conclusões	166
CAPÍTULO 4- Determinação dos níveis de Aminoácidos em corpo estriado de ratos após administração de etanol sozinho e/ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide	168
Introdução	169
Objetivos	171
Resultados	172
Discussão	184
Conclusões	190
CAPÍTULO 5- Determinação dos níveis séricos de glicose, apolipoproteínas, lipoproteínas e enzimas de função hepática em ratos após administração de etanol sozinho e/ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide	192
Introdução	193
Objetivos	195
Resultados	196
Discussão	214
Conclusões	220

CONSIDERAÇÕES FINAIS	222
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	224

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1-</b>	Estrutura molecular do álcool etílico	04
<b>Figura 2-</b>	Vias de metabolização do etanol	06
<b>Figura 3-</b>	Síntese, liberação e inativação da dopamina	15
<b>Figura 4-</b>	Distribuição das vias dopaminérgicas no SNC	16
<b>Figura 5-</b>	Neurônios dopaminérgicos no núcleo acumbente sensíveis ao álcool	19
<b>Figura 6-</b>	Vias serotoninérgicas no SNC	23
<b>Figura 7-</b>	Síntese do glutamato	31
<b>Figura 8-</b>	Tipos de receptores glutamatérgicos	35

### MATERIAIS E MÉTODOS

<b>Figura 1-</b>	Teste de atividade locomotora espontânea na arena	50
<b>Figura 2-</b>	Dissecação cerebral mostrando a retirada do corpo estriado de rato	52
<b>Figura 3-</b>	Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica	58

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1-</b>	Atividade locomotora espontânea em ratos 30 min ou 48 h após administração de dose única de etanol (0,5 ou 4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle)	80
<b>Figura 2-</b>	Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos no 7 <sup>o</sup> dia de tratamento diário, após 30 min ou 48 h da última administração de etanol (0,5, 2 ou 4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle)	81
<b>Figura 3-</b>	Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos no 1 <sup>o</sup> e 7 <sup>o</sup> dias de tratamento (imediatamente após a administração da droga) ou no 7 <sup>o</sup> e 21 <sup>o</sup> dias após a retirada de etanol (Et 0,5 ou Et 4 g/kg, v.o.) ou água	

	destilada (controle)	82
<b>Figura 4-</b>	Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), ketamina ou Et+ketamina-1 em função do tempo de retirada	83
<b>Figura 5-</b>	Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), haloperidol ou Et+haloperidol-1 em função do tempo de retirada	84
<b>Figura 6-</b>	Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), naltrexona ou Et+naltrexona-1 em função do tempo de retirada	85
<b>Figura 7-</b>	Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), ketamina ou Et+ketamina-2 em função do tempo de retirada	86
<b>Figura 8-</b>	Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), haloperidol ou Et+haloperidol-2 em função do tempo de retirada	87
<b>Figura 9-</b>	Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), naltrexona ou Et+naltrexona-2 em função do tempo de retirada	88
<b>Figura 10-</b>	Efeitos da administração diária de etanol sobre a atividade locomotora espontânea (ALE) em camundongos	91
<b>Figura 11-</b>	Efeitos do etanol no teste de <i>rota rod</i> em camundongos	93

## CAPÍTULO 2

<b>Figura 1-</b>	Efeitos da administração aguda do etanol sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos após tratamento agudo com etanol	109
<b>Figura 2-</b>	Efeitos da administração do etanol após 7 dias de tratamento e 30 min de retirada sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	110
<b>Figura 3-</b>	Efeitos da administração do etanol durante 7 dias de	

	tratamento e 48 h de retirada sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	111
<b>Figura 4-</b>	Efeitos da administração do etanol durante 30 dias e retirada de 30 min sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	112
<b>Figura 5-</b>	Efeitos da administração do etanol durante 30 dias e retirada de 48 h sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	113
<b>Figura 6-</b>	Efeitos da administração aguda ou repetida do etanol sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	114
<b>Figura 7-</b>	Efeitos da administração do etanol, ketamina ou Et+ketamina-1 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	122
<b>Figura 8-</b>	Efeitos da administração do etanol, haloperidol ou Et+haloperidol-1 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	123
<b>Figura 9-</b>	Efeitos da administração do etanol, naltrexona Et+naltrexona-1 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	124
<b>Figura 10-</b>	Efeitos da administração do etanol (14 dias), ketamina ou Et+ketamina-2 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	125
<b>Figura 11-</b>	Efeitos da administração do etanol, haloperidol ou Et+haloperidol-2 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	126
<b>Figura 12-</b>	Efeitos da administração do etanol, naltrexona ou Et+naltrexona-2 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos	127

## CAPÍTULO 4

<b>Figura 1-</b>	Efeitos do etanol sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos	177
<b>Figura 2-</b>	Efeitos do etanol, ketamina ou Et+ketamina sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos	178
<b>Figura 3-</b>	Efeitos do etanol, haloperidol ou Et+haloperidol-1 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos	179
<b>Figura 4-</b>	Efeitos do etanol, naltrexona ou Et+naltrexona-1 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos	180
<b>Figura 5-</b>	Efeitos do etanol (14 dias), ketamina ou Et+ketamina-2 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos	181
<b>Figura 6-</b>	Efeitos do etanol (14 dias), haloperidol ou Et+haloperidol-2 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos	182
<b>Figura 7-</b>	Efeitos do etanol (14 dias), naltrexona ou Et+naltrexona-2 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos	183

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1-</b>	Efeitos da administração repetida de etanol sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos, realizada na caixa de comportamento	90
------------------	---	----

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1-</b>	Efeitos da administração aguda de etanol sobre os receptores dopaminérgicos (D1 e D2-símiles) em corpo estriado de ratos, 48 h após a administração da droga	145
<b>Tabela 2-</b>	Efeitos do tratamento sub-crônico de etanol 30 min após a última administração da droga sobre os receptores dopaminérgicos (D1 e D2-símile) em corpo estriado de ratos	146
<b>Tabela 3-</b>	Efeitos do tratamento sub-crônico de etanol sobre os receptores D1 -símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos 48 h após a última administração da droga	147
<b>Tabela 4-</b>	Efeitos do tratamento sub-crônico de etanol sobre os receptores D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos 48 h após a última administração da droga	148
<b>Tabela 5-</b>	Efeitos do etanol (7 dias) e Et+ketamina-1 sobre os receptores D1 e D2-Símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos	153
<b>Tabela 6-</b>	Efeitos do etanol (7 dias) ou Et+haloperidol-1 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos	154
<b>Tabela 7-</b>	Efeitos do etanol (7 dias) ou Et+naltrexona-1 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos	155
<b>Tabela 8-</b>	Efeitos do etanol (14 dias) ou Et+ketamina-2 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado	

	de ratos	156
<b>Tabela 9-</b>	Efeitos do etanol (14 dias) ou Et+haloperidol-2 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos	157
<b>Tabela 10-</b>	Efeitos do etanol (14 dias) ou Et+naltrexona-2 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos	158

## CAPÍTULO 5

<b>Tabela 1-</b>	Efeitos do etanol (7 dias), ketamina ou Et+ketamina-1 sobre os níveis plasmáticos de glicose e enzimas de função hepática em ratos	202
<b>Tabela 2-</b>	Tabela 2- Efeitos do etanol (7 dias), ketamina ou Et+ketamina-1 sobre os níveis séricos de apolipoproteínas e lipoproteínas em ratos	203
<b>Tabela 3-</b>	Efeitos do etanol (7 dias), haloperidol ou Et+haloperidol-1 sobre os níveis séricos de glicose e enzimas de função hepática em ratos	204
<b>Tabela 4-</b>	Efeitos do etanol (7 dias), haloperidol ou Et+haloperidol-1 sobre os níveis séricos de apolipoproteínas e lipoproteínas em ratos	205
<b>Tabela 5-</b>	Efeitos do etanol (7 dias), naltrexona ou Et+naltrexona-1 sobre os níveis séricos de glicose e enzimas de função hepática em ratos	206
<b>Tabela 6-</b>	Efeitos do etanol (7 dias), naltrexona ou Et+naltrexona-1 sobre os níveis séricos de apolipoproteínas e lipoproteínas em ratos	207
<b>Tabela 7-</b>	Efeitos do etanol (14 dias), ketamina ou associação de Et+ketamina-2 sobre os níveis séricos de glicose e enzimas de função hepática em ratos	208

<b>Tabela 8-</b>	Efeitos do etanol (14 dias), ketamina ou associação de Et+ketamina-2 sobre os níveis séricos de apolipoproteínas e lipoproteínas em ratos	209
<b>Tabela 9-</b>	Efeito do etanol (14 dias), haloperidol ou associação de Et+haloperidol-2 sobre os níveis séricos de glicose e enzimas de função hepática em ratos	210
<b>Tabela 10-</b>	Efeito do etanol (14 dias), haloperidol ou associação de Et+haloperidol sobre os níveis séricos apolipoproteínas em ratos	211
<b>Tabela 11-</b>	Efeito do etanol (14 dias), naltrexona ou associação de Et+naltrexona sobre os níveis séricos de glicose e enzimas de função hepática em ratos	212
<b>Tabela 12-</b>	Efeitos do etanol (14 dias), naltrexona ou associação de Et+naltrexona sobre os níveis séricos de apolipoproteínas e lipoproteína em ratos	213

## LISTA DE QUADROS

### INTRODUÇÃO

<b>Quadro 1-</b>	Concentrações de etanol (mg/dl) no sangue e sinais e sintomas de intoxicação em humanos	08
<b>Quadro 2-</b>	Valores normais em humanos de glicose, lipoproteínas, apolipoproteínas e enzimas hepáticas	12
<b>Quadro 3-</b>	Nomenclatura dos receptores dopaminérgicos	18
<b>Quadro 4-</b>	Drogas usadas no tratamento do alcoolismo	41

### MATERIAIS E MÉTODOS

<b>Quadro 1-</b>	Drogas utilizadas com respectivas doses e vias de administração.	47
------------------	--	----

## LISTA DE ESQUEMAS

### MATERIAIS E MÉTODOS

<b>Esquema 1 -</b>	Drogas utilizadas após a retirada do etanol, conforme protocolo experimental-1	48
<b>Esquema 2-</b>	Drogas utilizadas associadas com etanol, conforme protocolo experimental-2	48

## ABREVIATURAS

(+)7-OH-DPAT: (+)-7-hydroxy-2-aminopropylaminotetralin

(+)PHNO: 9-hydroxy-4-propyl-naphthoxazine

(+)S14297: (+)-7-(N,N-dipropylamino)-5,6,7,8-tetrahydronaphtho(2,3b)diidro-2,3-furane

[<sup>3</sup>H]-SCH 23390- [<sup>3</sup>H]R-(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-penil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina

5-HIAA- ácido-5-hidroxiindolacético

5-HT- serotonina

AA- aminoácidos

ALE- atividade locomotora espontânea

ALT- alanina amino transferase

AMPA- alfa-amino-3-hidroxi-5-metilsoxazole-4-acido propionico

APO- apolipoproteína

ASP- aspartato

AST - aspartato aminotransferase

ATV- área tegmentar ventral

Bmax- densidade máxima de receptores

Ca+- cálcio

CE- corpo estriado

CID- classificação internacional de doenças

COLE-T- colesterol total

DA- dopamina

DAG- diacilglicerol

D-CPPene- 3-(2-carboxipiperazina-4-yl) profenil-1-fosfonato

DOPAC- ácido diidroxifenilacético

GLU- glutamato

GLY- glicina

HDL- *High Density Lipoprotein*

HVA-ácido homovanílico

IDL- *Intermediary Density Lipoprotein*

IP3- trifosfato de inositol

K+- potássio

**Kd**- constante de dissociação

**L741742**: *5-(4-chlorophenyl)-4-methyl-3-(1-[2-phenethyl]piperidin-4-yl)isoxazole*

**L745870**: *3-[[4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine*

**L750667**: *iodinated L745870*

**LDL**- *Low Density Lipoprotein*

**Mg<sup>++</sup>**- magnésio

**Na<sup>+</sup>**- sódio

**NAc**-núcleo acumbente

**NAD**- adenina dinucleotídio

**NDR**- núcleo dorsal da rafe

**NE**- noradrenalina

**NGD941**: *2-phenyl-4(S)-(4-[2-pyrimidinyl]-[piperazin-1-yl]-methyl)-imidazole dimaleate*

**NMDA**- N-metil-D-aspartato

**NMR**- núcleo mediano da rafe

**PCP**- fenciclidina

**PD128907**: *R-(+)-trans-3,4,4 a,10b-tetrahydro-4-propyl-2H,5H-[1]benzopyrano[4,3-b]-1,4-oxazine-9-ol*

**PD168077**: *N-methyl-4-(2-cyanophenyl)piperazinyl-3-methylbenzamide*

**PIP2**- bifosfato de fosfatidilinositol

**PLC**- fosfolipase C

**POE**- peptídios opióides endógenos

**R(+)****SKF38393**: *R(+)-7,8-dihydroxy-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine*

**R(+)****SKF81297**: *R(+)-6-chloro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H benzazepine*

**S33084**: *(3aR,9bS)-N[4-(8-cyano-1,3 a ,4,9b-tetrahydro-3H-benzopyrano[3,4-c]pyrrole-2-yl)-butyl] (4-phenyl ) benzamide*

**SB277011**-*trans-N-(4-[2-{6-cyano-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl}ethyl]cyclohexyl)-4-quinolininecarboxamide*

**SCH23390**: *7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-5-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3 benzazepine*

**SCH23982**: *8-iodo-2,3,4,5-tetrahydro-3-methyl-5-phenyl-1H-3-benzazepine*

**SCH39166:** *(-)-trans-6,7,7 a,8,9,13b-hexahydro-3-chloro-2-hydroxy-N-ethyl-5H-benzo[d]naphtho-(2,b)azepine*

**SKF83566:** *-7-bromo-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-3-benzazepine*

**SNC-** sistema nervoso central

**TGI-** triglicerídeos

**U101958:** *3-isopropoxy-N-methyl-N-(1-[phenylmethyl]-4-piperidinyl)-2pyridinylamine*

**VLDL-** *Very Low Density Lipoprotein*

**Zn<sup>++</sup>-** Zinco

## **RESUMO**

**Efeitos comportamentais, neuroquímicos e bioquímicos do etanol em roedores, na presença e na ausência de antagonistas dopaminérgico, glutamatérgico e opióide. SILVÂNIA MARIA MARIA DE VASCONCELOS. Orientadora: Dra. Glauce Socorro B. Viana. Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2001**

Os objetivos, deste trabalho, foram estudar as alterações comportamentais, neuroquímicas (determinações de receptores dopaminérgicos, níveis de monoaminas e metabólitos e de aminoácidos em corpo estriado) e bioquímicas (glicose, lipoproteínas, apolipoproteínas e transaminases) do etanol sozinho ou associado com drogas antagonistas dos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide. Foram utilizados ratos Wistar (150-230 g) e camundongos Swiss (28-34 g) e dois protocolos experimentais (P1= administração de ketamina, haloperidol, ou naltrexona após pré-tratamento com etanol durante 7 dias ou P2= administração associada dessas drogas com etanol durante 7 dias após pré-tratamento com etanol durante 7 dias). A atividade locomotora espontânea (ALE) foi diminuída somente após administração de etanol em altas doses (4 g/kg, vo). Houve uma tendência à diminuição da ALE na associação ketamina e etanol. O haloperidol após 30 min diminuiu a ALE, efeito este revertido, 48 h após a retirada da droga, e não alterado pela presença do etanol. Naltrexona após 48 h tendeu a diminuir a ALE, efeito este não influenciado pelo etanol, que sozinho, em altas doses, induziu um quadro de incoordenação motora em camundongos nos primeiros dias de tratamento. O tratamento agudo e sub-crônico com etanol em altas doses causou um aumento de dopamina (DA) e ácido diidroxifenilacético (DOPAC). Contudo, efeito inverso foi observado após tratamento de 30 dias. Os níveis de noradrenalina (NE), serotonina (5-HT) e ácido-5-hidroxiindolacético (5-HIAA) também foram alterados na presença do etanol, sendo este efeito dependente da dose, tempo de administração e tempo de retirada do etanol. Ketamina, haloperidol ou naltrexona sozinhos ou associados ao etanol também interferiram com os níveis de DA, DOPAC, ácido homovanílico (HVA), NE, 5-HT e 5-HIAA, sugerindo que essas drogas podem atuar diretamente nesses sistemas ou, indiretamente, através de um processo de modulação. O etanol, após a administração aguda e sub-crônica e em altas doses, causou uma *downregulation* em receptores D1 e D2-símile. Os valores da constante de dissociação (Kd) de receptores D1 e D2-símile foram diminuídos somente no tratamento agudo, após 48 h de retirada. Em animais tratados com haloperidol ou naltrexona, previamente expostos ao etanol, ocorreu uma *upregulation* de receptores D1-símile. Nestes dois protocolos, uma diminuição de Kd foi observada somente após a administração de ketamina, haloperidol ou naltrexona. O etanol também aumentou os níveis de glutamato, indicando um efeito modulador na liberação desse aminoácido. Ketamina, haloperidol e naltrexona sozinhos, ou associados ao etanol, causaram alterações principalmente nos níveis de aspartato e glutamato que variaram segundo o protocolo utilizado. No estudo bioquímico, a administração crônica de etanol induziu um aumento nas concentrações de enzimas hepáticas, triglicerídios (TGI), *High Density Lipoprotein* (HDL) e colesterol total (COLE-T), sem alteração nos níveis de apolipoproteínas (APO) A1. O tratamento com etanol+ketamina aumentou muito os níveis de APO B. O haloperidol sozinho mostrou um efeito cardioprotetor evidenciado pelo aumento de APO A1 e diminuição de APO B e COLE-T. Entretanto, esse efeito diminuiu com exposição prévia ao etanol, evidenciada por aumento de TGI, e desapareceu durante a administração associada com etanol, mostrado pelo aumento de TGI e COLE-T e ausência de efeito na APO-A. A naltrexona sozinha apresentou um

efeito cardioprotetor, evidenciado por um aumento em APO A1 e diminuição de APO B e COLE-T. Esse efeito também foi observado após a exposição prévia ao etanol, evidenciado pelo aumento de APO A1 e diminuição de COLE-T, e durante administração associada com o etanol, mostrada pela diminuição de APO B, TGI e COLE-T. Os resultados no presente estudo mostram que o etanol interfere com vários sistemas de neurotransmissores e que as drogas antagonistas glutamatérgica, dopaminérgica e opióide interferem com o efeito do etanol no corpo estriado de ratos.

## ABSTRACT

**Behavioral, neurochemical and biochemical effects of ethanol in rodents in the presence and absence of dopaminergic, glutamatergic and opioid antagonists. SILVÂNIA MARIA MARIA DE VASCONCELOS. Supervisor: Dr. Glauce Socorro B. Viana. Doctorate's thesis. Graduation course in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2001**

In the present work, behavioral, neurochemical (determination of monoamines and metabolites, as well as, aminoacids levels in striatum) and biochemical (glucose, transaminases, lipoproteins and apoproteins) alterations produced by ethanol alone and in association with glutamatergic, dopaminergic and opioid antagonists were studied. Male Wistar rats (150-230 g) and Swiss mice (28-34 g) in two experimental protocols were used (P1= ketamine, haloperidol or naltrexone administration to ethanol pre-treated animals; P2= Association of ethanol and antagonist). The results demonstrated that the spontaneous locomotor activity (SLA) was decreased only after ethanol administration at high doses. There was a tendency to decrease SLA in the association of ketamine + ethanol after 30 min and 48 h withdrawal. Haloperidol decreased SLA only 30 min after administration, this effect was reverted 48 h after drug withdrawal, and was not altered in the presence of ethanol. Naltrexone tended to decrease SLA after 48 h, this effect was not influenced by ethanol, which alone, at high doses induced motor incoordination in mice in the first days of treatment. The acute and subchronic treatment with ethanol at high doses caused an increase in dopamine (DA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic (DOPAC) levels. However, an inverse effect was observed after 30 days treatment. Levels of norepinephrine (NE), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and 5-dihydroxyindolacet (5-HIAA) were also altered in the presence of ethanol and this effect was dependent on the dose, time of administration and time of withdrawal. Ketamine, haloperidol or naltrexone alone or in association with ethanol also interfered with DA, DOPAC, homovanillic acid (HVA), NE, 5-HT and 5-HIAA levels, suggesting that these drugs may act directly in these systems or, indirectly, through a modulation process. Ethanol, after acute and subchronic administration, in high doses, caused a downregulation of D1- and D2-like receptors. Kd values for D1 and D2-like receptors were decreased only in the acute treatment after 48 h withdrawal. In animals treated with haloperidol or naltrexone, and previously exposed to ethanol. In these two protocols a decrease in Kd value was observed only after administration of ketamine, haloperidol or naltrexone. Ethanol also increased glutamate levels, indicating a modulatory effect in the release of this aminoacid. Ketamine, haloperidol and naltrexone alone, or in association with ethanol, caused alterations mainly in the levels of aspartate and glutamate which were dependent to the protocol used. In the biochemical study, chronic administration of ethanol induced an increase in the concentration of enzymes related to hepatic function, triglycerides (TGI), High Density Lipoprotein (HDL) and total cholesterol (T- CHOLE) levels, without alterations in the apolipoproteins (APO A1) levels. The treatment with ethanol + ketamine increased APO B levels. Haloperidol alone showed a cardioprotector effect evidenced by the increase of APO A1 and decrease of APO B and T-CHOLE levels. However, this effect decreased with previous exposure to ethanol (detected by an increase in TGI), and disappeared in the association of haloperidol with ethanol (detected by the increase of TGI and T-CHOLE and the absence of effect on APO A1). Naltrexone alone presented a cardioprotector effect evidenced by an increase in APO A1 and decrease of APO B and T-CHOLE levels. This effect was also observed after previous exposure to ethanol, increase of APO A1 and decrease of T-CHOLE levels, and in the association of

naltrexone with ethanol, showed by a decrease of APO B, TGI and T-CHOLE levels. The results in the present work showed that ethanol interferes with many neurotransmitters and that glutamatergic, dopaminergic and opioid antagonists interfere with ethanol's effects in rat striatum.

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1- O Álcool e o alcoolismo

As bebidas alcoólicas são consumidas pelo homem desde o início da história humana, com os primeiros relatos datados de cerca de 6000 anos atrás, no antigo Egito e Babilônia (Vaillant, 1999). A cana-de-açúcar é o elemento básico para a obtenção, através da fermentação, de vários tipos de álcool, entre eles o álcool etílico. É uma planta pertencente à família das gramíneas (*Saccharum officinarum*) originária da Ásia, onde teve registrado seu cultivo desde os tempos mais remotos da História. As bebidas alcoólicas mais antigas eram fermentadas (os primeiros relatos sobre a fermentação vêm dos egípcios antigos) e de baixo teor alcoólico (Almeida, 2001).

Na Idade Média, os árabes introduziram a técnica de destilação para aumentar a concentração de álcool nas bebidas. Acreditava-se que o álcool era um elixir da vida, um remédio para quase todas as doenças. Curavam várias moléstias, inalando vapor de líquidos aromatizados e fermentados, absorvidos diretamente do bico de uma chaleira, em um ambiente fechado. O próprio nome já denota como pode ser percebido pela origem galênica do termo *Whisky* que significa “água da vida”. Os Gregos registraram o processo de obtenção da *ácqua ardens*, a água que pega fogo- água ardente (Larini & Salgado, 1997).

O uso abusivo de derivados do álcool etílico (ou etanol) é hoje reconhecido pela Organização Mundial de Saúde como uma doença que tem tratamento médico. O quadro de alcoolismo configura-se quando a ingestão de derivados etílicos deixa de ser um hábito social e passa a ser um vício, a ter caráter de obrigatoriedade (Vaillant, 1999).

Quando o vício (chamado de dependência) se instala, o álcool desencadeia uma compulsão à qual o indivíduo se submete passivamente. Ele tende a consumir quantidades cada vez maiores da droga. Aos poucos a droga domina toda a vontade do indivíduo, afeta a sua lucidez e a sua capacidade crítica. A bebida torna-se indispensável para o bem estar pessoal. Os hábitos de vida passam a girar em torno da droga e a pessoa perde o interesse por outras atividades diárias (trabalho, casa, lazer).

Na maioria dos casos, a pessoa afetada não tem consciência da perda do controle sobre sua vida e só irá admitir que precisa de tratamento depois que o vício adquiriu proporções gigantescas, gerando falhas de desempenho em todos os níveis: orgânicos, afetivo, familiar, cognitivo, sexual, comportamental, laborativo, social, etc. (Alcoolismo, 2001).

Segundo a literatura o alcoolismo atinge a vida de 3 a 10% de todos os americanos. Nos Estados Unidos, é responsável por 25% das internações em hospitais gerais e constitui uma das quatro causas mais comuns de morte masculina na faixa etária entre 20 e 40 anos, quais sejam: suicídio, acidentes, homicídios e cirrose hepática. O dano que ele causa não recai somente sobre os alcoolistas, mas também sobre seus familiares e amigos; e suas conseqüências maléficas atinge uma em cada três famílias americanas (Vaillant, 1999).

No Brasil, os índices demonstram que uma em cada dez pessoas tenha problemas conseqüentes ao uso indevido de álcool (Larini & Salgado, 1997). Estima-se que cerca de 10% das mulheres e 20% dos homens façam uso abusivo do álcool e 5% das mulheres e 10% dos homens apresentem a síndrome de dependência do álcool. Em um estudo realizado no estado de São Paulo para avaliar o perfil do uso de drogas de abuso, o álcool e o tabaco foram as drogas com maiores prevalências de uso, com percentuais de 53,2 e 39%, respectivamente. Quanto às estimativas de dependência de álcool as percentagens estiveram em torno de 6%, valores próximos aos observados em estudos em outros países (CEBRID, 2000).

O álcool é o grande responsável, com mais de 80-85%, de todas as internações em hospitais e clínicas psiquiátricas no Brasil (CEBRID, 2000). Está relacionado a 50% dos casos de morte em acidentes automobilísticos, 50% dos homicídios e 25% dos suicídios (Leite, 2001).

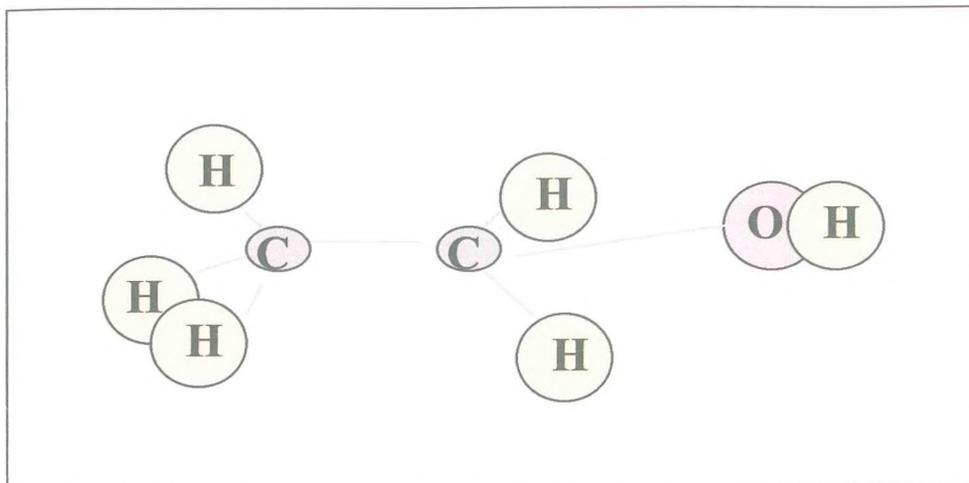
Estudos feitos com pessoas envolvidas em acidentes automobilísticos, mostram que mais de 80% eram alcoólatras ou consumiam quantidades excessivas de bebidas alcoólicas (Leite, 2001). Um motorista embriagado, mesmo que se sinta lúcido, terá seus reflexos psicomotores desorganizados, por isso é um suicida e um criminoso em potencial, ainda que involuntário. No Brasil, as leis de trânsito (resolução 467 de 1974)

consideram dirigir em estado de embriaguez, quando o nível de álcool no sangue (alcoolemia) for igual ou superior a 0,8 g/l ou o nível de ar exalado (no bafômetro) for 0,00038 g/l (Calil, 2001).

## 2- Aspectos Farmacocinéticos do álcool

O álcool etílico (**Figura 1**) é ingerido por via oral, onde é rapidamente absorvido no estômago (20%), no intestino delgado (75%) e no cólon (5%). O álcool em vapor pode ser absorvido pelos pulmões. Também pode ser absorvido por via subcutânea em menor escala (Ritchie 1987). Após a absorção, o álcool etílico distribui-se uniformemente por todos os tecidos e líquidos corporais. Na maioria dos indivíduos, o pico de concentração sanguínea máxima dá-se entre 30 e 90 minutos (Oliveira & Pereira, 1994). Em um homem de 70 kg que consome 31 g de etanol, terá em torno de 0,01% de álcool no sangue após 30 min. Se essa ingestão aumentar para 186 g, pico máximo de álcool no sangue (0,11%), também será alcançado entre 30 e 60 min (Alcohol alert, 1997).

O álcool rapidamente é distribuído em todos os compartimentos aquosos do organismo, sua concentração sendo diretamente proporcional ao conteúdo de água. Não há membranas impermeáveis a sua passagem e a sua concentração sanguínea reflete a de todo o organismo. Atinge o SNC, devido ao amplo suprimento sanguíneo para essa região. A placenta também é permeável ao álcool; assim o álcool tem livre acesso à circulação fetal (Oliveira & Pereira, 1994; Rang et al., 2001).



**Figura 1-** Estrutura molecular do álcool etílico

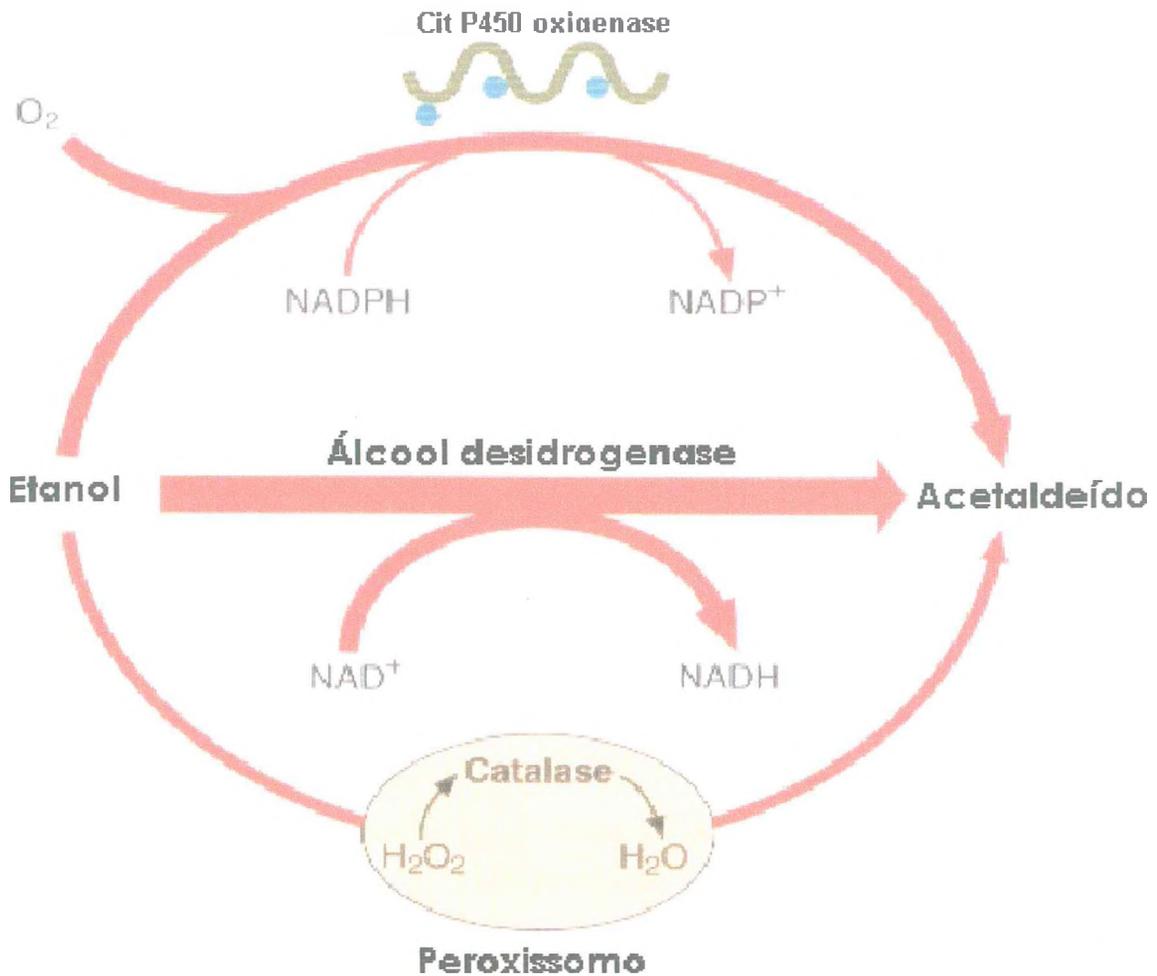
Após a sua absorção, mais de 90% do etanol é metabolizado no fígado e uma pequena fração é eliminada sem alterações pelos pulmões e rins. O metabolismo hepático do etanol difere da maioria das substâncias, pois exibe uma cinética de saturação com concentrações muito baixas de etanol, de modo que a fração de etanol removida do sangue vai gradativamente diminuindo à medida que aumenta a concentração de etanol. Outro fator relevante é absorção, pois quando a absorção de etanol é rápida, a concentração sanguínea se eleva, e quando a absorção é muito lenta, uma maior parte é removida pelo metabolismo de primeira passagem. Portanto, a ingestão de etanol com o estômago vazio produz efeito farmacológico bem maior (Lieber, 1994).

O metabolismo do etanol ocorre quase que totalmente no fígado. A principal via ocorre por processo de oxidações sucessivas. A oxidação inicial do álcool causa a formação de acetaldeído pela ação da enzima álcool desidrogenase (**Figura 2**). O acetaldeído é convertido em acetil-CoA, que é então oxidado através do ciclo do ácido cítrico, ou utilizado em várias reações anabólicas que participam da síntese do colesterol, ácido graxos e outros constituintes teciduais (Ritchie 1987).

O acetaldeído, o metabólito intermediário do etanol, é um composto reativo e tóxico, podendo contribuir para a hepatotoxicidade. Ocorre também um pequeno grau de esterificação do etanol com vários ácidos graxos nos tecidos, podendo estes

contribuir também para a toxicidade a longo prazo (Lieber, 2000). A álcool desidrogenase é uma enzima citoplasmática solúvel, que contém zinco e é restrita principalmente aos hepatócitos, que oxida o etanol e, ao mesmo tempo, reduz a adenina dinucleotídeo (NAD) a NADH. O metabolismo do etanol resulta em queda do NAD, levando conseqüências metabólicas, tais como o aumento da produção de lactato e redução da velocidade do ciclo de Krebs. A disponibilidade do NAD limita a taxa de oxidação do etanol a cerca de 10 ml/hora no adulto normal, independentemente da concentração de etanol. Se baixas doses de etanol forem administradas, o NAD não ficará saturado. De modo diferente, altas doses administradas saturarão o NAD, e assim níveis sanguíneos mais elevados de etanol serão detectados (Lieber, 1994; Lieber, 1997; Lieber 2000).

Outras duas vias estão também implicadas no metabolismo do álcool, a saber: “sistema de oxidação microssomal do etanol” e “sistema de catalase binária” associadas aos peroxissomas, ambas de importância secundária. A metabolização do etanol pelas oxidases microssomais de função mista, que ocorrem no retículo endoplasmático liso do fígado, é pequena. Todavia, esse sistema metaboliza quantidades maiores quando a concentração de etanol aumenta, especialmente em indivíduos que consomem álcool regularmente. Uma forma induzida pelo etanol do sistema citocromo P450 foi descoberta, e denominada 2E1. Esse sistema de oxidação mista é induzido pelo consumo crônico de etanol. A indução da 2E1 contribui para a tolerância metabólica que se desenvolve com o etanol nos alcoólatras e outras drogas que são substratos microssomais. A tolerância do álcool a várias drogas psicoativas é geralmente atribuída a uma adaptação do SNC, mas a adaptação metabólica agora é considerada, pois o *clearance* de muitas drogas no sangue é aumentado nos alcoólatras (Lieber, 2000; Leo et al., 1992).



Fonte: Gaw et al., 1995

**Figura 2-** Vias de metabolização do etanol

### 3-Toxicidade do álcool

Uma dose de aproximadamente 1ml/kg de etanol (92 a 99%) geralmente resulta em níveis no sangue de 100 a 120 mg/dl. Uma concentração no sangue entre 120 a 300 mg/dl já determina o aparecimento de sinais e sintomas resultantes da toxicidade do etanol (De Cicco, 2000).

O **quadro 1** mostra as concentrações sanguínea de etanol e os sinais e sintomas de intoxicação observados em humanos. Clinicamente, a intoxicação é caracterizada por comportamento mal-adaptativo após recente ingestão de álcool, cujos sinais mais marcantes são: ataxia, nistagmo, fala pastosa ou indistinta, rubor facial, irritabilidade e

atenção prejudicada. Segundo a Classificação Internacional de Doenças (CID-10), a intoxicação aguda é um fenômeno transitório, cuja intensidade diminui com o tempo e os efeitos desaparecem na ausência de uso posterior de álcool; a recuperação é completa, exceto quando surgem lesões teciduais ou complicações (Larini & Salgado, 1997).

O uso repetido do álcool resulta no desenvolvimento de tolerância, ou seja, redução do efeito farmacológico com a administração repetida da droga, necessitando-se de doses mais elevadas da droga para obtenção do efeito inicial. Segundo O'Brien, (1996) existem cinco tipos de tolerância: inata, adquirida, aguda, reversa e cruzada. Entretanto, o mecanismo pelo qual o etanol provoca tolerância não está bem definido, embora evidências mostrem que os sistemas dopaminérgicos e glutamatérgicos parecem estar envolvidos (Bloom, 1996).

Em humanos alcoólatras, a retirada do etanol é caracterizada por tremores, náuseas, convulsões- indistinguíveis da epilepsia tipo grande mal (Hoffman et al., 1992)- e alucinações, ocorrendo 6-48 h após a última ingestão da droga. *Delirium tremens* é a síndrome mais séria, que envolve profunda confusão, alucinação, e severa instabilidade autonômica que se inicia 48-96 h após ter cessado a ingestão da droga (Victor, 1983). A retirada do etanol é também caracterizada por desejo aumentado pelo álcool ou o comportamento de busca da droga. Esses sintomas são vistos como fisiológicos e psicológicos, e eles podem surgir de diferentes substratos neuronais (Koob et al., 1992).

As reações individuais a um mesmo nível sangüíneo de álcool variam consideravelmente de indivíduo para indivíduo. Alguns fatores que influenciam o efeito do etanol são:

- A quantidade de álcool ingerida (dose);
- Tempo de consumo (agudo ou crônico);
- Peso corporal: Pessoas que pesam mais são menos afetadas por uma mesma quantidade de álcool quando comparado a outra que pesa menos. O álcool é solúvel em água, e pessoas mais pesadas têm mais sangue e água em seus corpos, assim a mesma quantidade de álcool será mais diluída;

- Sexo: As mulheres têm menor proporção de água em seus corpos do que os homens; portanto, elas terão maior conteúdo de álcool no sangue.

**Quadro 1-** Concentrações de etanol (mg/dl) no sangue e sinais e sintomas de intoxicação em humanos.

Conc. Sanguínea (mg/dl)	Sinais e sintomas de intoxicação
20	Desinibição, leve incoordenação motora
100	Diminuição da atenção, alterações das habilidades sensoriais
120	Alteração da personalidade, mudança de comportamento, sem coordenação motora
200	Náuseas, vômitos, confusão mental, andar cambaleante
300	Fala arrastada, diminuição sensorial, distúrbios visuais
400	Hipotermia, hipoglicemia, perda do controle muscular, perda da memória, convulsão
400-700	Inconsciência, diminuição dos reflexos, falência respiratória, morte

Fonte- Larini & Salgado, 1997

### 3.1. Órgãos e sistemas afetados pelo uso do álcool

#### 3.1.1. Sistema Nervoso

O consumo de etanol é responsável por uma série de lesões potencialmente permanentes do sistema nervoso, seja através da toxicidade direta da molécula ou de seus metabólitos, seja pelas deficiências vitamínicas e nutricionais que o uso desta droga acarreta. Entre essas deficiências, ocupa um papel de destaque a tiamina (vitamina B1), responsável pelas lesões do fórnix e dos corpos mamilares, além de outras regiões do tronco cerebral, cerebelo e do sistema límbico, promovendo o aparecimento da “encefalopatia de Wernicke” e da “psicose de Korsakoff” (Ritchie, 1987).

A polineuropatia é a complicação neurológica mais freqüente do alcoolismo crônico, decorrente de deficiência vitamínica e da ação direta do álcool. A polineuropatia pode ser inicialmente assintomática ou oligossintomática, com diagnóstico baseado no exame físico, e restrita aos membros inferiores (Oliveira & Pereira, 1994).

### **3.1.2. Sistema Cardiovascular**

O uso crônico do etanol pode causar miocardiopatia, distúrbios da condução e do ritmo cardíaco nos alcoólatras crônicos (Preedy et al., 1996; Oliveira & Pereira, 1994). Segundo Rubin & Urbano-Marquez (1994), o músculo cardíaco sofre danos celulares com o uso prolongado do etanol e esse efeito parece ser a causa mais importante de miocardiopatia. A doença do músculo cardíaco induzida pelo álcool é caracterizada por cardiomegalia, dilatação do ventrículo esquerdo e hipocontratilidade ventricular. Existem alterações patológicas no tecido ventricular com presença de disritmias (incluindo taquicardia, extra-sístoles ou fibrilação atrial) (Richardson & Wodak, 1986; Preedy, 1996).

### **3.1.3. Trato gastrointestinal**

O álcool age como um irritante e aumenta a quantidade de ácido hidrocloreídrico que é secretado pelo estômago. Em quantidades excessivas ele prejudica a absorção de vitaminas e sais minerais. O álcool pode provocar gastrite erosiva, lesões do esôfago e do duodeno (Oliveira & Pereira, 1994).

### **3.1.4. Fígado**

O álcool aumenta a velocidade com que pedaços isolados de fígado sintetizam gorduras. Ele também mobiliza gordura a partir de tecidos periféricos. A gordura acumula-se no fígado após a ingestão de doses relativamente baixas de álcool. O álcool inibe a secreção de proteínas a partir de células hepáticas e seu uso prolongado resulta em acúmulo de proteínas (Baraona e Lieber, 1982; Lieber, 2001). O acúmulo prolongado de gorduras e proteínas no fígado pode desencadear a cirrose característica observada em muitos alcoólatras (Lieber, 2000).

A esteatose é a lesão mais encontrada; parece não progredir para estágios mais avançados. Já a hepatite alcoólica constitui quadro mais severo, podendo progredir para cirrose. A cirrose hepática alcoólica ocorre em 15-30% dos alcoólatras crônicos (Oliveira & Pereira, 1994).

### **3.1.5. Sistema hematopoiético**

No sistema sangüíneo, pode haver envolvimento das séries vermelha e branca, bem como das plaquetas. A macrocitose pode ser achado único independente da existência de anemia. Entretanto, a anemia é um achado comum, sendo a mais freqüente a anemia megaloblástica e, em seguida, a sideroblástica. O envolvimento da série branca compromete a imunidade do alcoolista, havendo facilitação de infecções por alterações das funções dos macrófagos.

A diminuição do número de plaquetas é outro achado comum em casos de intoxicação alcoólica aguda, sendo reversível até duas semanas após a interrupção do consumo, na ausência de doença hepática. Além da diminuição do número das plaquetas, ocorre alteração da função, o que favorece fenômenos hemorrágicos (Hobbs et al., 1996).

### **3.1.6. Sistema endócrino**

O álcool pode provocar uma redução dos níveis de testosterona. A impotência e a perda do libido são freqüentemente relatados pelos alcoolistas. O hipogonadismo secundário ao álcool provoca impotência, atrofia testicular e diminuição do crescimento dos pêlos. Observam-se também hiperestrogenismo, com ginecomastia e distribuição feminina do tecido adiposo no homem.

## **4. Ações do álcool nas lipoproteínas, apolipoproteínas e enzimas de função hepática**

As lipoproteínas plasmáticas são estruturas globulares compostas por lipídios (triglicerídios e ésteres de colesterol) envolvidos por uma camada de proteínas,

colesterol livre e fosfolipídios (Mahley et al., 1984). As lipoproteínas são usualmente classificadas de acordo com a sua densidade, a qual é determinada de acordo com a quantidade seus constituintes (proteínas, fosfolipídios, colesterol, triglicerídios, éster de colesterol e apolipoproteínas) (Mahley, 1985). Dessa forma, classificam-se em: VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), IDL (*Intermediary Density Lipoprotein*), LDL (*Low Density Lipoprotein*) e HDL (*High Density Lipoprotein*).

As partículas de HDL, sintetizadas no fígado e no intestino, participam do transporte reverso de colesterol, isto é, da remoção do colesterol das células de tecidos periféricos para a circulação e, posteriormente, para o fígado, sítio de metabolização do colesterol (Gaw et al, 1995). Já o LDL, constitui o maior reservatório de colesterol no plasma humano, representando 60% a 70% do colesterol plasmático total (Eisenberg, 1984) e no homem possui uma meia-vida plasmática de 36 h.

A distribuição dos lipídios para células específicas envolve o reconhecimento de apolipoproteínas (APO) por receptores específicos. A APO A1 circula no plasma primariamente como um componente da HDL e está diretamente implicada no transporte reverso do colesterol (Mahley, 1982). Outra APO importante é a APO B, uma apolipoproteína primária dos quilomícrons, VLDL, IDL e LDL. Existe sob duas formas distintas: APO B-100 e APO B-48. A APO B-100 interage com a heparina e outras moléculas de glicosaminoglicanos sulfatados, o que leva a evidência de que essa apolipoproteína participa no processo de aterosclerose (Hollander, 1976; Srinivasan et al, 1981). Estudos imunoquímicos apontam a presença da APO B-100 em paredes de artérias (Hoff et al, 1983) e muitas lipoproteínas semelhantes a LDL têm sido extraídas de placas fibro-gordurosas da aorta humana (Hoff & Galbatz, 1982).

Vários estudos mostram nítida correlação entre a ingestão crônica de pequenas quantidades de etanol e a incidência de doenças coronarianas (Jackson & Beaglehole, 1993). Esse efeito protetor parece ocorrer porque o etanol aumenta a concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e diminui a de baixa densidade no plasma (Hartung et al., 1983). Aparentemente, quanto menor a concentração de HDL no plasma, maior é o risco de doenças coronarianas.

Outra alteração importante que o etanol causa em alcoólatras crônicos é a alteração das enzimas transaminases ou aminotransferases. Essas enzimas têm sido utilizadas como diagnóstico indicativo de dano hepatocelular. A aspartato aminotransferase (AST) está presente em vários órgãos além do fígado, enquanto a alanina amino transferase (ALT) está presente principalmente no fígado. A AST está presente no citoplasma e nas mitocôndrias dos hepatócitos, enquanto a ALT é citoplasmática. Essa diferença tem ajudado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em doenças hepatocelulares leves, a forma enzimática predominante no soro é a citoplasmática; enquanto que em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT. A relação AST/ALT freqüentemente é menor que 1 em pacientes com dano hepatocelular agudo. Por outro lado, essa relação é alta em doença alcóolica de origem hepática. A elevação crônica dessas enzimas em pacientes assintomáticos podem ser decorrentes do uso de álcool (Cotran et al., 2000).

Os valores de referências em humanos de glicose, lipoproteínas, apolipoproteínas e enzimas de função hepática foram descritas no **quadro 2**.

**Quadro-2** Valores normais em humanos de glicose, lipoproteínas, apolipoproteínas e enzimas hepáticas

Dosagem	Valores normais
Glicose	70-110 mg/dl
HDL	> 35 mg/dl
Triglicerídios	< 250 mg/dl
Colesterol Total	< 200 mg/dl
APO A1	110-210 mg/dl
APO B	60-155 mg/dl
ALT/AST	5-40 U/L

Fonte: Motta, 1989

## 5-Ações do álcool sobre sistemas de neurotransmissores

### 5.1. Sistema Dopaminérgico

A dopamina (DA) é um neurotransmissor do SNC e recebe uma atenção especial porque vários estudos mostram que o álcool estimula a ativação de um subgrupo de neurônios que liberam dopamina e, assim, intensificam a transmissão mediada por DA em uma área cerebral chamada de núcleo acumbente (NAc, *nucleus accumbens*) (Di Chiara and Imperato 1985; Gessa et al., 1985). Essas observações estimularam muitos estudos do papel da DA no abuso e na dependência do álcool, e consequentemente intensificaram a descoberta de novos fármacos para o tratamento do alcoolismo (Di Chiara, 1997).

#### 5.1.1. Produção e distribuição de DA no encéfalo

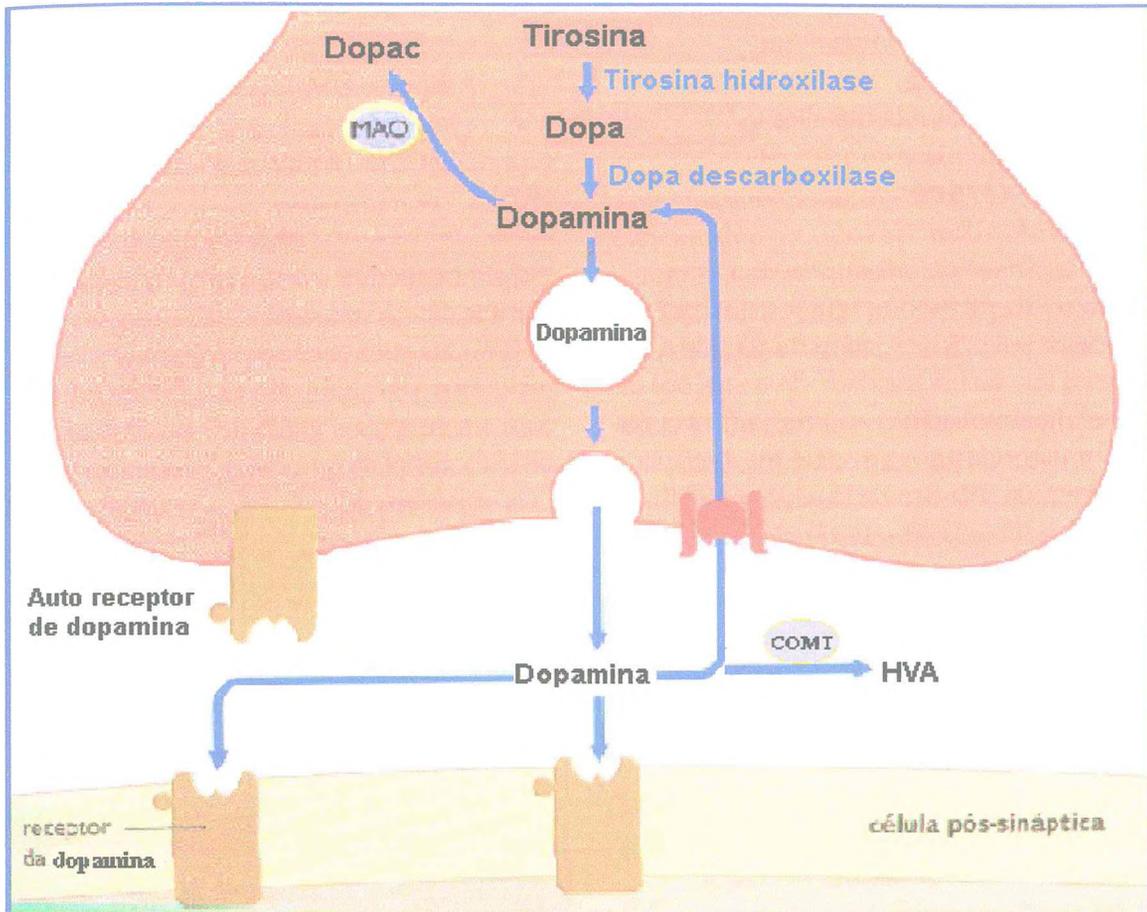
Em 1958, Arvid Carlsson identificou a dopamina como um neurotransmissor independente. Cinco anos depois, foi descoberto que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos era a base etiológica da doença de Parkinson e que este neurotransmissor estava envolvido no modo de ação das drogas antipsicóticas (Grace, 1993). A partir daí, o sistema dopaminérgico foi amplamente estudado para melhor entender este sistema neuroquímico tão importante e contudo tão complexo.

Neurônios dopaminérgicos produzem DA a partir de um aminoácido encontrado na dieta, a tirosina. A tirosina é transportada para dentro do neurônio dopaminérgico onde posteriormente sofre ação enzimática (Cooper et al., 1991). As enzimas que catalizam esta síntese são produzidas e estocadas no corpo celular dos neurônios. A tirosina hidroxilase (TH) é a primeira enzima atuante na síntese de DA. Essa enzima é inibida pelo produto final da via de biossíntese, a DA, constituindo o mecanismo de regulação contínua da velocidade de síntese (etapa limitante). É encontrada no citoplasma e cataliza a conversão da tirosina para o aminoácido l-Dopa (1-3,4-diidroxifenilalanina) que sofre a ação rápida de outra enzima a dopa descarboxilase produzindo a DA (**Figura 3**) (Rang et al., 2001).

Após ser sintetizada, a DA é estocada em neurônios dopaminérgicos dentro de grânulos secretórios, para ser posteriormente liberada do terminal nervoso, durante um potencial de ação, através de processo cálcio-dependente. Quando liberada na fenda sináptica, ela pode combinar-se com receptores pré-sinápticos e modular a sua própria liberação, através de um mecanismo de feedback-negativo. Ainda na fenda sináptica, a DA pode sofrer um processo de recaptação, através de sua ligação com uma proteína acoplada à membrana pré-sináptica, ou pode ligar-se aos seus receptores pós-sinápticos (Conn, 1994).

A degradação metabólica da DA é feita no SNC principalmente por duas enzimas: a monoamina oxidase (MAO) e a catecol-O-metil transferase (COMT). A MAO existe em duas formas moleculares semelhantes, codificadas por genes separados (MAO- tipo A e tipo B). A MAO-A possui preferência de substrato para a serotonina. A MAO-B possui preferência de substrato para a feniletilamina. Ambas as isoformas atuam sobre a dopamina. Assim, a degradação da dopamina é feita pela MAO que converte a DA em DOPAC (ácido 3,4 dihidroxifenilacético) a nível neuronal e pela COMT (catecol-O-metil transferase) que converte DA em HVA (ácido homovanílico) dentro do terminal sináptico (Rang et al., 2001). O HVA é o principal produto do metabolismo da DA nos seres humanos, enquanto DOPAC é o principal em roedores (Cooper et al., 1991).

A dopamina está presente na maioria das regiões do SNC, originando-se de longos axônios que partem da substância negra e área tegmentar ventral e inervam os núcleos da base, partes do sistema límbico e o córtex frontal (Conn et al., 1994).

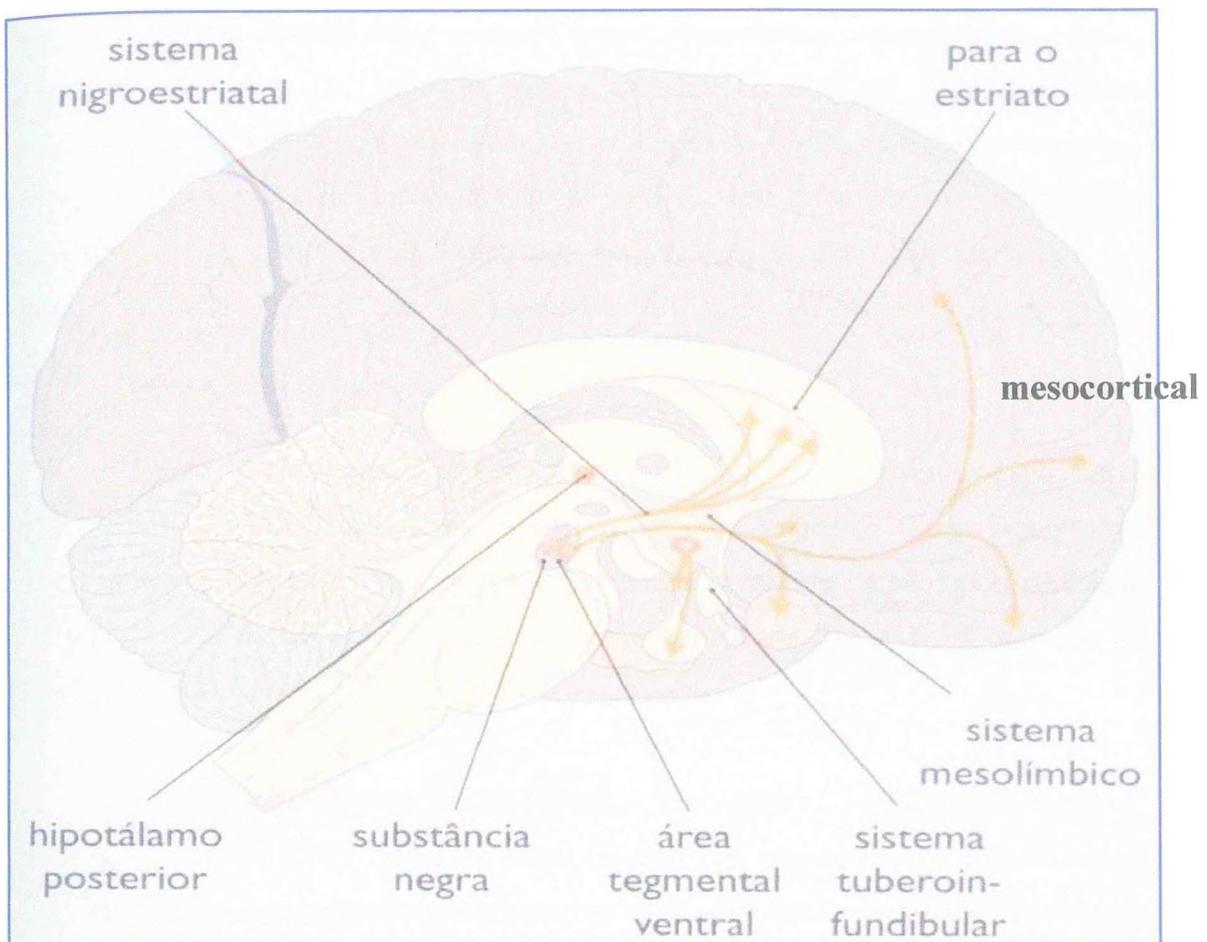


Fonte: Page et al., 1999

**Figura 3-** Síntese, liberação e inativação da dopamina

O sistema dopaminérgico compreende três vias neuronais principais: nigroestriatal, mesocorticolímbica e tuberoinfundibular. A via nigroestriatal, responsável por 75% da dopamina cerebral é constituída por neurônios que se projetam da substância negra para o corpo estriado. Esta via tem importante papel no controle da locomoção. A via dopaminérgica mesocorticolímbica é composta de neurônios da área tegmentar ventral que se conectam com regiões do sistema límbico, principalmente o NAc. Está envolvida na estabilidade emocional. A via tuberoinfundibular origina-se de neurônios que partem do hipotálamo para hipófise. A dopamina secretada por estes neurônios é transportada para a hipófise onde regula a secreção de prolactina. Esta via influencia a lactação e a fertilidade (Civelli et al., 1993).

Uma representação das vias dopaminérgicas no SNC está demonstrada na **Figura 4**.



Fonte: Page et al., 1999

**Figura 4-** Distribuição das vias dopaminérgicas no SNC

### 5.1.2 – Ação da DA na célula

A dopamina exerce seus efeitos biológicos através de interação com receptores específicos. Em 1979, Keibabian & Calne mostraram que a dopamina exercia seus efeitos através de sua ligação com dois receptores específicos, chamados D1 e D2, os quais apresentavam diferenças farmacológicas e biológicas, bem como distribuição anatômica diferente.

As diferenças farmacológicas baseavam-se no fato de que enquanto o receptor D1 se ligava a uma benzazepina, o antagonista seletivo SCH 23390, o receptor D2 se ligava com alta afinidade a butirofenonas, como espiroperidol e haloperidol. Estes dois receptores também exerciam seus efeitos através de ações biológicas diferentes,

acoplando-se e ativando diferentes complexos de proteínas G. O receptor D1 interagia com o complexo Gs para ativar a adenililciclase, aumentando a formação de AMPc, enquanto o receptor D2 interagia com a proteína G inibitória (Gi), inibindo a adenililciclase consequentemente inibindo a produção de AMPc. Estes dois receptores apresentam uma alta distribuição anatômica no SNC, mas diferem proporcionalmente em áreas cerebrais específicas. Entretanto, com relação às desordens mentais, estes receptores estão presentes nas vias nigroestriatal e mesocorticolímbica (Rang et al., 2001).

Durante 10 anos, esta classificação em dois subtipos de receptores explicava a maioria das atividades do sistema dopaminérgico. Recentemente foram descobertos novos subtipos, que entretanto, por algum tempo ainda foram refutados pois pareciam representar estados de afinidade diferentes dos receptores D1 e D2 (Andersen et al., 1990; Leff & Creese, 1985).

As atividades biológicas predominantes dos receptores D1 e D2 são a ativação e inibição da adenililciclase, respectivamente (**Quadro 3**). Em células de camundongos transfectadas, foi demonstrado que os receptores D1 e D5 estão relacionados à ativação da adenililciclase, sugerindo vias de indução de segundos mensageiros similares para os receptores D1-símile. Por outro lado, para os receptores D3 e D4 não foi completamente definido se eles ativam sistemas de segundos mensageiros (Civelli, 1995). Contudo, esses receptores D3 e D4 são classificados como ~~fazendo parte~~ da família de D2-símile.

### Quadro 3– Nomenclatura dos receptores dopaminérgicos

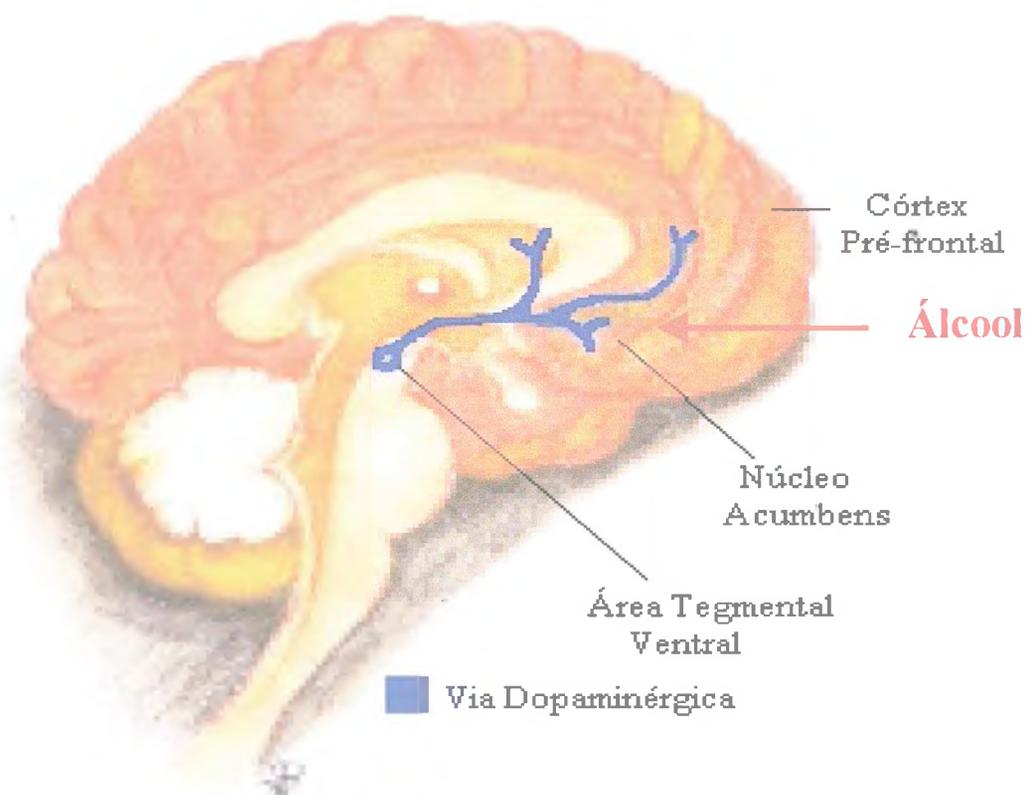
Subtipos de receptores	Outros nomes	Agonistas Seletivos	Antagonistas Seletivos
D1	D1, D1A	SKF 38396 SKF81297 Dihidrexedine	SCH 23390 SKF83566 SCH39166
D2	D2	(+) PHNO	Raclopride
D3	D3	PD128907	S33084 (9.6) Nafadotride S14297(8.7) SB277011(7.5)
D4	D4	PD168077	L745870(9.3) U101958(8.9) L741742(8.5)
D5	D5, D1B	-	-

Fonte: Civelli, 1995; Alexander et al, 2001

Radioligantes	Gene/Cromossomo	Acoplados
[ <sup>3</sup> H]SCH23390 [ <sup>3</sup> H]SCH23982	DRD1 / 5q35.1	Proteína G s
[ <sup>3</sup> H]Raclopride [ <sup>3</sup> H]Espioperidol	DRD2 / 11q22-23	Proteína G i/o
[ <sup>3</sup> H]7-OH-DPAT [ <sup>3</sup> H]PD128907	DRD3 / 3q13.3	Proteína G i/o
[ <sup>3</sup> H]NGD941 [ <sup>125</sup> I]L750667	DRD4 / 11q15.5	Proteína G i/o
-	DRD5 / 4p15.1- 16.1	Proteína G s

### 5.1.3. O Álcool e o Sistema Dopaminérgico

Os neurônios dopaminérgicos, que passam informação ao NAc, são extremamente sensíveis ao álcool (**Figura 5**). O álcool administrado, mesmo em baixas concentrações no sangue, aumenta a liberação de dopamina no NAc (Lyness & Smith, 1992). Por via oral, em altas concentrações, o álcool produz efeito semelhante. Efeito similar ao álcool na liberação de dopamina é também evidenciado por outras drogas de abuso (Weiss et al., 1996).



Fonte: Cláudia-da-Silva & Amaral, 1999.

**Figura 5-** Neurônios dopaminérgicos no núcleo acumbente sensíveis ao álcool.

A estimulação induzida pelo álcool na liberação de dopamina no NAc pode requerer a atividade de outra categoria de neuromoduladores e peptídeos opióides endógenos. Esta hipótese é baseada por observações que compostos, que inibem as ações dos peptídeos opióides endógenos, previnem os efeitos do álcool na liberação de dopamina. Antagonistas de peptídeos opióides agem primariamente em uma área cerebral onde os neurônios dopaminérgicos se estendem até a origem no NAc. Estas

observações indicam que o álcool estimula a atividade dos peptídeos opióides endógenos, levando indiretamente à ativação dos neurônios dopaminérgicos. Antagonistas dos peptídeos opióides poderiam interferir com este processo, portanto reduzindo a liberação de dopamina (Bienkowski et al, 1999).

Embora numerosos estudos tenham tentado elucidar o papel da dopamina no reforço do álcool por manipulação da transmissão dopaminérgica, estas investigações não permitem conclusões definitivas. A comparação dos efeitos do álcool com os efeitos de substâncias comuns que produzem reforço, tais como alimentação, entretanto, dá algumas pistas para o papel da dopamina mediando o reforço do álcool (Di Chiara, 1995).

Os alimentos saborosos ativam a transmissão dopaminérgica no NAc, por exercerem estímulo sensorial específico (gustativo). O álcool administrado, por via oral, similarmente ativa os receptores gustativos, aumentando a liberação de dopamina no NAc. Em contraste com os alimentos, o álcool também modifica a função dos neurônios dopaminérgicos diretamente, por entrar no cérebro; portanto com ação direta, como uma droga de reforço (Di Chiara, 1997).

A liberação de dopamina no NAc pode ser o fator preponderante para o desenvolvimento da dependência do álcool. A dependência psicológica do álcool desenvolve-se porque o estímulo, relacionado ao álcool, adquire excessivas propriedades motivacionais, que induzem um intenso desejo para consumir bebidas contendo álcool (*craving*). Como resultado desse intenso desejo, estímulos que causam reforço, tais como alimentação, sexo, convívio família ou trabalho, perdem seu significado e tem somente um impacto reduzido no comportamento do alcoólatra (Schulz, 1998).

Um mecanismo que pode ser responsável para o significado anormal, associado com os incentivos relacionados ao álcool, é a natureza não adaptativa da estimulação induzida pelo álcool da transmissão dopaminérgica no NAc. A liberação aumentada de dopamina no NAc induzida por reforçadores comuns (comida) rapidamente induz habituação, e a apresentação repetida do estímulo não mais induz a liberação de dopamina. Em contraste, nenhuma habituação ocorre após o consumo repetido do

álcool. Como resultado da persistente liberação de dopamina no NAc em resposta ao álcool, o estímulo associado ao álcool adquire um significado emocional e motivacional anormais que resultam no controle excessivo sobre o comportamento do alcoólatra. Esse controle excessivo constitui a essência da adição (vício) (Di Chiara, 1997).

## **5.2. Sistema Serotonérgico**

A serotonina é um neurotransmissor do SNC que está relacionada com inúmeras funções, tais como: aprendizado, memória, analgesia, ansiedade, estado motivacional, resposta ao álcool e outras drogas de abuso (Stahl, 1998).

A serotonina tem sido implicada na etiologia de muitas doenças e pode ser particularmente importante na doença mental, como a depressão, ansiedade, esquizofrenia, distúrbios alimentares, desordens obsessivo-compulsivas e desordens do pânico. O tratamento utilizado nestas desordens é feito através da modulação do tônus serotonérgico. Durante a última década, múltiplos subtipos de receptores serotonérgicos foram caracterizados. Isto tem levado a realização de muitos tratamentos atuando via sistema serotonérgico, tais como os inibidores seletivos da recaptção da serotonina, os antidepressivos, os quais aumentam a função serotonérgica pré-sináptica (Kennet, 2000).

### **5.2.1. Produção e distribuição da Serotonina no cérebro**

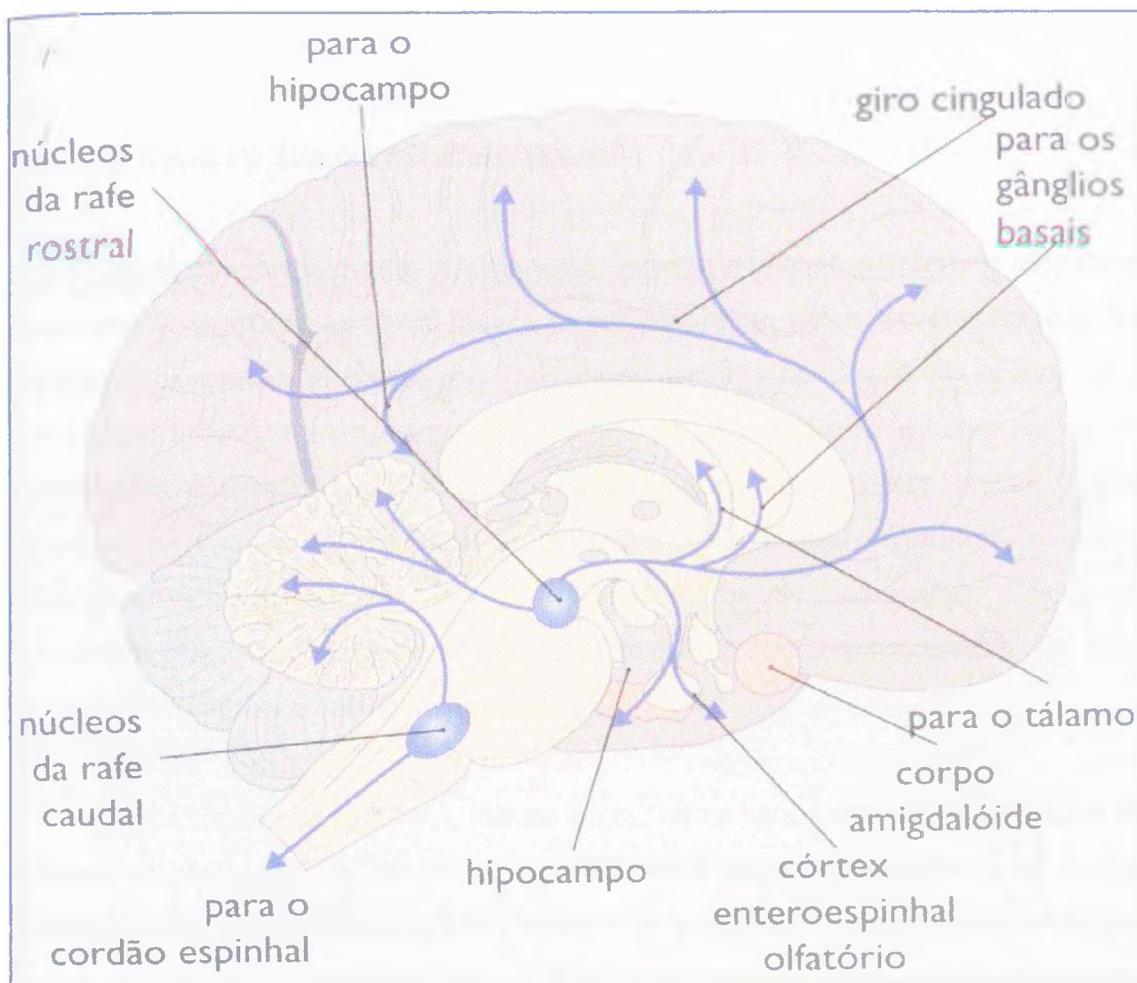
A serotonina é produzida a partir do aminoácido essencial triptofano. É liberada nos neurônios que se originam dentro de regiões ou núcleos no cérebro (Cooper et al., 1991). Muitos neurônios serotonérgicos estão localizados na base do cérebro, em uma área conhecida como núcleos da rafe, os quais influenciam as funções cerebrais tais como a atenção, emoção e motivação. Os axônios dos neurônios dos núcleos da rafe estendem-se ou projetam-se, através de numerosas regiões do cérebro com diversas funções. Essas regiões cerebrais incluem a amígdala, uma área que tem papel importante no controle das emoções e o NAc, uma área cerebral envolvida no controle da motivação para realizar certos comportamentos, incluindo o abuso de álcool e outras drogas (Kupfermann, 2000).

Nestas regiões cerebrais, os axônios terminais dos neurônios serotoninérgicos quando ativados secretam serotonina. O neurotransmissor, então, atravessa a fenda sináptica e liga-se aos receptores. A serotonina ao ligar-se a esses receptores inicia uma série de eventos bioquímicos, que convertem o sinal químico extracelular em um sinal intracelular na célula receptora, ou seja, a interação da serotonina com um tipo de receptor estimula a formação de pequenas moléculas, denominadas de segundos mensageiros da célula. Os segundos mensageiros interagem com outras proteínas para ativar várias funções celulares, tais como mudanças na atividade elétrica celular ou na atividade de certos genes.

Estas mudanças podem resultar tanto na inibição quanto na excitação do neurônio, dependendo da célula afetada. Através deste mecanismo, a serotonina pode influenciar estados de humor; maneiras de pensar; e até mesmo, comportamentos tais como o de beber álcool.

As ações da serotonina nas sinapses, normalmente são reguladas por proteínas chamadas transportadores de serotonina, os quais removem o neurotransmissor da fenda sináptica depois de um curto período transportando-o de volta para dentro da célula emissora do sinal. Conseqüentemente, a serotonina pode afetar neurônios vizinhos somente por um curto período (Lovinger, 1997).

Os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos que se projetam para o mesencéfalo e prosencéfalo situam-se principalmente no núcleo dorsal da rafe (NDR) e no núcleo mediano da rafe do mesencéfalo (NMR) (**Figura 6**). O NDR fica imerso na massa cinzenta do mesencéfalo, que circunda o arqueduto de Sylvius, e o NMR localiza-se mais ventralmente, no tegmento mesencéfálico. As vias serotoninérgicas ascendente ventral e dorsal originam-se nestes núcleos, distribuem fibras para estruturas mesencefálicas (substância cinzenta periaquedutal, substância negra), correm através do diencéfalo, no feixe prosencefálico medial (FPM) e se projetam em estruturas prosencefálicas (hipotálamo, septo-hipocampo, tálamo, amígdala e todo o néocortex) (Törk, 1990; Graeff, 1990).



Fonte: Page et al., 1999

**Figura 6-** Vias serotoninérgicas no SNC

### 5.2.2. Ação da Serotonina na célula

Inicialmente, os subtipos de receptores foram caracterizados e utilizados somente como ferramentas farmacológicas. Com base no perfil de ligação ao receptor, acoplamento ao segundo mensageiro e atividade funcional do ligante, quatro principais subgrupos de receptores serotoninérgicos classificados em 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>4</sub> foram identificados. Mais recentemente, técnicas de biologia molecular têm confirmado esta classificação, e que cada subtipo possui estruturas protéicas relativamente diferentes, e levaram à identificação de novos receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub>) (Kennett, 2000). Estes receptores diferem entre si principalmente com relação à afinidade pela serotonina, distribuição regional/sináptica, sensibilidade a agentes agonistas/antagonistas, ligação com sistemas de segundo

mensageiros e na constituição molecular (Harrington et al., 1992; Glennon & Dukat, 1995; Sanders-Bush & Canton, 1995).

### 5.2.3. O Álcool e o Sistema Serotonérgico

O álcool interage com a transmissão serotonérgica no cérebro de diferentes maneiras. A exposição ao álcool (aguda ou crônica) altera vários aspectos das funções sinápticas da serotonina. Não se pode diretamente medir as concentrações de serotonina no cérebro humano ou nas sinapses de animais de laboratório; no entanto, para obter informação sobre os níveis de serotonina no cérebro, os pesquisadores somente podem mensurar os produtos da degradação da serotonina, gerados após o neurotransmissor ter sido removido da sinapse (isto é, os metabólitos da serotonina). Assim, as concentrações desses metabólitos dão uma medida indireta das alterações do nível global de serotonina no cérebro (Lovinger 1999).

Uma exposição ao álcool, mesmo única, altera vários aspectos das funções de sinapse da serotonina. Os níveis dos metabólitos de serotonina na urina e no sangue aumentam após um episódio agudo, indicando uma liberação aumentada de serotonina no sistema nervoso (LeMarquand et al., 1994). Esse aumento pode refletir transmissão intensificada nas sinapses serotonérgicas.

A exposição crônica ao álcool pode levar a alterações adaptativas dentro das células cerebrais. Esse processo, também chamado tolerância, presumivelmente é o mecanismo para restabelecer a função celular normal, ou homeostasia, em resposta às alterações contínuas induzidas pelo álcool. Por exemplo, se a exposição ao álcool inibe a função de um receptor de um neurotransmissor, as células podem tentar compensar a inibição contínua por aumentar o número de receptores ou por alterar a composição molecular dos receptores ou das membranas celulares, assim o álcool não mais inibe a função do receptor. O receptor 5-HT<sub>2</sub> parece sofrer tais mudanças adaptativas. Assim, o número de receptores 5-HT<sub>2</sub> e seus sinais químicos aumentam em animais de laboratório por diversas semanas. A atividade aumentada no receptor 5-HT<sub>2</sub>, causada pela exposição crônica ao álcool, pode também contribuir para a Síndrome de Abstinência ao álcool – o padrão de comportamentos ocorrendo quando o álcool é retirado após uso crônico (Lovinger, 1997).

A descoberta de uma relação negativa entre alcoolismo e os níveis de metabólitos da serotonina na urina e no fluido cérebro-espinhal (líquor) de alcoólatras é uma evidência implicando que a serotonina está envolvida no desenvolvimento do abuso de álcool. Diversos mecanismos podem causar a diminuição dos níveis de serotonina. As células cerebrais poderiam produzir menos serotonina, liberar menos serotonina na sinapse ou captar mais serotonina para as células. Alternativamente, os níveis de metabólitos de serotonina nos alcoólatras poderiam ser reduzidos, porque menos serotonina seriam degradadas no cérebro. O exato mecanismo que causa alterações nos níveis de metabólitos de serotonina ainda é desconhecido (Koob, 1994).

### 5.3. Sistema Noradrenérgico

Embora a existência de noradrenalina (NA) no cérebro tenha sido demonstrada bioquimicamente na década de 1950 e seu papel como neurotransmissor apenas fosse suspeitado, a análise detalhada de sua distribuição neuronal somente se tornou possível quando a técnica de fluorescência foi planejada por Falck & Hillarp. Esta técnica é baseada na formação de um derivado fluorescente das catecolaminas, quando os tecidos são expostos ao formaldeído. Assim, foram produzidos mapas detalhados das vias dos neurônios noradrenérgicos em animais de laboratório e, posteriormente, as mesmas características básicas foram confirmadas nos cérebros humanos (Rang et al., 2001).

#### 5.3.1 – Distribuição no cérebro

Os corpos celulares dos neurônios noradrenérgicos situam-se em pequenos agrupamentos na ponte e no bulbo, emitindo axônios extensamente ramificados a outras áreas cerebrais, incluindo o córtex cerebral, o sistema límbico, o hipotálamo, o cerebelo e a medula espinhal. O mais proeminente grupo de neurônios noradrenérgicos forma o loco cerúleo (LC, *locus ceruleus*), encontrado na substância cinzenta da ponte (Bloom, 1996; Machado, 2000). Os axônios que correm no feixe prosencefálico medial originam milhões de terminais nervosos noradrenérgicos em todo o córtex, hipocampo e cerebelo. Os terminais nervosos do sistema são muito difusos, liberando neurotransmissor a alguma distância da célula-alvo. Portanto, o sistema noradrenérgico

é como um aerosol neural – um simples toque no botão de pressão do LC dispara uma pulverização de noradrenalina para grandes áreas do cérebro (Rang et al., 2001).

### 5.3.2 – Ação celular da NA no cérebro

Quando aplicada a células individuais no cérebro, a noradrenalina geralmente causa inibição. Esse efeito é produzido pela ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, ligados ao acúmulo de AMPc. Entretanto, em algumas situações, a noradrenalina exerce um efeito excitatório, que é mediado pelos receptores  $\alpha$  ou  $\beta$ -adrenérgicos (Bloom, 1996).

Há uma boa correlação entre a atividade do LC e a reatividade (*arousal*) comportamental. Os neurônios do LC permanecem silenciosos durante o sono. Drogas semelhantes à anfetamina, que liberam catecolaminas no cérebro, aumentam o estado de vigília, o estado de alerta e a atividade exploratória (Kupfermann, 2000).

As sinapses noradrenérgicas centrais e periféricas exercem um papel no controle da pressão arterial, fato demonstrado pela ação de drogas hipotensoras, tais como a clonidina e a metildopa, que diminuem a descarga dos nervos simpáticos que emergem do sistema nervoso central. Produzem hipotensão ao serem injetadas localmente no bulbo ou no quarto ventrículo em quantidades bem inferiores que as doses necessárias para administração sistêmica. A noradrenalina e outros agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos possuem o mesmo efeito quando injetados localmente. As sinapses noradrenérgicas no bulbo formam provavelmente parte da via barorreceptora, pois a estimulação ou antagonismo dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos nessa parte do cérebro exerce efeito sobre a atividade dos reflexos dos barorreceptores (Rang et al., 2001).

As fibras noradrenérgicas ascendentes dirigem-se para o hipotálamo, enquanto as fibras descendentes seguem para a região do corno lateral da medula espinhal, atuando no sentido de aumentar a descarga simpática na periferia (Rang et al., 2001).

### 5.3.3 O Álcool e o Sistema Noradrenérgico

O envolvimento da noradrenalina no alcoolismo tem sido largamente estudado. Um número de pesquisas iniciais implicaram o sistema noradrenérgico na mediação da auto-administração do etanol, como lesões neuroquímicas dos neurônios noradrenérgicos ou inibição da síntese de NA que parecem resultar em uma supressão do consumo voluntário de etanol (Nevo & Hamon, 1995).

A administração aguda de etanol produz um efeito bifásico na liberação de NA no córtex frontal. Baixas doses (0.2 g/kg) aumentam a liberação, enquanto que doses mais altas (2 g/kg) diminuem a liberação de NE (Rossetti et al., 1992). Os autores sugeriram que a diminuição na liberação de NE cortical pode refletir as propriedades sedativas-hipnóticas do etanol em altas doses, enquanto a liberação aumentada de NA pode representar uma correlação bioquímica da reatividade e alerta aumentados decorrentes das baixas doses de etanol.

Estudos cerebrais, usando técnica de microdiálise *in vivo*, demonstraram que o tratamento crônico do etanol resulta em uma liberação aumentada de catecolaminas no hipocampo (Huttunen, 1991).

Muitos dos sintomas da abstinência ao álcool são devidos à atividade aumentada do sistema nervoso simpático, incluindo hipertensão, tremor, náusea e ansiedade (Linnoila et al., 1987). Agonistas  $\alpha$ , clonidina e lofexidina, são considerados efetivos no manejo de sintomas de abstinência leves e moderados. O beta-bloqueador, propranolol, é efetivo em bloquear ansiedade, mas não as convulsões (Bailey et al., 1992). O atenolol diminui o desejo pelo álcool de pacientes alcoólatras. Entretanto, atenolol e propranolol parecem exacerbar a confusão e alucinações vistas durante a abstinência do álcool (Jacob et al., 1983).

#### 5.4. Sistema Glutamatérgico

O papel do glutamato como uma importante molécula de sinalização tem sido reconhecido dentro das duas últimas décadas. O glutamato é o principal aminoácido excitatório do SNC e está presente por todo o cérebro em relativamente altas concentrações. Pesquisadores consideraram inicialmente o glutamato como produto do metabolismo intermediário de muitas reações celulares não relacionadas à transmissão neuronal e, assim, não interpretaram sua presença em neurônios como evidência de um papel potencial como um neurotransmissor (Dahchour & Witte, 2000).

Embora as primeiras indicações da função excitatória do glutamato no cérebro tenham emergido nos anos 50, esses achados inicialmente foram rejeitados: a aplicação do glutamato aos neurônios produziram respostas excitatórias em virtualmente todas as áreas cerebrais examinadas, sugerindo que esta excitação não era uma resposta específica (Collingridge e Lester 1989). Somente depois os cientistas reconheceram que o efeito do glutamato observado era de fato válido, pois os mecanismos de sinalização excitatórios tinham sido operativos por todo o SNC. Nos anos 70 e 80, pesquisadores identificaram receptores específicos de glutamato – proteínas na superfície de neurônios que especificamente se ligam ao glutamato secretado por outros neurônios e, desse modo, iniciam os eventos que levam à excitação do neurônio pós-sináptico. A identificação desses receptores de glutamato sublinharam a importância do glutamato como um neurotransmissor excitatório. De maneira semelhante ao glutamato, outros aminoácidos relacionados estruturalmente podem ter efeitos excitatórios similares na atividade neuronal em certas regiões cerebrais (Griffiths 1990).

Pesquisas recentes têm sugerido que o álcool altera a transmissão glutamatérgica e que esse efeito parece ser através de sua interação com receptores glutamatérgico, principalmente os ionotrópicos. O efeito de inibição induzido pelo álcool nos receptores de NMDA é subordinada a diversas conseqüências farmacológicas e toxicológicas do consumo de álcool agudo e crônico. O álcool pode afetar diversos processos mediados por NMDA, incluindo plasticidade e excitotoxicidade. A inibição da função de receptor NMDA pode contribuir para algum dos efeitos comportamentais do álcool (Hoffman et al, 1989; Lovinger et al, 1989).

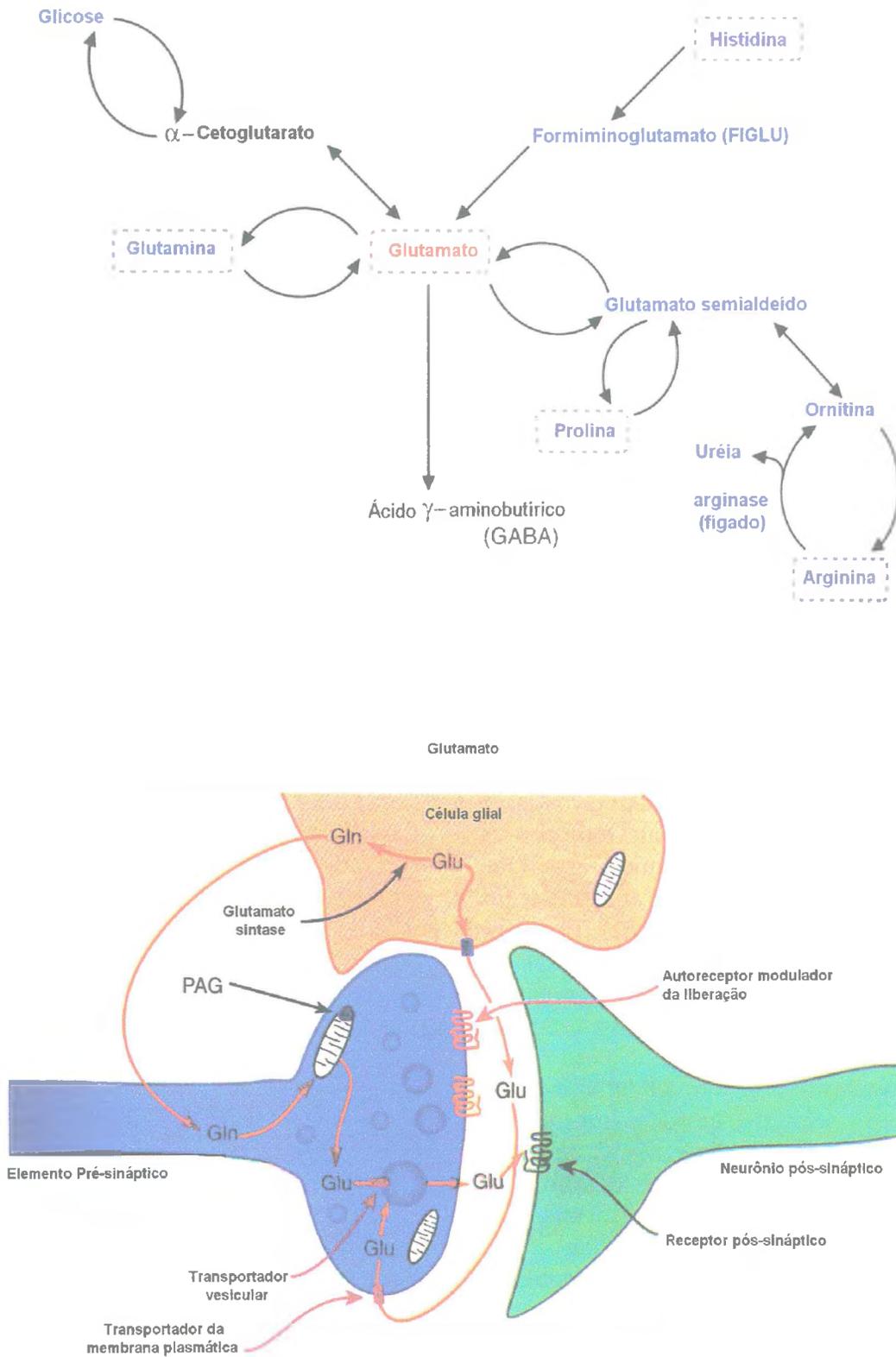
### 5.4.1. Biossíntese do glutamato

O glutamato é um dos chamados aminoácidos não-essenciais – isto é, as células podem gerar (i.e., sintetizar) glutamato a partir de outras moléculas, primariamente da  $\alpha$ -cetoglutarato e glutamina (Nicholls 1994). A molécula  $\alpha$ -cetoglutarato, substância que é convertida em glutamato no sistema nervoso, é um componente de um ciclo produtor de energia importante que ocorre na mitocôndria. Em contraste, a glutamina é fornecida principalmente por células chamadas células da glia, que ficam ao redor dos neurônios. Dentro dos neurônios, a glutamina também é convertida a glutamato em reação de hidrólise. As reações químicas e enzimas envolvidas na síntese de glutamato não são específicas aos neurônios, mas ocorrem em todas as células (**Figura 7**) (Gonzales & Jaworski,1997).

Em contraste com as outras células do corpo, os neurônios necessitam de glutamato não somente para atividades metabólicas normais, mas também para transmissão sináptica. Em consequência, as moléculas de glutamato que são destinadas para agir como neurotransmissores devem ser segregadas do glutamato não-transmissor. Para realizar esta separação, o *pool* de glutamato é estocado em pequenos compartimentos especiais dentro dos neurônios, as vesículas sinápticas, estando localizadas nas terminações nervosas (região terminal). Quando um neurônio glutamatérgico é ativado para passar um sinal a neurônios circunvizinhos, as vesículas sinápticas que contêm glutamato se fundem com a membrana da região terminal e liberam seu conteúdo na fenda sináptica. O glutamato então atravessa a fenda sináptica para interagir com receptores no neurônio pós-sináptico, desse modo induzindo excitação do neurônio pós-sináptico (Bloom, 1996).

Para terminar está reação de sinalização, proteínas carregadoras específicas transportam glutamato de volta ao neurônio pré-sináptico e para as células gliais circunvizinhas (Nicholls 1994). Em adição, para prevenir a excitação excessiva do neurônio pós-sináptico, este sistema de captação de glutamato recicla o *pool* de glutamato para utilização posterior. As moléculas de glutamato tomadas de volta para o neurônio pré-sináptico são transportadas diretamente para as vesículas sinápticas. O

glutamato transportado para as células gliais é rapidamente convertido a glutamina, que eventualmente pode ser transportada de volta ao neurônio para agir como um precursor para o glutamato. Assim, as células gliais associadas com neurônios glutamatérgicos ajudam a regular o processo de sinalização por terminar o sinal sináptico e por assegurar um suprimento eficiente de moléculas precursoras. Esse papel das células gliais é único para transmissão excitatória glutamatérgica; outros sistemas neurotransmissores aparentemente não requerem este suporte das células gliais (Gonzales & Jaworski, 1997).



Fonte- Marks et al., 1996; Zigmond et al., 1999

**Figura 7** – Síntese de glutamato

#### 5.4.2. Ação do glutamato na célula

O Glutamato age em receptores no cérebro. Os receptores de glutamato são moléculas primárias envolvidas na transmissão excitatória de sinais (Nakanishi, 1992). Os receptores de glutamato estão localizados nas superfícies da maioria dos neurônios, como também em algumas células gliais. Os receptores detectam a liberação de glutamato nas células circunvizinhas como também convertem o sinal excitatório e o substitui no interior das células pós-sinápticas (isto é, agem como transdutores de sinal) (Gonzales & Jaworski, 1997).

Há duas grandes classes de receptores de glutamato: os receptores diretamente ligados a canais iônicos, denominados ionotrópicos; e receptores ligados a segundos mensageiros, ditos metabotrópicos (**Figura 8**). Receptores de canais iônicos respondem à ligação de glutamato por permitirem que moléculas carregadas positivamente e íons entrem nas células. Este tipo de receptor de glutamato transmite a maioria dos sinais excitatórios de transmissão rápida no SNC. Os receptores ligados a segundos mensageiros têm primariamente um papel regulatório ou modulatório por alterarem ou integrarem outros sinais que as células recebem. Quando ativados por ligação ao glutamato, estes receptores causam alterações químicas na célula. O álcool parece interferir com o receptor de glutamato tipo canal iônico, desse modo alterando a sinalização excitatória primária por todo cérebro. Este achado pode explicar os efeitos do álcool na atividade neuronal e função cerebral (Collingridge et al, 1989).

Os receptores de glutamato de canais iônicos consistem de diversas proteínas (subunidades) relacionadas intimamente que se combinam para formar moléculas receptoras funcionais. Existem três grandes categorias, ou famílias, destes receptores, cada qual diferindo nas composições das subunidades. Estes compostos são  $\alpha$ -amino-3hidroxi-5-metil-isoxazol (AMPA), cainato, e N-metil-D-aspartato (NMDA). As subunidades protéicas compreendendo os receptores AMPA e cainato são mais intimamente relacionadas entre si do que às subunidades que formam os receptores de NMDA (Dodd et al., 2000).

Quando ativados por ligação do glutamato, todas essas três famílias de receptores causam excitação na célula pós-sináptica por permitirem que íons carregados positivamente, tais como sódio ( $\text{Na}^+$ ) ou cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), entrem na célula. Este movimento rápido de íons positivos para o interior das células reduz a diferença de voltagem que normalmente existe entre o interior e o exterior, causando uma despolarização da membrana. Porque cada neurônio carrega milhares de receptores de glutamato, o fluxo iônico causado por um sinal excitatório pode resultar em uma despolarização suficiente para gerar outro sinal excitatório na célula pós-sináptica. Este segundo sinal é então transmitido a outros neurônios com os quais a célula pós-sináptica é conectada (Crews et al, 1996).

Ambos os receptores AMPA/cainato e NMDA agem através do mecanismo geral da excitação neuronal descrita acima. Entretanto, diferenças chave nas propriedades destes canais iônicos existem, e dão origem a características funcionais específicas. Por exemplo, a maioria dos receptores AMPA/cainato permitem ao sódio, mas pouco cálcio, entrar nas células. Além do mais, estes receptores somente requerem a presença de glutamato para serem ativados. Os receptores NMDA, em contraste, permitem a entrada tanto de sódio como também cálcio, requerendo glutamato e um estímulo adicional despolarizante (de um receptor AMPA/cainato previamente ativado) para sua ativação. As conseqüências fisiológicas destas diferenças são que os receptores AMPA/cainato são mais adaptados para sinais rápidos de substituição (ligar/desligar), enquanto que os receptores NMDA são melhor adaptados para funções que requerem a integração de sinais convergentes. Conseqüentemente, os receptores NMDA agem como “detectores de simultaneidade” que são ativados somente quando dois eventos (isto é, despolarização e ligação de glutamato) coincidem. Este fato torna a família NMDA de receptores de glutamato um candidato importante para atuar como componentes moleculares fundamentais, contribuindo para muitas formas de plasticidade cerebral, tais como aprendizagem e formação da memória. Contrariamente, os receptores rápidos AMPA/cainato provavelmente representam os mediadores primários cerebrais de sinais excitatórios (Bliss & Collingridge, 1993).

O glutamato é o neurotransmissor implicado na plasticidade cerebral. O termo plasticidade refere-se a habilidade do cérebro em se adaptar a várias influências ambientais ou genéticas. Diversos tipos de plasticidade existem, incluindo plasticidade

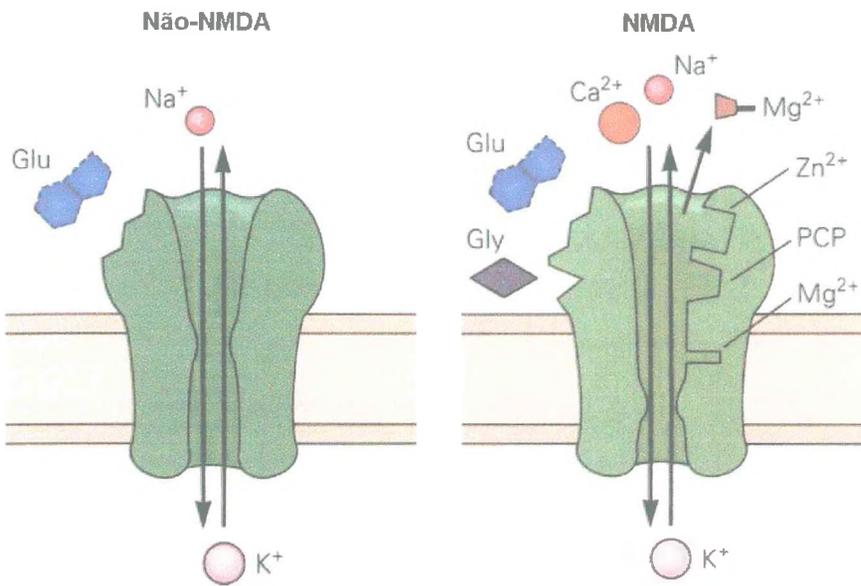
de desenvolvimento, potenciação a longo prazo (LTP, *long-term potentiation*) e plasticidade sináptica em resposta a injúrias (Gonzales & Jaworski, 1997).

A plasticidade ontogênica ocorre durante o desenvolvimento do cérebro embriônico, quando as células neuronais migram para áreas particulares do cérebro e formam inúmeras conexões sinápticas. Com o desenvolvimento, os neurônios que formam conexões estáveis com outras células continuam a viver, enquanto os outros morrem. Os receptores NMDA têm um papel importante nesses processos de desenvolvimento, e a alteração da função do receptor NMDA pode levar a severa e potencialmente permanente alteração da função cerebral (Leslie & Weaver, 1993).

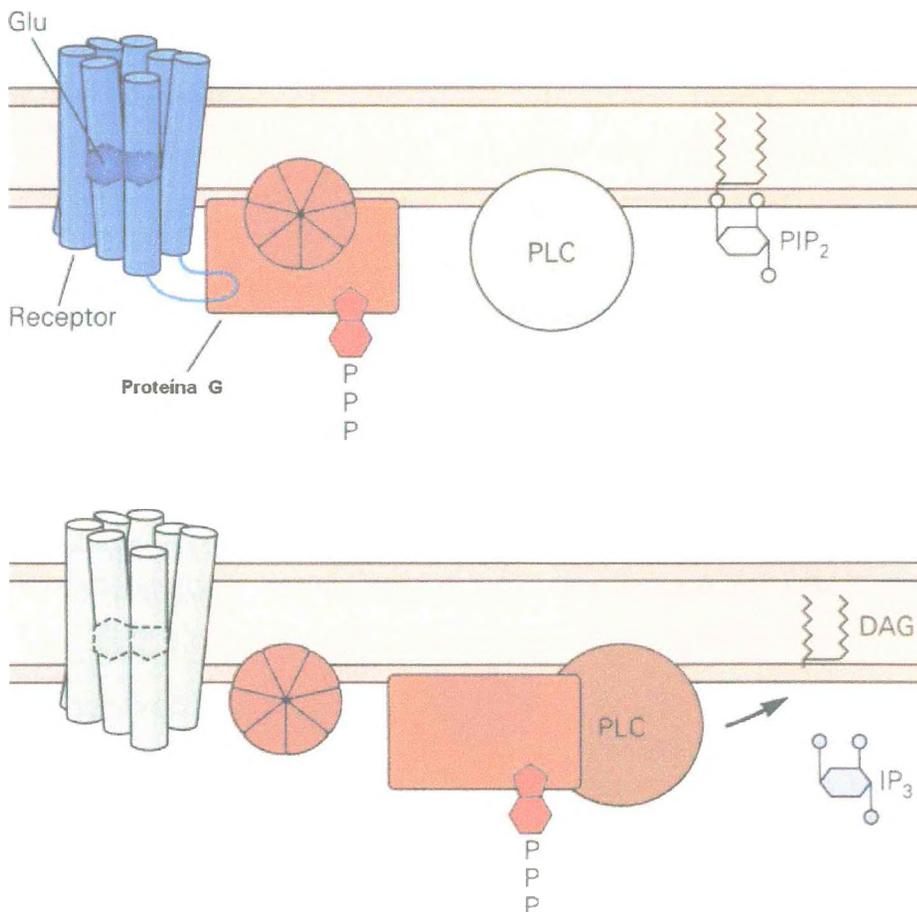
A LTP é um processo pelo qual neurônios formam conexões sinápticas estáveis após serem repetidamente expostos a um padrão específico de estimulação. Pesquisadores observaram a LTP em certas células do hipocampo, uma região cerebral envolvida na formação da memória em humanos. Receptores NMDA contribuem significativamente com a LTP (Gonzales & Jaworski, 1997).

A plasticidade sináptica também pode ocorrer em resposta a injúria neuronal. Quando os neurônios são fatalmente lesados, neurônios circunvizinhos podem rearranjar suas conexões sinápticas, presumivelmente para compensar a perda de um grupo de sinapses. Novamente, receptores NMDA estão relacionados nesse processo em resposta ao trauma cerebral. (Schallert & Jones, 1993).

### A- Receptor Ionotrópico do glutamato



### B- Receptor metabotrópico do glutamato



Fonte: Zigmond et al., 1999

**Figura 8-** Tipos de receptores glutamatérgicos

### 5.4.3. O Álcool e o Sistema Glutamatérgico

As investigações das interações potenciais do álcool com a transmissão glutamatérgica tem tido rápido progresso desde o final de 1980, quando ferramentas farmacológicas tornaram-se disponíveis para distinguir entre sinais conduzidos pelos receptores AMPA/cainato e receptores NMDA (Gonzales & Jaworski, 1997).

Em estudos eletrofisiológicos e neuroquímicos, o etanol em concentrações farmacologicamente relevantes inibe ou antagoniza a ação de agonistas em receptor NMDA em diversas preparações neuronais. Além do mais, uma diminuição na concentração extracelular estriatal ocorre *in vivo* em estudo com microdiálise após administração de 2 g/kg de etanol (Carboni et al., 1993), enquanto outro estudo com microdiálise mostrou uma resposta bifásica com 0,5 g/kg (aumento) e 2 g/kg (diminuição) de etanol na liberação de glutamato no hipocampo e NAc (Mogahaddam & Bolinao, 1994). O efeito inibitório do etanol no receptor NMDA foi não seletivo.

O etanol, administrado crônico, resulta em uma *up-regulation* do número de receptores de NMDA e da sua função. Essas alterações à nível de receptores são decorrentes da resposta fisiológica causada pelos efeitos depressores do etanol, que pode ser explicado pela intensificação da expressão do receptor (Trujillo & Akil, 1995). Outra análise indicou que o tratamento crônico de etanol aumenta as subunidades de receptor NMDA: NR1, NR2A e NR2B em córtex cerebral e hipocampo, estes retornaram quase aos níveis controle após 48 h de administração da última dose de etanol (Kalluri et al., 1998).

Estes resultados são baseados em achados que a administração de antagonistas NMDA tais como dizocilpina (MK-801) ou CGP 39551, durante a retirada do etanol, significativamente atenuou o déficit induzido pelo etanol na memória. Tais antagonistas são úteis nos tremores, convulsões e abstinência do etanol (Dahchour & Witte, 2000).

A inibição do receptor NMDA induzida pelo álcool tem sérias conseqüências nos processos de desenvolvimento, aprendizado e memória. A mais severa manifestação dos efeitos do álcool na plasticidade durante o desenvolvimento é a

síndrome alcoólica fetal ( *fetal alcohol syndrome*), que é caracterizada por algumas anormalidades faciais, retardo de crescimento e retardo mental. A inibição induzida pelo álcool dos receptores NMDA durante o período pré-natal pode causar sutis alterações no desenvolvimento, tais como alterações do aprendizado e memória (Gonzales & Jaworski, 1997).

Pesquisadores também demonstraram que o álcool inibiu a LTP mediada por receptores NMDA *in vivo* e *in vitro* (Morrisett & Swartzwelder, 1993). A LTP é um bom exemplo de plasticidade cerebral e está envolvida no aprendizado, onde a inibição induzida pelo álcool pode ser o mecanismo pelo qual o álcool altera o aprendizado e a memória (Gonzales & Jaworski, 1997).

Alguns dos efeitos deletérios do consumo crônico do álcool podem resultar na excitotoxicidade, excessiva atividade celular, mediada pelos receptores NMDA. A exposição aguda ao álcool reduziu a excitotoxicidade em neurônios do córtex cerebral (Tsai et al., 1995). Para compensar a inibição dos receptores NMDA pela administração crônica de álcool, entretanto, o número de receptores NMDA nas células e a atividade dos receptores aumentam após a exposição ao álcool a longo prazo (Grant et al., 1990; Trujillo & Akill, 1995). Quando o álcool é retirado, entretanto, os receptores NMDA são desinibidos e a atividade aumenta além do normal. Essa excessiva atividade de receptores NMDA contribui para convulsões e deixa as células mais susceptíveis a morte celular excitotóxica. Assim, a excessiva atividade de receptores NMDA causa algumas das manifestações da retirada do álcool, tais como hiperatividade e convulsões (Dodd et al., 2000).

## **6. Principais Estratégias Terapêutica para o Alcoolismo**

A dependência ao álcool, alcoolismo, é geralmente uma doença progressiva crônica, reconhecida como tal pela Associação Médica Americana. É uma doença comum, com enorme ônus para os pacientes, suas famílias e sociedade. Os estudos epidemiológicos indicam que o alcoolismo acomete mais homens que mulheres (Garbutt et al., 1999).

O tratamento do alcoolismo envolve várias etapas. A primeira refere-se à retirada aguda e à detoxificação (Mayo-Smith, 1997). As etapas posteriores visam manter os pacientes em remissão e desenvolver um estilo de vida compatível com abstinência a longo prazo (isto é, evitar qualquer consumo de álcool). Esse último aspecto do manejo dos pacientes tem sido composto tradicionalmente de intervenções psicossociais (incluindo o programa Alcoólatras Anônimos-AA), modalidades farmacológicas e combinações de ambos. Embora muitos pacientes consigam se manter sóbrios por muito tempo com o tratamento, outros continuam a sofrer recaídas e a piorar apesar de múltiplos cursos de tratamento. O tratamento farmacológico está surgindo como outro meio de aumentar a abstinência e evitar as recaídas, complementando as intervenções psicossociais que vêm sendo utilizadas há muitos anos (**Quadro 4**). A seguir, serão descritas algumas drogas usadas na abordagem farmacológica do alcoolismo (Garbutt, 1999).

### **6.1. Drogas usadas para tratar a síndrome de abstinência aguda do álcool**

Na tentativa de aliviar a síndrome da abstinência aguda, os benzodiazepínicos são eficazes. São largamente prescritos principalmente para o tratamento de transtornos de ansiedade e insônia. O abuso dos benzodiazepínicos, produzem pouca tolerância e não há dificuldade de se parar com a sua utilização. A clonidina e o propranolol também são úteis durante a abstinência ao álcool. A clonidina, agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, atua ao inibir a exagerada liberação de transmissores que ocorre, enquanto o propranolol, antagonista dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, bloqueia os efeitos da atividade simpática excessiva (Rang et al., 2001).

### **6.2. Drogas usadas para reduzir a depressão**

Outro sistema de neurotransmissores que está ligado com a terapêutica é o serotoninérgico. O consumo do álcool produz uma alteração no sistema serotoninérgico ou uma redução na neurotransmissão de serotonina (Gatch & Lal, 1998). Os inibidores seletivos de recaptação de serotonina são medicações antidepressivas, e este mecanismo de ação envolve o bloqueio de recaptação de serotonina no terminal pré-sináptico, resultando em um aumento do neurotransmissor na fenda sináptica. O

ocorrência de problemas com o álcool e depressão, sintomas depressivos em pacientes na retirada do álcool, e o achado que os pacientes dependentes do álcool em abstinência podem ter níveis baixos de metabólitos de serotonina no fluido cerebrospinal têm sugerido que essas medicações são úteis no tratamento do alcoolismo (Fiellin et al., 2000).

### **6.3. Droga usada para induzir aversão ao álcool**

O dissulfiram, outro fármaco utilizado na clínica, é usado para tornar o consumo de álcool desagradável. O dissulfiram inibe a enzima aldeído desidrogenase, elevando os níveis circulantes de acetaldeído. Na presença de dissulfiram, que não produz nenhum efeito acentuado quando administrado isoladamente, o consumo de etanol é seguido de grave reação, que consiste em rubor, taquicardia, hiperventilação e grau considerável de pânico e angústia, em decorrência do acúmulo excessivo de acetaldeído na corrente sanguínea. Há lesões hepáticas, neurológicas, psiquiátricas e reações de pele com baixa incidência. As reações comuns são extremamente desagradáveis, porém não prejudiciais, de modo que o dissulfiram pode ser utilizado como terapia de aversão para desestimular o consumo de álcool (Rang et al., 2001). Revisões recentes têm recomendado que o dissulfiram trabalha melhor quando usado como parte de um planejamento no tratamento que inclui monitorização cuidadosa, terapia psicológica e suporte social na forma de grupos tipo AA e envolvimento familiar (Allen & Litten, 1992, Gatch & Lal, 1998).

### **6.4 Droga usada para reduzir as convulsões da síndrome de abstinência**

Há uma evidência experimental que sugere que bloqueadores de receptor NMDA, tais como MK-801 (dizocilpina) pode servir como uma via potencial para tratamento. MK-801 reduz a frequência e severidade de convulsões induzidas pela retirada do álcool, mas não outros aspectos da retirada (Hoffman et al., 1990; Riaz & Faingold, 1994). MK-801 também bloqueia o desenvolvimento de tolerância ao álcool. A utilidade do MK-801 é provavelmente limitada porque produz incoordenação motora, mas pode ter uma responsabilidade no abuso. Essa droga tem mostrado o comportamento em manter a auto-administração em macacos rhesus previamente treinados para auto-administração de fenciclidina (Gatch & Lal, 1998).

### 6.5. Drogas usadas para reduzir a ingestão de álcool

A dopamina medeia muitos efeitos centrais de reforço do álcool. Uma tentativa de bloquear os efeitos de reforço do álcool parece uma estratégia lógica de tratamento. Antagonistas D2, como a bromocriptina, o pimozide e o haloperidol, reduzem o consumo de álcool em camundongos e ratos (Weiss et al., 1990; Ng & George, 1994). Entretanto, surpreendentemente poucos dados clínicos no uso de agentes dopaminérgicos têm sido acumulados, e que os dados coletados não têm sido inequívocos. Tiapridal, outro antagonista dopaminérgico –D2, foi testado em humanos, reduzindo o consumo de álcool, aumentando o número de abstinência e diminuindo números de depressão e ansiedade (Shaw et al, 1987; Shaw et al., 1994).

### 6.6. Droga usada para reduzir a recompensa

Os opióides têm um papel importante nos efeitos de reforço do álcool por modulação do sistema dopaminérgico (Di Chiara, 1996). Há um estudo que encontrou evidência direta que a naltrexona reduz a liberação de dopamina pelo álcool no núcleo acumbente, mostrando assim a teoria que os opióides medeiam os efeitos de reforço do álcool através do sistema dopaminérgico (Benjamin et al., 1993). A naltrexona é um congênere da oximorfona que age como antagonista opióide puro. Embora seu mecanismo de ação não seja completamente entendido, a naltrexona competitivamente se liga aos receptores opióides e pensa-se que bloqueia o aumento induzido pelo álcool na atividade opióide endógena. Esse bloqueio pode reduzir os efeitos de reforço do álcool no cérebro por diminuir a recompensa, e portanto reduzir o consumo de álcool (Fiellin et al., 2000).

### 6.7. Droga usada para reduzir o desejo mórbido (*Craving*)

O acamprosato, uma droga que tem ultimamente apresentado destaque no tratamento do alcoolismo, é utilizado para reduzir o desejo mórbido do álcool (Rang et al., 2001). O acamprosato é o acetil homotaurinato de cálcio, análogo da taurina e análogo estrutural do GABA, que exerce efeitos complexos sobre a transmissão de aminoácidos. Este composto induz uma redução significativa do consumo de álcool em modelos animais experimentais. Estudos clínicos mostraram que o acamprosato foi

eficiente em reduzir a recaída em pacientes com abstinência. A droga é bastante segura e bem tolerada pelos pacientes, não sendo antidepressiva, neuroléptica ou tranqüilizante. O acamprosato pode interagir: primeiro, com a taurina, por aumentar os níveis de taurina após administração aguda; segundo, com o GABAA, por restabelecer a concentração basal diminuída de GABA após o álcool crônico; e, finalmente, com o glutamato, por bloquear o aumento de glutamato na fase de abstinência ao álcool (Dahchour & De Wite, 2000).

#### Quadro 4- Drogas usadas no tratamento do alcoolismo

Drogas	Dose	Indicações	Efeito colaterais
Naltrexona	50 mg/dia	Reduzir a recompensa ao álcool	Náuseas e tonturas
Acamprosato	1,3 - 2 g/dia	Reduzir a ingestão de álcool	Diarréia e cefaléia
Dissulfiram	250-500 mg/dia	Induzir aversão ao álcool	Taquicardia, hipertensão
Fluoxetina	10-60 mg/ dia	Reduzir a depressão	Ansiedade, insônia, tremores, sudorese
Diazepam	10 mg/dia	Tratar a Síndrome de abstinência aguda do álcool	Sedação e perda de reflexos

Fonte: Garbutt et al., 1999

## OBJETIVOS

O etanol age sobre vários neurotransmissores, dentre esses os sistemas dopaminérgico, glutamatérgico, serotoninérgico e opióide, têm um papel relevante para o reforço e a síndrome de retirada do álcool. Assim, os objetivos do presente estudo foram verificar os efeitos do etanol administrado a grupos de animais submetidos a dois diferentes protocolos (P1. Administração de antagonistas dopaminérgico, glutamatérgico e opióide após tratamento prévio de etanol e P2. Administração desses antagonistas associados ao etanol) experimentais. Para possibilitar uma melhor compreensão o estudo foi dividido em 5 capítulos a saber:

### Capítulo I:

- Efeitos comportamentais do etanol sozinho e/ ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico ou opióide em ratos e camundongos.

### Capítulo II:

- Efeitos da administração de etanol sozinho e/ ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide sobre as concentrações de monoaminas e metabólitos em corpo estriado de ratos.

### Capítulo III:

- Efeitos da administração de etanol sozinho e/ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide sobre a densidade de receptores dopaminérgicos (D1 e D2-símile) em corpo estriado de ratos.

### Capítulo IV:

- Efeitos da administração de etanol sozinho e/ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide sobre os níveis de aminoácidos em corpo estriado de ratos.

**Capítulo V:**

- Efeitos da administração de etanol sozinho e/ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide sobre os níveis sanguíneos de glicose, apolipoproteínas, lipoproteínas e enzimas de função hepática em ratos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 – Animais

Foram utilizadas ratos Wistar e camundongos Swiss, adultos-jovens, 2-4 meses, machos, com peso variando entre 150-230 g e 28-34 g, respectivamente. Os animais foram provenientes do Biotério Central, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão tipo purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos da América (EUA).

### 2 - Preparo das drogas

#### 2.1. Etanol

O álcool etílico a 95%, P.A. (Lab. VETEC, Brasil) foi utilizado para o preparo de solução a 20% (em água bidestilada). Esta foi administrada em volume que variou conforme a concentração final desejada, obtendo-se as seguintes concentrações finais:

Droga	Concentração final	Volume administrado (animal de 200g)
Etanol 0,5 g/kg	0,2 g/ml	0,5 ml
Etanol 2 g/kg	0,2 g/ml	2 ml
Etanol 4 g/kg	0,2 g/ml	4 ml

## 2.2. ketamina

Ketamina (Ketalar- ampola de 50 mg/ml, Lab. Parke-Davis, Brasil) foi administrada retirando-se diretamente do frasco, com a seguinte concentração final:

Droga	Concentração final	Volume administrado (animal de 200g)
Ketamina	50 mg/ml	0,1 ml

## 2.3. Haloperidol

Haloperidol (Haldol-ampola de 5 mg/ml- Lab. Cristália) foi dissolvido em água bidestilada, obtendo-se a seguinte concentração final:

Droga	Concentração final	Volume administrado (animal de 200g)
Haloperidol	1 mg/ml	0,2 ml

## 2.4. Naltrexona

Naltrexona (Revian- comp. 50 mg- Lab. Cristália, Brasil) foi macerado e suspenso em água bidestilada, obtendo-se a seguinte concentração final:

Droga	Concentração final	Volume administrado (animal de 200g)
Naltrexona	1 mg/ml	2 ml

## 3 - Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com etanol diariamente durante 1, 7, 14 ou 30 dias. Para esse tratamento, foi utilizado uma cânula intragástrica de polietileno. Trinta minutos ou quarenta e oito horas após a última administração, os animais foram

submetidos ao teste comportamental e, posteriormente, sacrificados. Apenas um dos testes comportamentais foi realizado imediatamente após a administração do etanol.

Após os testes de comportamento (em ratos) o cérebro dos animais foram removidos e a área cerebral de interesse (corpo estriado) dissecadas sobre gelo. Os animais controles foram tratados com água bidestilada. O **Quadro 1** sumariza as drogas com suas respectivas doses e vias de administração

Grande parte dos trabalhos que estudam a interação de etanol com drogas agonistas ou antagonistas geralmente fazem essa associação do início do tratamento. Objetivando primeiro induzir um estado de dependência nos animais, esses foram tratados durante sete dias apenas com etanol e após esse período dois protocolos foram utilizados:

#### **Protocolo 1:**

Os animais foram tratados diariamente com etanol (4g/kg, v.o.), durante sete dias, a partir do oitavo dia o tratamento continuou somente com ketamina- 25 mg/kg, i.p. (Et+ketamina-1), haloperidol- 1 mg/kg i.p. (Et+haloperidol-1) ou naltrexona 10 mg/kg, v.o. (Et+naltrexona-1) até o 14<sup>o</sup> dia, e 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados.

#### **Protocolo 2:**

Os animais foram tratados diariamente com etanol (4g/kg, v.o.) durante sete dias, no 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, ketamina- 25 mg/kg, i.p. (Et+ketamina-2), haloperidol- 1 mg/kg, i.p. (Et+haloperidol-2) ou naltrexona- 10 mg/kg, v.o. (Et+naltrexona-2), foram administradas. A administração da associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia, e 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado.

Para servir como referência dos tratamentos associados os animais foram tratados durante 7 dias somente com ketamina (25 mg/kg, i.p.), haloperidol (1 mg/kg,

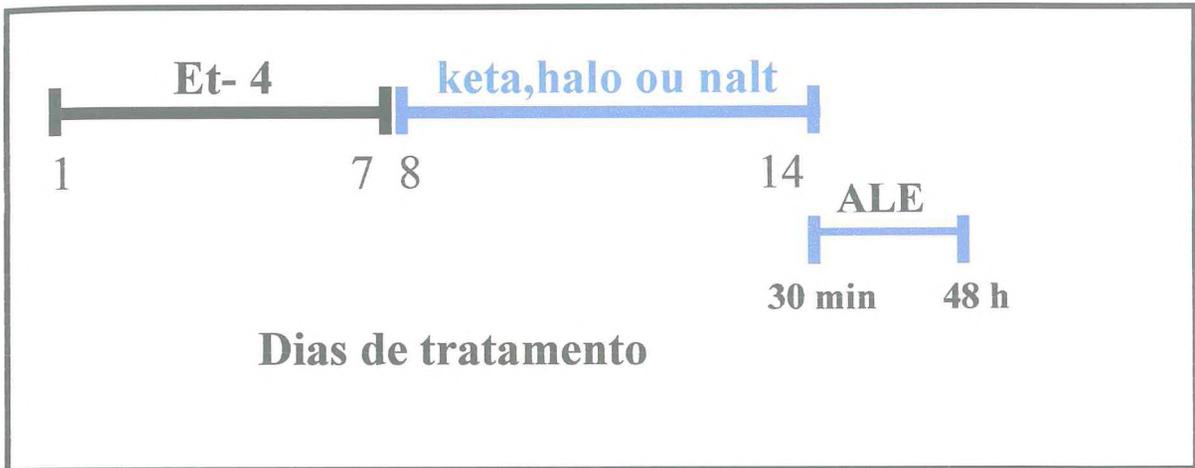
i.p.) ou naltrexona (10 mg/kg, v.o.) e sacrificados após 48 h da última injeção das drogas.

Deve-se salientar que 30 minutos ou 48 horas após a última administração, os ratos foram submetidos ao teste comportamental e, posteriormente, sacrificados após 48 h do término do tratamento. Antes de sacrificar os animais, o sangue (aproximadamente 2 ml) foi coletado do plexo orbital em tubos siliconizados com gel separador para realização dos testes bioquímicos. O cérebro foi removido e a área cerebral de interesse (corpo estriado) dissecada sobre gelo.

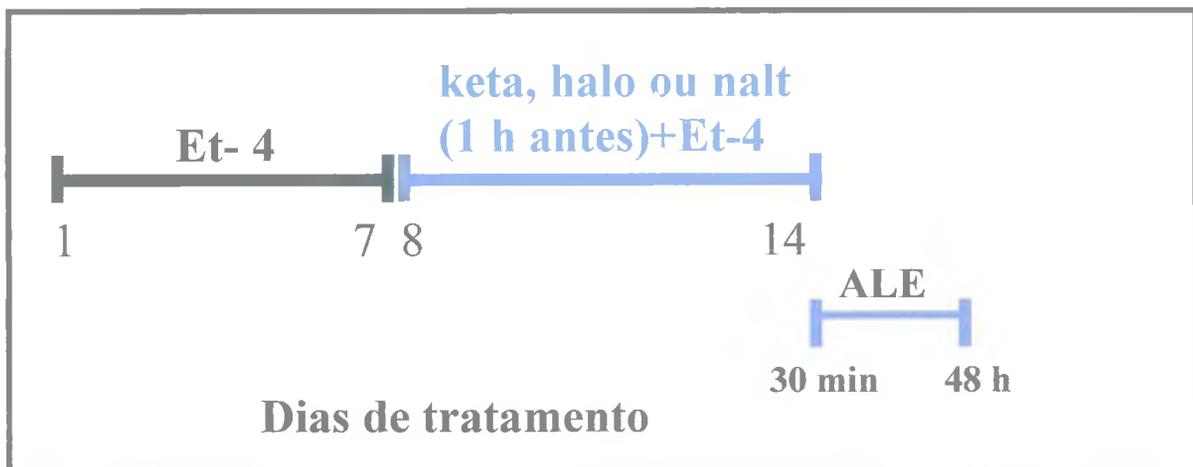
**Quadro 1** - Drogas utilizadas com respectivas doses e vias de administração.

Droga	Dose	Via de administração	Abreviatura
Etanol	0,5 g/kg	Oral	Et-0,5
	2,0 g/kg		Et-2,0
	4,0 g/kg		Et-4,0
Ketamina	25 mg/kg	Intraperitoneal	Keta
Haloperidol	1,0 mg/kg	Intraperitoneal	Halo
Naltrexona	10 mg/kg	Oral	Nalt

Os protocolos experimentais utilizados estão sumarizadas nos esquemas 1 e 2.



**Esquema 1** - Drogas utilizadas após a retirada do etanol, conforme protocolo experimental-1. ALE- Atividade Locomotora Espontânea



**Esquema 2** - Drogas utilizadas associadas com etanol, conforme protocolo experimental-2. ALE- Atividade Locomotora Espontânea

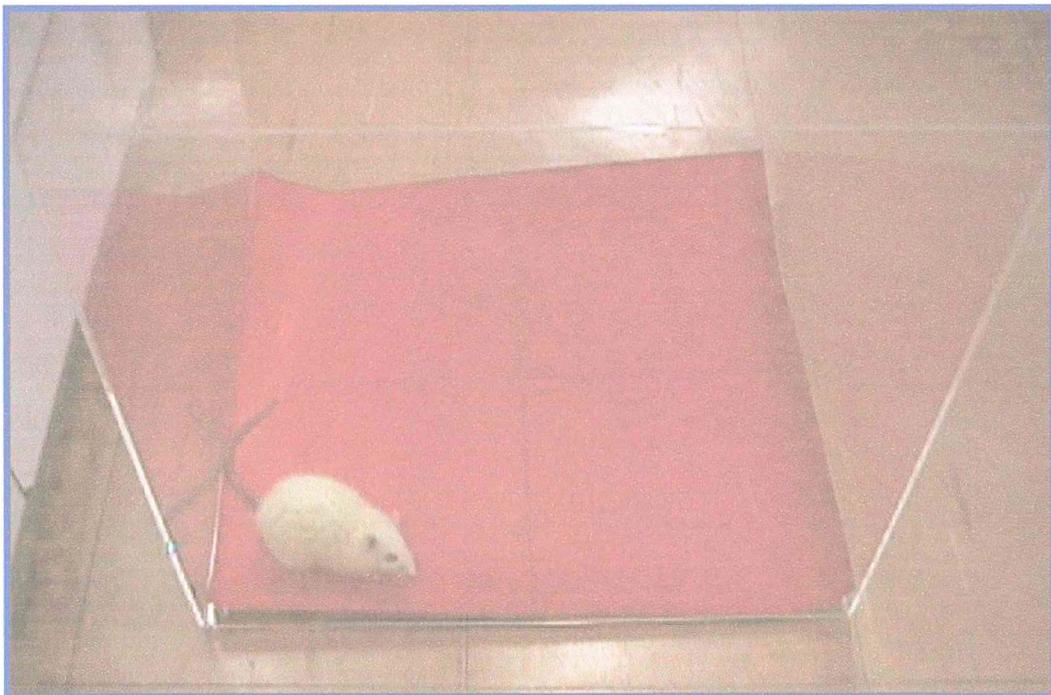
#### 4 - Material utilizado nos experimentos

- Agitador de tubos (modelo 251, FANEN, São Paulo, Brasil);
- Balança analítica ( modelo H5, Mettler, Suíça);
- Banho maria (FANEN, modelo 102/1, SP, Brasil);
- Caixa de atividade (Cat.7400 Ugo Basile, Itália);
- Centrífuga refrigerada (modelo Eppendorf);
- Contador de Cintilação Líquida Beckman (modelo LS 6500, CA, EUA);
- Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro (Sarstedt, Alemanha);
- Espectrofotômetro (modelo DU 640B, Beckman , CA, EUA);
- Equipamento para filtração a vácuo (Millipore Apparatus, Bedford, MA, EUA);
- Estufa de secagem e esterilização (modelo 315 SEFANEM, SP, Brasil);
- Filtros de fibra de vidro (GF/B Whatman, Maidstone, England);
- Frascos de vidro para contagem de cintilação (*vials* Beckman, Fullerton, CA, EUA);
- Freezer a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C., EUA);
- Guilhotina (Harvard, EUA);
- Homogeneizadores (Bellico, EUA);
- Equipamento de HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Performance- Detector de fluorescência e eletroquímico (Shimadzu, Japão), constante de: Bomba de HPLC (LC-10 AD, Shimadzu Corp., Japão); Coluna para catecolaminas (modelo C 18,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $250\text{ x }4,6\text{ mm}$ , Shimadzu, Japão); Pré-coluna (CLC G-ODS,  $4\text{mmD X }1\text{ cm}$ , Shimadzu, Japão); Detector eletroquímico (Modelo L-ECD-6A; Shimadzu , Japão) e Eletrodo de carbono (Shimadzu); Detector de fluorescência (Modelo LE ; Shimadzu , Japão); Degaseificador (DGU-2A Shimadzu , Japão); Integrador (C-R6A Chromatopac, Shimadzu, Japão);
- Injetor (Shimadzu Corp., Japan);
- Micropipetas (H.E. Pedersen, Dinamarca);
- Medidor de pH, modelo B374 (Micronal, SP, Brasil);
- Sonificador (Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc. NY, EUA).
- Unidade eletrônica (caixa de atividade)- Cat. 7401 (Ugo Basile, Itália)

## 5 – Testes comportamentais

### 5.1. Teste de campo aberto na arena (para ratos)

Os ratos foram colocados em um campo aberto, com área de 50 x 50 cm e iluminado por uma luz vermelha. Este campo foi confeccionado em cartolina de cor vermelha, dividida em quatro quadrantes iguais (**Figura 1**). Os animais foram previamente habituados durante 1 minuto ao campo aberto e, posteriormente, submetidos ao teste que foi realizado em uma sala livre de sons. O observador colocou os animais nesse campo e registrou o número de travessias de um quadrante para outro durante 3 ou 10 minutos. O tempo de observação foi de 30 minutos ou 48 h após o tratamento (Jorgensen et al., 1994).



**Figura 1** – Teste de atividade locomotora espontânea na arena

## **5.2. Teste da Atividade Locomotora na caixa de comportamento (para camundongos)**

Para realização do teste, foi utilizada a metodologia empregada por Shimada et al. (1997). Camundongos foram acomodados em caixas de atividade individuais, com 35 cm de comprimento, 23 cm de profundidade e 20 cm de altura (modelo 7400 Ugo Basile, Itália). Em um ambiente livre de sons e obedecendo a ciclo dia/noite de 12 h. A ALE foi determinada por 15 minutos nos períodos de pré e pós-administração, por uma unidade eletrônica (modelo 7401, Ugo basile). A ALE foi expressa como número de contagens/15 minutos, onde essa contagem representa o número de movimentos do animal.

## **5.3. Teste de “Rota-Rod” (para camundongos)**

O teste de “rota rod” foi realizado conforme o modelo de Dunham & Myia (1957). Camundongos foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 10 cm de diâmetro, elevada a 55 cm do piso, e com uma rotação de 6 rpm. Para cada animal, foi registrado o número de quedas (sendo o limite máximo de 3 quedas para cada animal) e o tempo de permanência na barra, em um período de até 1 minuto.

## **6 - Dissecação da área cerebral (corpo estriado)**

Os animais (ratos) foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA), os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo.

Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi liberada das leptomeninges com a ajuda de uma pinça reta de microdissecação que divulsionou o córtex delicadamente, em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex, depois de divulsionado, foi rebatido para os lados, expondo parte do corpo estriado (**Figura 2**).

O corpo estriado (caudado, putamen e globo pálido) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua

retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desse núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.



**Figura 2-** Dissecação cerebral mostrando a retirada do corpo estriado de rato.

Terminada a dissecação, cada área foi colocada em papel de alumínio, sob gelo, pesada e armazenada a  $-10^{\circ}\text{C}$  para uso posterior. Quando foi necessária a estocagem por um certo período de tempo (no máximo 2 meses), os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados 24 h após a dissecação (Burke, 1987; Fiedler et al., 1987).

### **7- Determinação da densidade dos Receptores Dopaminérgicos**

A determinação dos receptores dopaminérgicos foi feita através de ensaios de *binding* executados em homogenatos cerebrais, variando os seguintes parâmetros:

### - Receptores D<sub>1</sub>-símile

Foi utilizado o ligante específico [<sup>3</sup>H]-SCH 23390 (87,0 Ci/mmol - New England Nuclear, EUA), de acordo com método previamente descrito (Meltzer et al., 1989).

### - Receptores D<sub>2</sub>-símile

Foi utilizado o ligante específico [<sup>3</sup>H]-espiroperidol (114,0 Ci/mmol - New England Nuclear, EUA), segundo uma adaptação do método previamente descrito (Kessler et al., 1991 e Meltzer et al., 1989.)

### - Método

O [<sup>3</sup>H]-SCH 23390 é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D<sub>1</sub>-símile. O ligante [<sup>3</sup>H]-espiroperidol é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D<sub>2</sub>-símile, possuindo também afinidade pelos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>2</sub> (Kessler et al., 1991; Terai et al., 1989). Para bloquear os receptores serotoninérgicos no *binging* de D<sub>2</sub>-símile, foi utilizado um antagonista específico, a mianserina.

A dopamina, um agonista dopaminérgico, foi adicionada, na forma não marcada, nos *brancos* dos ensaios para receptor D<sub>1</sub> para determinar a radioatividade de *background* ou ligações não-específicas, em uma concentração elevada para interagir com os mesmos sítios de ligação do receptor, impedindo assim a ligação do [<sup>3</sup>H]-SCH23390, que fica livre. O mesmo foi feito com relação ao receptor D<sub>2</sub>, mas neste caso foi utilizado o butaclamol, um antagonista de receptores dopaminérgicos, também com o intuito de determinar as ligações não-específicas. Esses ligantes livres são retirados do filtro através de lavagens sucessivas, e a radioatividade é, então, contada por cintilação líquida.

## - Procedimento experimental

Logo após a dissecação da área cerebral em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

Os homogenatos, contendo 50-100  $\mu\text{g}$  de proteína, foram incubados em tampão tris-HCl modificado (50 mM, pH 7,4). No caso dos receptores  $D_1$ -símile, o tampão continha 0,115 a 9,2 nM de [ $^3\text{H}$ ]-SCH 23390 para experimentos de saturação. No caso dos receptores  $D_2$ -símile, o tampão continha 10  $\mu\text{M}$  de mianserina (incubada por 30 minutos à temperatura ambiente) para bloquear os receptores serotoninérgicos, e 0,09 a 4,76 nM de [ $^3\text{H}$ ]-espiroperidol para experimentos de saturação. Em ambos os ensaios, os respectivos ligantes eram incubados na presença e na ausência de dopamina 100  $\mu\text{M}$  (durante 10 minutos), no caso dos receptores  $D_1$ , ou butaclamol 10  $\mu\text{M}$ , no caso dos receptores  $D_2$  sendo o volume final do ensaio de 0,2 mL.

Após incubação a 37 °C durante 60 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os discos de papel de filtro foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) contendo 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com a eficiência de 61 %. O *binding* específico foi calculado como *binding* total menos o *binding* não-específico feito na presença de dopamina 100  $\mu\text{M}$  ou butaclamol 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente para os receptores  $D_1$  e  $D_2$ , e os resultados foram expressos em femtomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

### - Soluções reagentes

#### - [<sup>3</sup>H]-espiroperidol (114 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)

5 µL de [<sup>3</sup>H]-espiroperidol foram diluídos em tampão tris-HCl, pH 7,4, de forma a obter uma concentração final de 43,28 nM.

#### - [<sup>3</sup>H]- SCH 23390 (87 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)

5 µL de [<sup>3</sup>H]-SCH 23390 foram diluídos em tampão tris HCl, pH 7,4 de forma a obter uma concentração final de 11,5 nM

#### - Tampão Tris-HCl

Seis gramas de tris-HCl (Trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para pH 7,4.

#### - Tris HCl modificado

NaCl 120 mM; KCl 1mM; CaCl<sub>2</sub> 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaEDTA 1 mM e ascorbato sódico 1 mM foram dissolvidos em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4

#### - Mianserina

Comprimidos de mianserina (Tolvon 30 mg, Organon, SP, Brasil) foram macerados e diluídos em tampão tris-HCl, obtendo-se uma concentração final de 10 µM.

#### - Dopamina (cloridrato de dopamina)

Dez mg de dopamina (Sigma) foram diluídas em 2 ml de tampão Tris-HCl, tendo uma concentração final de 5 mg/ml. A esta solução, foi acrescentado ácido ascórbico 0,1 %.

#### - Butaclamol (Cloridrato de butaclamol)

Butaclamol (RBI, MA, EUA) foi dissolvido em ácido ascórbico a 0,1%, de forma a se obter uma concentração final de 10 µM.

### - Coquetel de cintilação

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, EUA).

## 8 - Dosagem de proteína

### 8.1. Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25 °C, utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito (Lowry et al., 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica fotometricamente. Inicialmente, é feita uma reação biureto de baixa eficiência, na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Essa cor biureto é característica de todas as proteínas, e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio. Depois, o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteu, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois amonoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração foi medida em comprimento de onda de 750 nm, através de um espectrofotômetro Beckam DU 640B.

### 8.2. Soluções Reagentes

- Reagente A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2 % em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N;

- Reagente B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 0,5 % em  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1 %;

- Reagente C: Solução de cobre alcalino (24 ml do reagente A com 1 ml do reagente B, misturados no momento de usar);

- Reagente de Folin : Ciocalteau - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil), 1:1 em água bidestilada;

- Solução de albumina sérica bovina (Sigma, St Louis, MO, EUA) 1 mg/ml em água bidestilada.

## 9 – Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC

### - Método

Para a determinação dos níveis de catecolaminas, foi utilizado o equipamento de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (**Figura 3**). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna, e é carregada através da mesma por um líquido eluente. Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais rapidamente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente, ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar, no primeiro caso os solutos devem ser iônicos, e no segundo caso os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de se oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos ou coulométricos. Neste estudo, foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo, seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

### - Procedimento Experimental

Os animais foram decapitados 30 min ou 48 h após a última injeção e, imediatamente, tiveram seus cérebros dissecados sob gelo. O CE foi utilizado para preparar homogenatos a 10 %. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) por 30 s e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC (Figura 3), para a análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3  $\mu\text{m}$ , da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahydrofurano 1,7 % v/v. Dopamina (DA), DOPAC (Ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), Ácido homovanílico (HVA), Serotonina (5-HT), Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) e Noradrenalina (NE) foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl.



**Figura 3-** Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica. Laboratório de neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC

## - Soluções Reagentes

### ↳ Fase Móvel

Foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (grupo química, RJ, Brasil) e completado para um volume de 400 mL com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mg (Sigma, MO, EUA) e completado o volume para 471,5 ml com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 ml de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 ml de tetrahydrofurano (Sigma, MO, EUA) para um volume final de 500 ml.

### ↳ Ácido Perclórico 0,1 M

Foram adicionados 1,8 ml de ácido perclórico (Sigma, MO, EUA) em um balão volumétrico e completado o volume para 300 ml.

### ↳ Padrões

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng de NE, DA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculadas no programa *Microsoft Excel* em um computador PC e os resultados expressos em ng/g de tecido

## 10- Determinação de Aminoácidos

### - Método

Para a determinação dos níveis de aminoácidos, foi utilizado o equipamento de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) com detector de fluorescência. A espectroscopia de fluorescência pode ser usada como um método de detecção específica, e é um dos mais sensíveis para compostos que flourescem. Fluorescência pode ser desenvolvida em compostos não fluorescentes por reações de derivatização realizadas pré ou pós-coluna.

## - Procedimento Experimental

Os animais foram decapitados 48 h após a última injeção e, imediatamente, tiveram seus cérebros dissecados sobre gelo. O CE foi utilizado para preparar homogenatos a 10 %. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) por 30 s e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. O sobrenadante foi separado e filtrado através de uma membrana (millipore- 0,2  $\mu\text{m}$ ) e posteriormente associado a uma solução de derivatização pré-coluna, para obtenção de fluorescência, em uma proporção de 1:1. Um minuto depois do início dessa associação uma alíquota de 20  $\mu\text{l}$  foi retirada e injetada no equipamento de HPLC para a análise química.

Para a análise dos aminoácidos, uma coluna CLC-ODS (M) com comprimento de 15 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3  $\mu\text{m}$ , da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel foi utilizada em gradiente utilizando duas fases: A-  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (50mM) e metanol (20%, v/v) em pH 5,5; B- Metanol puro (100 %). Aspartato (ASP), Glutamato (GLU), Glutamina (GLN) e Tirosina (TIR) foram detectados usando um detector de fluorescência (Modelo RF-535 da Shimadzu, Japão) com comprimento de ondas de EX-Wavelength (370 nm) e EM-Wavelength (450 nm). Os cromatogramas foram registrados e quantificados por um computador usando um software da Shimadzu. A quantidade dos aminoácidos foi calculada por comparação da altura dos picos obtidos com a média dos padrões e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido.

## - Soluções Reagentes

### ↳ Fase Móvel

Foram pesados 1,724 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (grupo química, R.J., Brasil) e completado para um volume de 195 ml com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 5,5. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente

adicionado o metanol 50 ml (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) para um volume final de 250 ml.

#### ↳ **Ácido Perclórico 0,1 M**

Foram adicionados 1,8 ml de ácido perclórico (Sigma, MO, EUA) em um balão volumétrico e completado o volume para 300 ml com água milli-Q.

#### ↳ **Padrões**

Os padrões foram preparados e realizado uma curva de concentração com três diferentes concentrações (0,025; 0,0125 e 0,00625  $\mu\text{mol}$ ) de ASP, GLU, GLN e TIR (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculas no programa *Microsoft Excel* em um computador PC e os resultados expressos em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido.

#### ↳ **Solução de derivatização**

A preparação da solução de derivatização foi dividida em duas fases:

##### 1. Preparação do tampão Borato

Foram pesados 1,24 g de BORAX-Sodium tetraborato (Sigma-EUA) em um *becker* e adicionados 45 ml de água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 9,3 com hidróxido de sódio e completado para um volume final de 50 ml com água Milli-Q.

##### 2. Preparação da reação de derivatização (OPA-40mmol/L)

Foram pesados 27 mg de *O-Phthaldialdehyde*-OPA (Sigma-EUA) em um *becker* e adicionados 500  $\mu\text{l}$  de etanol 99% (Vetec-Brasil), 20  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol (Merck, EUA) e 4,5 ml do tampão Borato (preparado previamente). Esta solução de derivatização foi deixada por 24 h em repouso em uma temperatura em torno de 20° C. Após esse período, a solução foi utilizada no máximo por duas semanas, e após a primeira semana foi adicionado 5  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol.

## 11- Análise bioquímica

**-Obtenção das amostras:** As amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital de ratos em tubos siliconados com gel separador, e submetidas a centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro.

### MÉTODOS

#### 11.1- Glicose (Tietz, 1970)

↳ **Metodologia:** Enzimático- Glicose Oxidase

↳ **Princípio:** A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (antipirilquinonimina), cuja absorvância é medida em 505 nm e a intensidade da cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.



↳ **Reagentes:**

-Reagente de Cor: Tampão Fosfato, fenol, Glicose Oxidase, Peroxidase, 4-Aminoantipirina, preservativos, estabilizadores e ativadores.

- Padrão: 100 mg/dL;

- conservar entre 2-8 °C;

- armazenar bem vedado para evitar evaporação;

- estável entre 15-25 °C.

↳ **Amostra:** Soro, plasma, líquido.

↳ **Técnica:** Tomar 3 tubos e proceder como a seguir:

Tubos	Branco	Padrão	Teste
Amostra	-	-	0,01 mL
Padrão	-	0,01 mL	-
Reagente de cor	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho-maria a 37 °C, 15 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 505 nm, acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

↳ **Cálculo:**

- Método (1) – Abs do Teste/ Abs do Padrão x 100= mg/dL
- Método (2) – Abs do Teste x Fator de Calibração= mg/dL

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{fator}$$

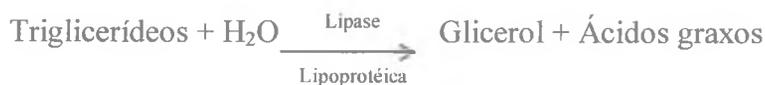
$$\text{Fator de Calibração} = \text{Conc. do padrão} / \text{Abs do padrão}$$

↳ **Linearidade:** A reação é linear até 400 mg/dL

## 11.2. Triglicerídeos (Tonks, 1970)

↳ **Metodologia:** Enzimático-Trinder

↳ **Princípio:** Os triglicerídeos são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e o glicerol liberado é fosforilado pela glicerol quinase, formando glicerol fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona, e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através da reação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com a 4-aminoantipirina e ESPAS, produzindo a antipirilquinonimina, cuja absorbância, medida em 540 nm, é diretamente proporcional à concentração de triglicerídios.



\*ESPAS= N-etil-N(3-sulfopropil)-m-anisidina/surfatante

#### Reagentes:

- Reagente de Cor: Tampão Fosfato, Lipase Lipoproteica, ATP, Glicerol Quinase,  $\text{Mg}^{++}$ , Glicerol-3-Fosfato Oxidase, 4-Aminoantipirina, Azida Sódica.

- Padrão: 100 mg/dL;
- conservar entre 2-8 °C;
- armazenar bem vedado para evitar evaporação;
- estável entre 15-25 °C.

Amostra: Soro.

Técnica: Tomar 3 tubos e proceder como a seguir:

Tubos	Branco	Padrão	Teste
Amostra	-	-	0,01 mL
Padrão	-	0,01 mL	-
Reagente de cor	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho-maria a 37 °C, 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 510 nm, acertando o zero com o branco.

↳ **Cálculo:**

- Método (1)– Abs do Teste/ Abs do Padrão x 100= mg/dL
  - Método (2)– Abs do Teste x Fator de Calibração= mg/dL
- Triglicerídeos (mg/dL)= Absorbância do teste x fator  
Fator de Calibração = Conc. do padrão / Abs do padrão

↳ **Linearidade:** A reação é linear até 800 mg/dL

### 11.3. Colesterol Total (Tonks, 1970)

↳ **Metodologia:** Enzimático-Trinder

↳ **Princípio:** Os ésteres do colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase formando colesterol livre que, após oxidação pela colesterol oxidase, forma peróxido de hidrogênio. Este, reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, através de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase, produz uma quinonimina de cor vermelha, cuja absorvância, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.



↳ **Reagentes de Cor:** Tampão Fosfato, Colesterol Esterase, Colesterol Oxidase, Peroxidase, 4-aminoantipirina, Fenol, Azida Sódica.

- Padrão: 200 mg/dL .Conservar entre 2-8 °C.

☞ **Amostra:** Soro.

☞ **Técnica:** Tomar 3 tubos e proceder como a seguir:

Tubos	Branco	Padrão	Teste
Amostra	-	-	0,01 mL
Padrão	-	0,01 mL	-
Reagente de cor	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho-maria a 37 °C, 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm, acertando o zero com o branco.

☞ **Cálculo:**

- Método (1) – Abs do Teste/ Abs do Padrão x 200= mg/dL
- Método (2) – Abs do Teste x Fator de Calibração= mg/dL  

$$\text{Colesterol Total (mg/dL)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{fator}$$

$$\text{Fator de Calibração} = \text{Conc. do padrão} / \text{Abs do padrão}$$

#### 11.4 - Colesterol HDL (Tonks, 1970)

☞ **Metodologia:** Enzimático-Trinder

☞ **Princípio:** As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e os quilomícrons são quantitativamente precipitados com a mistura de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação, o colesterol ligado as lipoproteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante por método colorimétrico enzimático.

### ↳ Reagentes:

- Reagente de cor: Tampão Fosfato, Colesterol Esterase, Colesterol Oxidase, Peroxidase, 4-aminoantipirina, Fenol, Azida Sódica;

- Sobrenadante;

- Padrão: 40 mg/dL;

-estável entre 15-25°C.

### ↳ Amostra: Soro.

↳ **Técnica:** Em um tubo de ensaio 12 x 75 colocar 0,25 mL de soro e 0,25 mL da solução precipitada. Agitar vigorosamente durante 30 segundos. Centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos.

Tubos	Branco	Padrão	Teste
Sobrenadante	-	-	0,1 mL
Padrão	-	0,1 mL	-
Reagente de cor	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho-maria a 37 °C, 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm, acertando o zero com o branco.

### ↳ Cálculo:

- Método (1) – Abs do Teste/ Abs do Padrão x 40= mg/dL

↳ **Linearidade:** A reação é linear até 120 mg/dL

## 11.5. Apolipoproteína A-I e B (Tonks, 1970; Tietz, 1970)

↳ **Metodologia:** Turbidimétrica

↳ **Princípio:** Princípio do Método

A turbidimetria baseia-se na detecção óptica de partículas muito pequenas, suspensas em meio líquido. Quando um anticorpo (apoA-I ou apoB) e a amostra (antígeno) são misturados, formam-se, por esta reação, imunocomplexos. A diluição adquire turbidez, a qual é proporcional à quantidade de antígeno. Este método é chamado de homogêneo, pois não possui fase sólida.

### 11.6. Alanina Aminotransferase (ALT/TGP/GPT ) (Tonks, 1970; Tiestz, 1970)

↳ **Metodologia:** Cinética-UV.

↳ **Princípio:** A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com a formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD<sup>+</sup>. A conseqüente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



↳ **Reagentes:**

-Reagente de Uso: Alfa-cetoglutarato, L-alanina, Azida sódica, Tampão Tris pH 7.8, NADH e LDH. Conservar entre 2-8 °C.

↳ **Amostra:** Soro, plasma.

↳ **Técnica:** Pipetar 1,0 mL do Reagente de Uso, em um tubo de ensaio (12x75), e adicionar 0,1 mL de amostra. Homogeneizar e transferir para a cubeta termostatizada e esperar 1 min. Fazer a leitura da absorbância inicial (A<sub>1</sub>), disparando simultaneamente o cronômetro. Repetir a leitura após 2 minutos (A<sub>2</sub>). Calcular a média das absorbâncias por minuto (ΔA/ min.) e utilizá-la no cálculo.

↳ **Cálculo:**

- Método (1) : 340 nm =  $\Delta A / \text{min.} \times 1746 = \text{U/L}$
- Método (2) : 334 nm =  $\Delta A / \text{min.} \times 1780 = \text{U/L}$
- Método (3) : 365 nm =  $\Delta A / \text{min.} \times 3235 = \text{U/L}$

ALT (U/L) =  $\Delta A$  (Absorbância do teste) / min. x fator

Fator de Calibração =  $V_T \times 1000 / \epsilon \times V_A \times d$

$V_T$  = volume total do ensaio

1000 = conversão de U/mL em U/L

$\epsilon$  = absorvidade milimolar do NADH em nm

$V_A$  = volume da amostra

$d$  = espessura da solução

↳ **Linearidade:** A reação é linear até 500 U/L

### 11.7. Aspartato Aminotransferase (AST/TGO/GOT) (Tonks, 1970; Tiestz, 1970)

↳ **Metodologia:** Cinética-UV.

↳ **Princípio:** A AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a  $\text{NAD}^+$ . A consequente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



### ↳ Reagentes:

-Reagente de Uso: Alfa-cetoglutarato, L-aspartato, Azida sódica, Tampão Tris pH 7.8, NADH, LDH e MDH. Conservar entre 2-8 °C.

### ↳ Amostra: Soro, plasma.

↳ **Técnica:** Pipetar 1,0 mL do Reagente de Uso, em um tubo de ensaio (12x75), e adicionar 0,1 mL de amostra. Homogeneizar e transferir para a cubeta termostaticada e esperar 1 min. Fazer a leitura da absorbância inicial ( $A_1$ ), disparando simultaneamente o cronômetro. Repetir a leitura após 2 minutos ( $A_2$ ). Calcular a média das absorbâncias por minuto ( $\Delta A/\text{min.}$ ) e utilizá-la no cálculo.

### ↳ Cálculo:

- Método (1) : 340 nm=  $\Delta A/\text{min.} \times 1746 = \text{U/L}$
- Método (2) : 334 nm=  $\Delta A/\text{min.} \times 1780 = \text{U/L}$
- Método (3) : 365 nm=  $\Delta A/\text{min.} \times 3235 = \text{U/L}$

$\text{AST (U/L)} = \Delta A (\text{Absorbância do teste}) / \text{min.} \times \text{fator}$

$\text{Fator de Calibração} = V_T \times 1000 / \epsilon \times V_A \times d$

$V_T$  = volume total do ensaio

1000= conversão de U/mL em U/L

$\epsilon$  = absorvidade milimolar do NADH em nm

$V_A$  = volume da amostra

$d$  = espessura da solução

↳ **Linearidade:** A reação é linear até 500 U/L

## 12 - Análise estatística

A análise estatística dos dados foi acompanhada por um computador PC, utilizando o programa *Instar*. Para comparação de dados não paramétricos foram

utilizados os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney como testes *post hoc*. Já nos dados paramétricos, o teste “t” de Student foi utilizado para comparação de médias de dois grupos e Análise de Variância (Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*) para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em  $p < 0,05$ .

## **CAPÍTULO I**

**Efeitos do etanol sozinho ou associado com drogas antagonistas glutamatérgica, dopaminérgica e opióide em testes comportamentais em ratos e camundongos**

## INTRODUÇÃO

A atividade locomotora espontânea (ALE) em roedores tem recebido muita atenção, como um modelo potencial para identificar efeitos estimulante e depressor do etanol no SNC, após sua ingestão ou administração (Phillips & Shen 1996; Dudek et al., 1991). Estudos prévios mostram que o tratamento repetido, com doses relativamente altas de etanol, diminui a ALE em roedores, enquanto pequenas doses têm mostrado um aumento da locomoção (Cohen et al., 1997; Phillips et al., 1995).

Efeito estimulante de baixas doses de etanol aparecem rapidamente após a administração da droga (Dudek et al., 1991), e o curso do tempo da estimulação em animais é comparado ao efeito estimulante e de euforia encontrado em humanos, após a ingestão de etanol (Lukas & Mendelson, 1988). Pesquisas têm demonstrado que os sistemas dopaminérgico, glutamatérgico e gabaérgico estão envolvidos na determinação do comportamento locomotor (Cohen et al., 1997; Phillips and Shen, 1996; Phillips et al., 1995). Segundo Phillips et al. (1995) a via dopaminérgica que se projeta da área tegmentar ventral até o NAc, e as regiões do pálido ventral até a substância inominata, onde o GABA e o glutamato desempenham papel na alteração da atividade desta via dopaminérgica, são as regiões de maior importância do controle locomotor.

O aumento da atividade locomotora após administração repetida de drogas, como o etanol, é um fenômeno conhecido como sensibilização (Lessov & Phillips, 1998) e é utilizado como um modelo para o estudo de alterações comportamentais produzidas por drogas de abuso (Hunt and Lands 1992), e para induzir psicose em humanos (Wise & Leeb, 1993). Alguns trabalhos mostram que antagonistas dopaminérgicos bloqueiam o efeito da sensibilização induzida por etanol (Mithani et al., 1986; Planeta et al., 1995) e fortalecem a hipótese de que o sistema dopaminérgico está envolvido na estimulação locomotora induzida por muitas drogas de abuso, incluindo o etanol.

Por outro lado, existem evidências anatômicas e farmacológicas que mostram uma relação entre os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, bem como entre os sistemas dopaminérgico e opióide no comportamento locomotor induzido por muitas

drogas de abuso e psicoestimulantes (Swedlow et al., 1987; Houdi et al., 1989; Planeta et al., 1995).

O etanol através de sua ação no sistema gabaérgico, aumentando o influxo de cloro, afeta também a coordenação motora em ratos e camundongos verificada através do teste de *rota rod* (Czarnecka & Pietrzak, 1991; Zaleski et al., 2001). Este efeito é menos pronunciado em cepas de ratos mais sensíveis geneticamente (ratos com preferência por álcool) ao efeito etanol (Schuckit, 1988).

## OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi determinar os efeitos comportamentais do etanol (testes de ALE e *rota rod*) em ratos e camundongos, variando o tempo de tratamento e o tempo de retirada da droga, bem como verificar os efeitos de antagonistas dos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide, administrados em associação com o etanol ou após a retirada deste.

## RESULTADOS

A atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos, após uma única administração de etanol (0,5 ou 4 g/kg, v.o.) em função do tempo de retirada, está apresentada na **Figura 1**. A ALE não foi alterada de maneira significativa após a administração de etanol em nenhuma dose, após 30 minutos de sua retirada, quando comparadas ao controle ( $8,7 \pm 0,74$ ) [KW=3,362; p=0,1862]. Contudo, uma diminuição [KW=9,103; p=0,0106] deste comportamento foi observada apenas com a maior dose de etanol ( $4,76 \pm 0,92$ ) e após 48 h, quando comparado ao controle ( $7,0 \pm 0,75$ ) [ $U^{\prime}=139,5$ ; p=0,0287] e ao grupo tratado com etanol na dose de 0,5 g/kg, v.o. ( $9,0 \pm 1,1$ ) [ $U^{\prime}=147$ ; p=0,0109].

A **Figura 2** mostra a ALE em ratos após a administração de etanol (0,5; 2 ou 4 g/kg, v.o.) durante 7 dias de tratamento e com dois tempos de retirada. Novamente, nenhuma alteração foi observada na ALE após a administração de etanol em três diferentes doses (Et 0,5:  $8,6 \pm 1,5$ ; Et 2:  $6,9 \pm 1,3$  e Et 4:  $8,8 \pm 1,0$ ) e com um tempo de retirada de 30 minutos, quando comparado ao controle ( $7,8 \pm 1,4$ ) [KW=1,454; p=0,6930]. Entretanto, uma diminuição [KW=9,215; p=0,0266] do comportamento locomotor foi observado após a administração de etanol (4 g/kg) ( $3,2 \pm 0,76$ ) e com retirada de 48 h, quando comparada ao grupo controle ( $7,1 \pm 0,8$ ) [ $U^{\prime}=97,500$ ; p=0,0029] e etanol 0,5 g/kg ( $7,5 \pm 1,2$ ) [ $U^{\prime}=140,5$ ; p=0,0145]. Uma diminuição não significativa também foi observado na grupo tratado com etanol 2 g/kg ( $4,4 \pm 1,1$ ), quando comparada ao grupo controle ou ao etanol 0,5 g/kg.

A ALE foi também observada imediatamente após a administração de etanol (0,5 ou 4 g/kg, v.o.) em dois tempos de observação (1<sup>o</sup> ou 7<sup>o</sup> dia), durante o tratamento, e após um período mais longo de retirada (7 ou 21 dias) do etanol. Ainda nesse protocolo, dois tempos de observação dos animais foram utilizados (3 e 10 min). Os resultados da **Figura 3-A**, mostram que durante o tratamento, nenhuma alteração significativa foi observada nos animais tratados com etanol 0,5 ou 4 g/kg, quando comparados ao controle (1<sup>o</sup>:  $13,0 \pm 1,1$ ; 7<sup>o</sup>:  $12,2 \pm 1,8$ ). Entretanto, no período de retirada, uma diminuição da ALE foi observada, com ambas as doses (Et 0,5:  $2,0 \pm 0,5$ ; Et 4:  $3,5 \pm 1,0$ ), apenas 21 dias após a retirada da droga [KW=12,412; p=0,0020] quando comparadas ao controle ( $6,8 \pm 1,1$ ). Contudo, uma tendência à diminuição da ALE, em

relação ao controle, foi observada apenas com a maior dose de etanol no 7<sup>o</sup> dia após a retirada da droga.

Na **Figura 3-B**, onde o tempo de observação dos animais no campo aberto foi aumentado para 10 minutos, uma diminuição da ALE foi observada após a administração de etanol na dose de 4 g/kg, tanto no 1<sup>o</sup> dia (22,3±2,3) [KW= 7,040; p= 0,0296] quanto no 7<sup>o</sup> dia (21,3±3,1) [KW= 6,543; p= 0,0380] de tratamento, em relação ao grupo controle (1<sup>o</sup>: 34,7±3,1; 7<sup>o</sup>: 33,6±3,8). Essa diminuição continuou durante o período de 7 (19,7±1,3) e 21 (8,1±1,3) dias após a retirada da droga quando comparado ao controle (7<sup>o</sup>: 28,2±2,5; 21<sup>o</sup>:18,3±2,1). Esse resultado somente foi significativo estatisticamente após 21 dias da retirada do etanol [KW=18,414; p=0,0001]. Por outro lado, o etanol na dose de 0,5 g/kg, somente apresentou uma tendência à diminuição da ALE após o 7<sup>o</sup> dia de tratamento (25,4±1,9), quando comparado ao controle (33,6±3,8). Contudo, após o período de retirada de 21 dias essa diminuição (69 %) [U'=98,500; p<0,0001] foi significativa.

## Resultados dos Protocolos 1 e 2

A ALE de ratos foi determinada na presença de etanol e/ou ketamina, haloperidol e naltrexona nos dois protocolos. No protocolo 1 os antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide foram administrados após exposição prévia ao etanol e no protocolo 2 o etanol e esses antagonistas foram administrados associados após o sétimo dia de tratamento com etanol (conforme descrito em materiais e métodos). Os resultados do protocolo 1 e 2 estão descrito abaixo:

### Protocolo 1:

A **Figura 4** mostra os resultados da administração de ketamina após a retirada de etanol (Et+ketamina-1), bem com a administração de ketamina (25 mg/kg, i.p.) ou etanol (4 g/kg,v.o.) sozinhos durante um período de sete dias. No grupo da retirada, os animais foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com ketamina até o 14<sup>o</sup> dia, sendo a ALE observada com 30 min ou 48 h após a última administração da droga. Não foi encontrada nenhuma alteração na ALE [KW= 3,027; p=0,3876] em nenhum dos grupos após 30 min (**Figura 4-A**) de

retirada, quando comparada aos valores do controle ( $7,9 \pm 0,6$ ). Efeito semelhante foi observado com os grupos no qual a ALE foi observada após 48 h da última administração da droga (**Figura 4-B**), exceto por uma diminuição na ALE [KW= 9,055;  $p=0,0286$ ], observada após o tratamento com etanol (53,6 %) [ $U'=231,50$ ;  $p=0,0014$ ].

Uma diminuição da ALE, após 30 min de retirada (**Figura 5-A**), foi observada nos grupos do haloperidol sozinho ( $0,2 \pm 0,1$ ) ou no grupo Et+haloperidol-1 ( $0,81 \pm 0,6$ ). Esses resultados foram diferentes tanto em relação ao grupo controle ( $7,9 \pm 0,6$ ), quanto ao grupo tratado com etanol ( $8,8 \pm 1,0$ ) [KW=38,796;  $p<0,0001$ ]. Com o tempo de retirada de 48 h (**Figura 5-B**), a ALE do grupo tratado apenas com haloperidol ( $6,0 \pm 1,1$ ), voltou aos níveis do controle ( $6,9 \pm 0,7$ ), porém no grupo Et+haloperidol-1 ( $4,0 \pm 1,1$ ) esse comportamento continuou diminuído em relação ao controle e semelhante aos valores de etanol sozinho ( $3,2 \pm 0,7$ ) [KW= 10,956;  $p<0,0120$ ]. Esse grupo não foi diferente ao grupo tratado apenas com haloperidol, embora tenha sido observada uma tendência à diminuição da ALE.

A naltrexona foi também utilizada após a retirada do etanol (Et+naltrexona-1), e os resultados estão apresentados na **Figura 6**. Nenhum efeito foi observado com a naltrexona ( $7,8 \pm 1,3$ ) ou com Et+naltrexona-1 ( $8,4 \pm 1,3$ ), 30 min após a última administração (**Figura 6-A**), comparado ao grupo controle ( $7,9 \pm 0,6$ ) e etanol ( $8,8 \pm 1,0$ ) [KW=0,8084;  $p=0,8475$ ]. Contudo, uma diminuição da ALE [KW=11,043;  $p=0,0115$ ], 48 h após a última administração (**Figura 6-B**), foi observada com esse antagonista opióide, sozinho ( $5,0 \pm 1,0$ ) ou após a retirada de etanol ( $4,8 \pm 1,3$ ) [ $U'=173,50$ ;  $p=0,0391$ ], quando comparado ao grupo controle ( $6,9 \pm 0,7$ ). Deve-se resaltar que os seus valores não foram diferentes dos animais tratados apenas com etanol ( $3,3 \pm 0,7$ ).

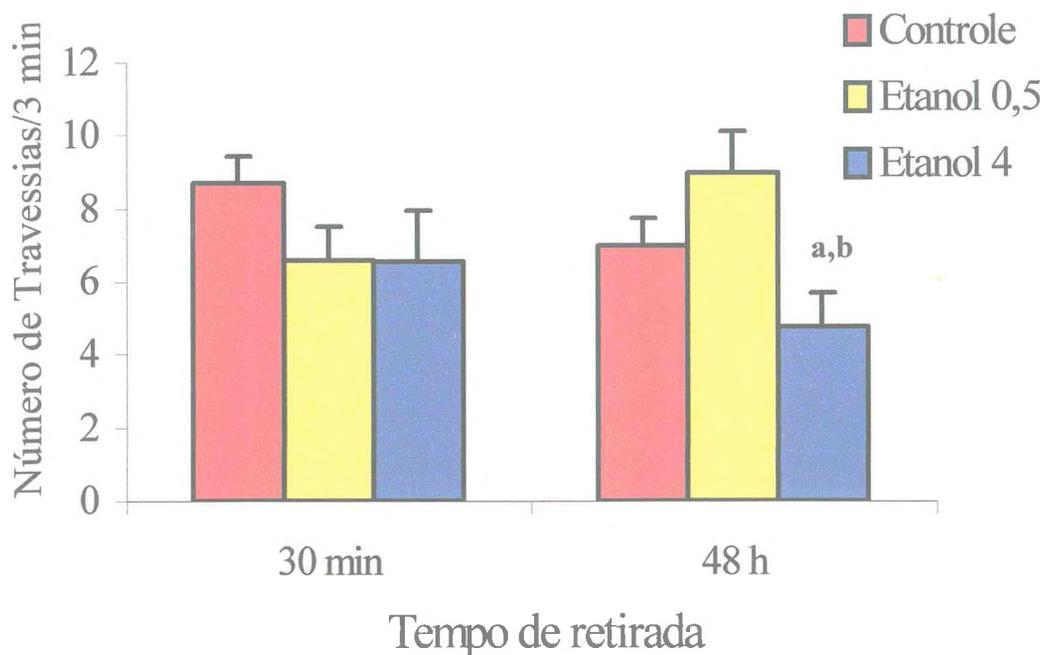
## Protocolo 2:

A **Figura 7** mostra os resultados da administração associada de etanol + ketamina (Et+ketamina-2) e de ketamina ou etanol sozinhos. No grupo da associação, os animais foram tratados somente com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a ketamina foi administrada e o tratamento continuou até o 14<sup>o</sup> dia. O teste de ALE foi observado 30 min (**A**) ou 48 h (**B**) após o último dia de tratamento dos animais. Nenhuma alteração significativa [KW= 6,218;  $p=0,1015$ ] foi

observada na ALE de ratos (**Figura 7-A**) após a administração do etanol e/ou ketamina quando comparada ao controle ( $7,9 \pm 0,6$ ). Todavia, foi observada uma tendência à diminuição desse comportamento, no grupo tratado com a associação, quando comparado aos demais grupos. A ALE realizada 48 h (**Figura 7-B**) após a retirada das drogas também não apresentou nenhuma alteração [KW= 4,663; p=0,1982] nesse comportamento quando comparado ao grupo controle ( $6,9 \pm 0,72$ ).

Na **Figura 8**, na qual o etanol foi associado com um antagonista dopaminérgico (Et+haloperidol-2), esse grupo da associação ( $1,7 \pm 0,4$ ) continuou apresentando uma diminuição da ALE [KW= 38,017; p=0,0001], 30 min (**Figura 8-A**) após sua retirada, quando comparada aos grupos controle ( $7,9 \pm 0,6$ ) [ $U'=376,00$ ; p<0,0001] e etanol sozinho ( $7,1 \pm 0,9$ ) [ $U'=159,50$ ; p<0,0001]. Entretanto, apresentaram comportamento locomotor maior quando comparado ao grupo tratado apenas com haloperidol ( $0,2 \pm 0,1$ ) [ $U'= 91,00$ ; p=0,0101]. Por outro lado, após 48 h (**Figura 8-B**) da retirada das drogas nenhum efeito [KW=1,274; p=0,7353] foi observado no comportamento locomotor do animal quando comparado ao controle ( $6,9 \pm 0,72$ ).

Nenhuma alteração foi observada na ALE, após 30 min da retirada das drogas (**Figura 9-A**), dos animais tratados com etanol e/ou naltrexona quando comparada ao controle ( $7,9 \pm 0,6$ ) [KW=1,914; p=0,5904]. No entanto, uma diminuição desse comportamento [KW=10,043; p=0,0182] foi observada 48 h (**Figura 9-B**) após a administração do etanol+naltrexona ( $3,2 \pm 0,8$ ), em relação aos grupos controle ( $6,9 \pm 0,7$ ) [ $U'=181,50$ ; p=0,0034] e etanol ( $7,8 \pm 1,4$ ) [ $U'=128,00$ ; p=0,0175].



**Figura 1-** Atividade locomotora espontânea em ratos 30 min ou 48 h após administração de dose única de etanol (0,5 ou 4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle). Número de travessias de um quadrante para o outro foi medido por um período de 3 min. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n= 10-19). Para a análise estatística, foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle ou etanol 0,5 respectivamente.

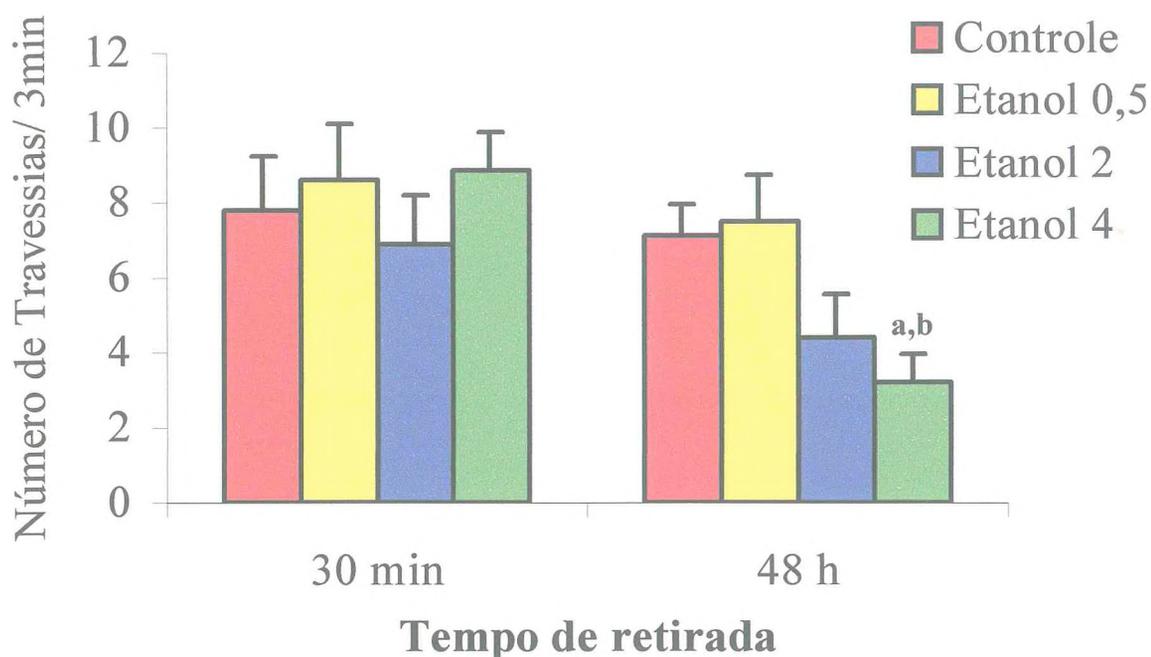
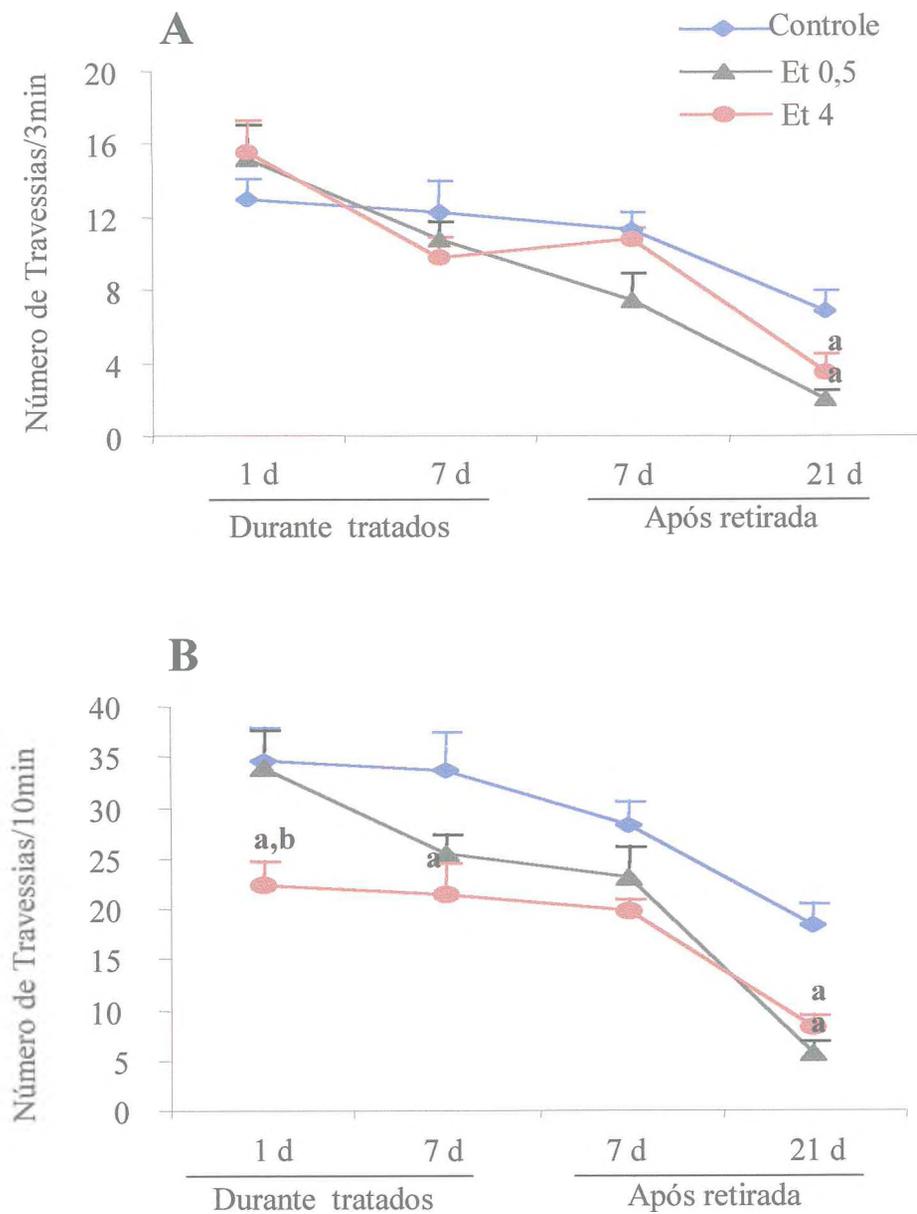
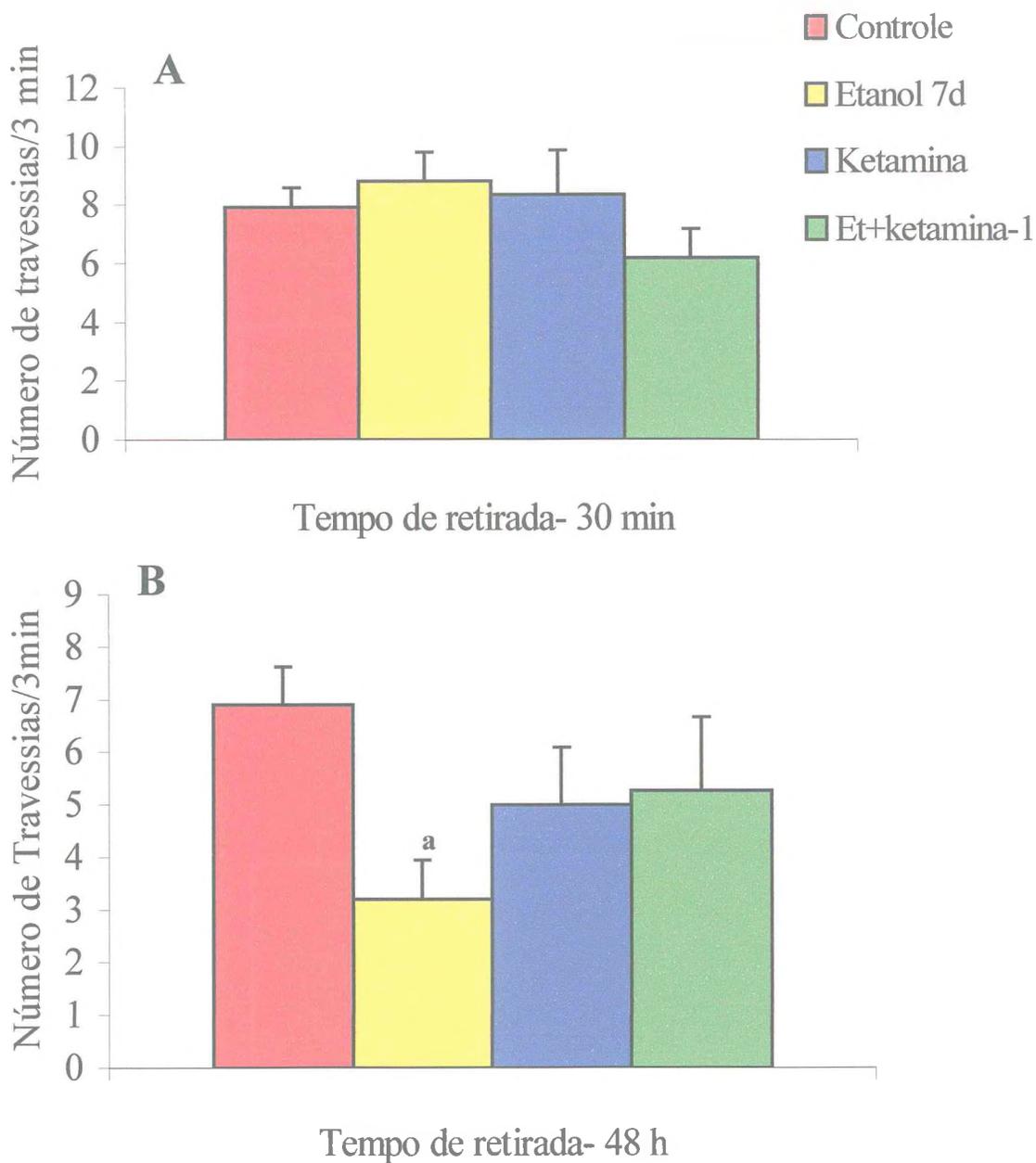


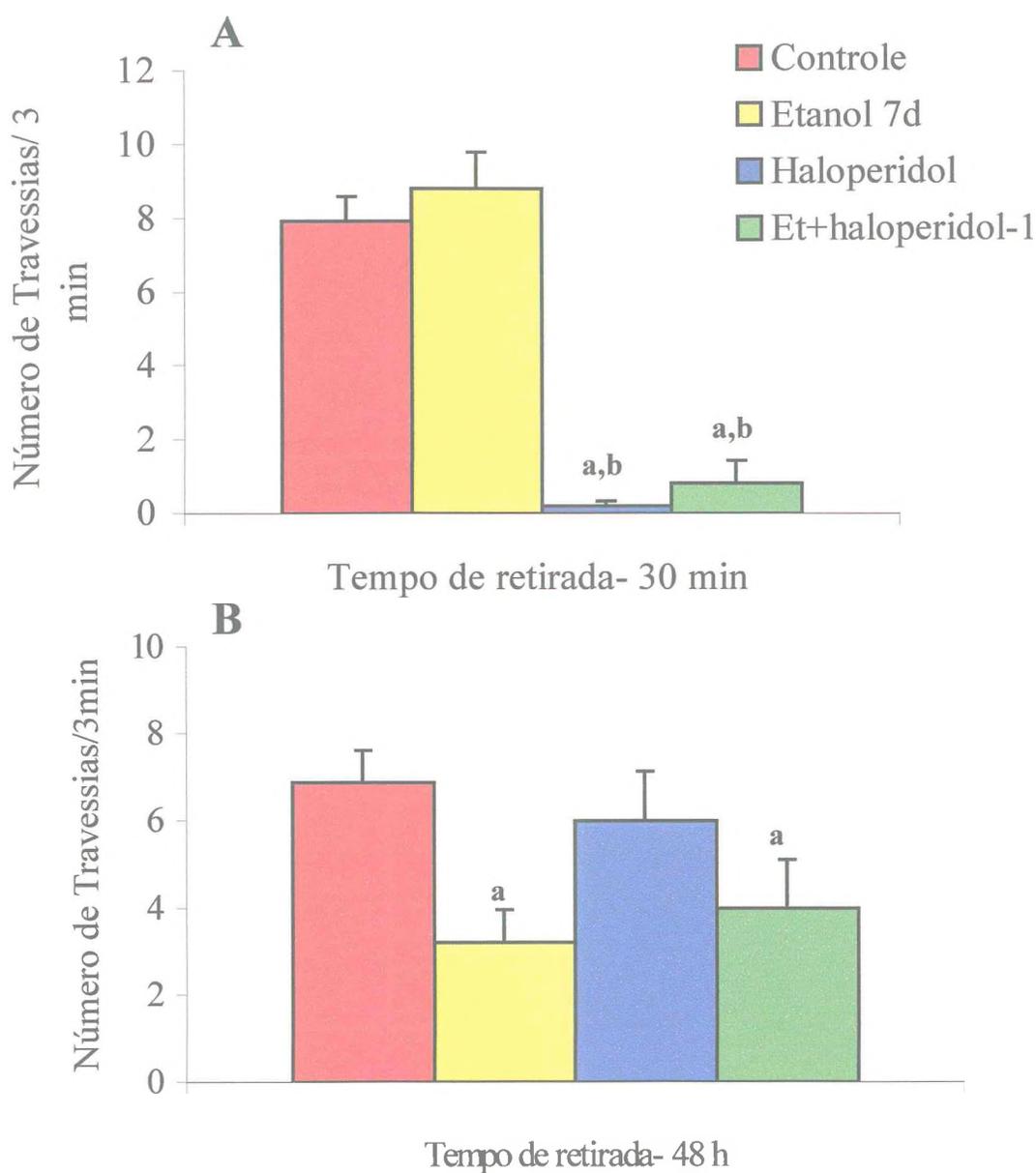
Figura 2- Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos no 7<sup>o</sup> dia de tratamento diário, após 30 min ou 48 h da última administração de etanol (0,5, 2 ou 4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle). A ALE foi determinada através do número de travessias de um quadrante para o outro em um período de 3 min. Valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n= 8-18). Para análise estatística, foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*. **a** e **b** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle e etanol 0,5 g/kg, vo, respectivamente.



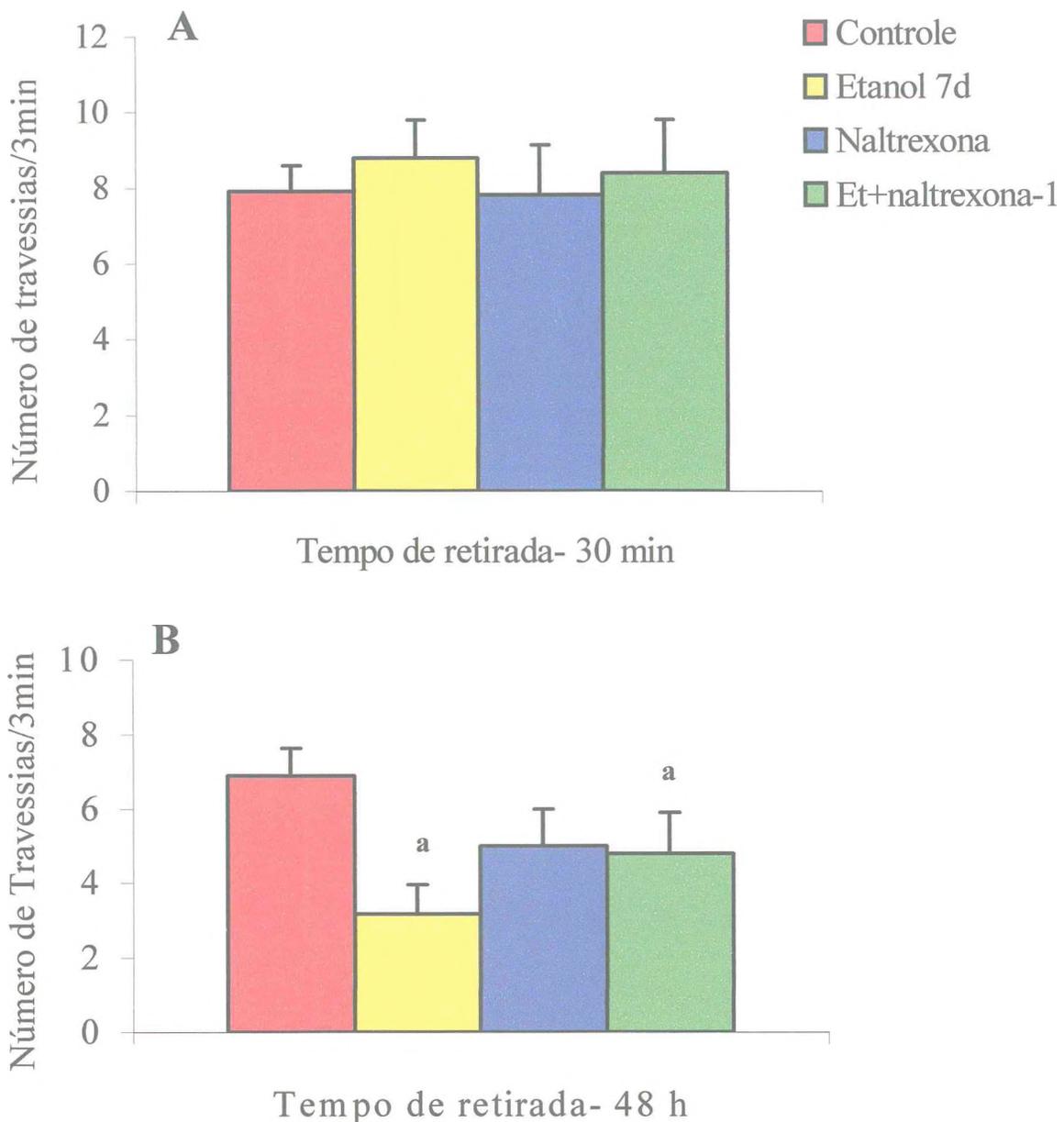
**Figura 3-** Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos no 1<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia de tratamento (imediatamente após a administração da droga) ou no 7<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia após a retirada de etanol (Et 0,5 ou Et 4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle). A ALE foi determinada através do número de travessias de um quadrante para o outro em um período de 3 (A) ou 10 min (B). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=10-12). Para a análise estatística, foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, ou etanol 0,5 g/kg, v.o., respectivamente.



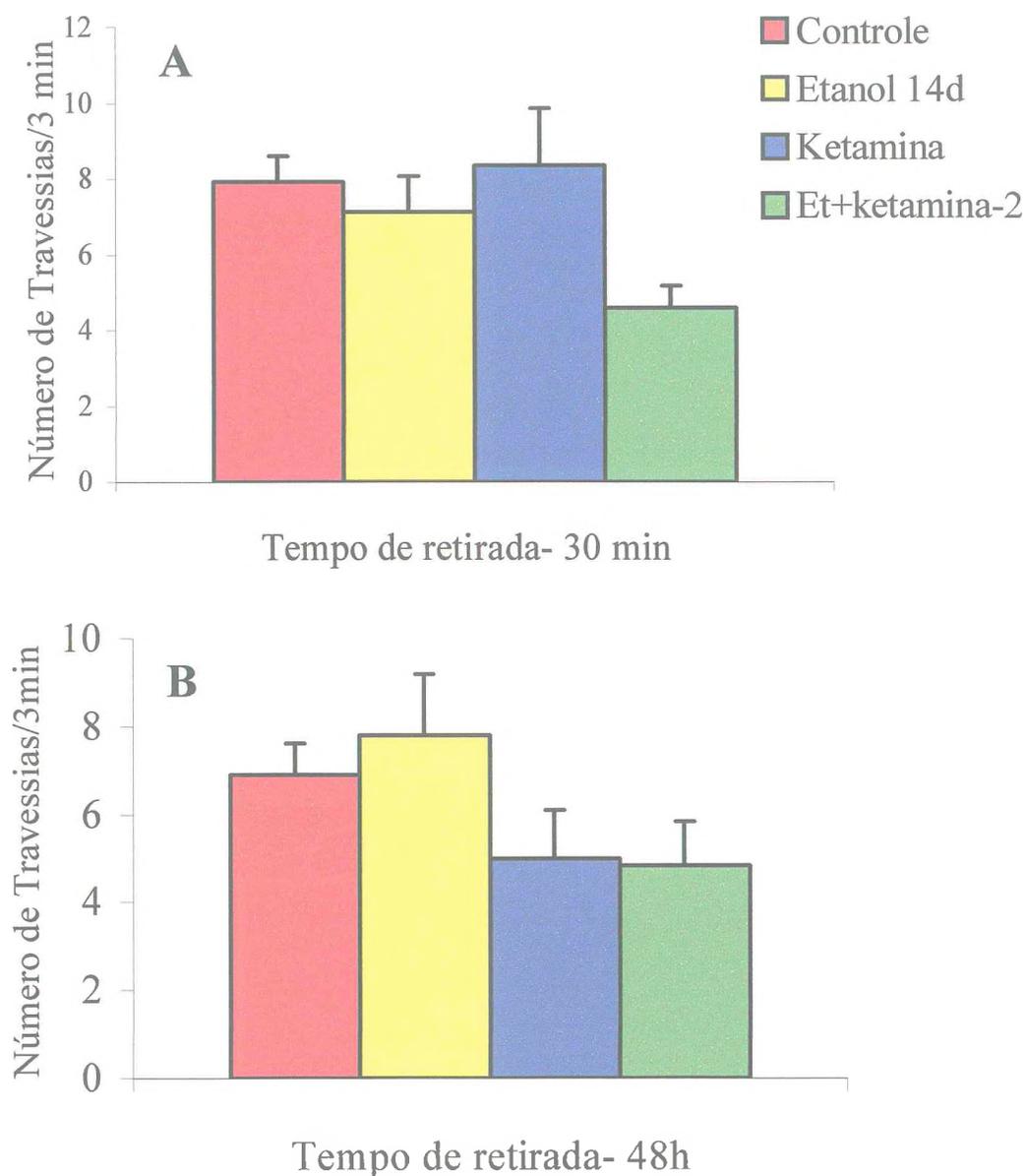
**Figura 4- Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), ketamina ou Et+ketamina-1 em função do tempo de retirada.** Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, vo), ketamina (25 mg/kg, ip) ou salina (controle). Os animais do grupo Et+ketamina-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com ketamina até o 14<sup>o</sup> dia. A ALE foi determinada 30 min (A) ou 48 h (B) após a última administração da droga. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=10-38). Para a análise estatística, foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*. a ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle.



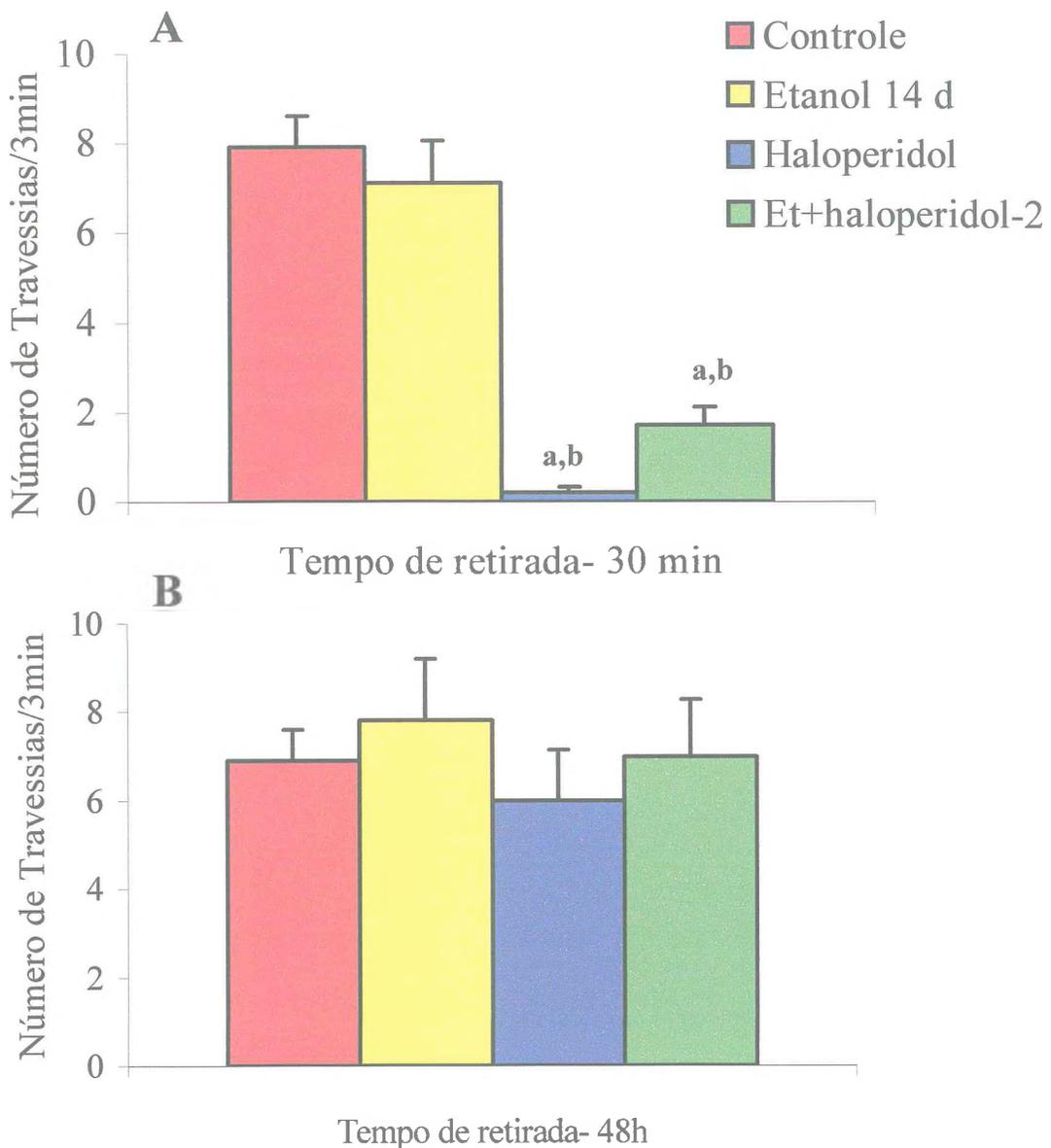
**Figura 5- Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), haloperidol ou Et+haloperidol-1 em função do tempo de retirada.** Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, vo), haloperidol (1 mg/kg, ip) ou salina (controle). Os animais do grupo Et+haloperidol-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com haloperidol até o 14<sup>o</sup> dia. A ALE foi determinada 30 min (A) ou 48 h (B) após a última administração da droga. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=10-38). Para a análise estatística, foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle ou etanol, respectivamente.



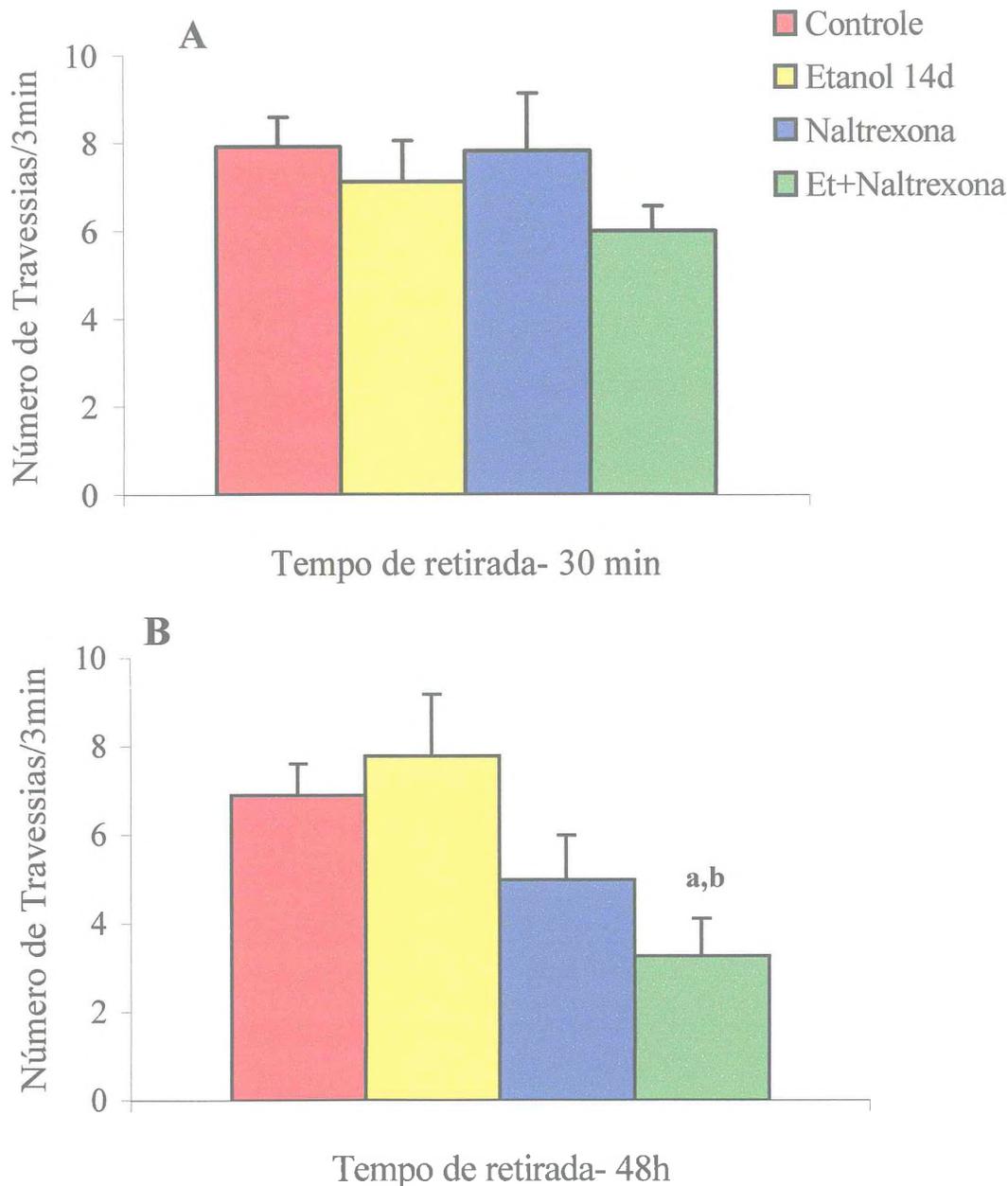
**Figura 6- Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), naltrexona ou Et+naltrexona-1 em função do tempo de retirada.** Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, vo), naltrexona (10 mg/kg, v.o.) ou salina (controle). Os animais do grupo Et+naltrexona foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com naltrexona até o 14<sup>o</sup> dia. A ALE foi determinada 30 min (A) ou 48h (B) após a última administração da droga. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=10-38). Para a análise estatística, foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*. a ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle.



**Figura 7- Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), ketamina ou Et+ketamina-2 em função do tempo de retirada.** Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) ou salina (controle). Os animais do grupo da ketamina (25 mg/g, i.p.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+Ketamina foram tratados com E até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a ketamina foi administrada e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia. A ALE foi determinada através do número de travessias de um quadrante ao outro em um período de 3 min. A ALE foi realizada 30 min (A) ou 48 h (B) após a última administração da droga. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n= 10-38). Para a análise estatística foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*.



**Figura 8 - Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), haloperidol ou Et+haloperidol-2 em função do tempo de retirada.** Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) ou salina (controle). Os animais do grupo do haloperidol (1 mg/g, i.p.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+haloperidol foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, o haloperidol foi administrado e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia. A ALE foi determinada através do número de travessias de um quadrante ao outro em um período de 3 min. A ALE foi realizada 30 min (A) ou 48 h (B) após a última administração da droga. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n= 10-38). Para análise estatística foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle ou etanol, respectivamente.



**Figura 9- Atividade locomotora espontânea (ALE) em ratos após tratamento com etanol (Et), naltrexona ou Et+naltrexona-2 em função do tempo de retirada.** Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) ou salina (controle). Os animais do grupo da naltrexona (10 mg/g, v.o.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+naltrexona foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol a naltrexona foi administrada e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia. A ALE foi determinada através do número de travessias de um quadrante ao outro em um período de 3 min. A ALE foi realizada 30 min (A) ou 48 h (B) após a última administração da droga. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n= 10-38). Para a análise estatística foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle ou etanol, respectivamente.

## - Comportamento em camundongos

### Atividade locomotora espontânea

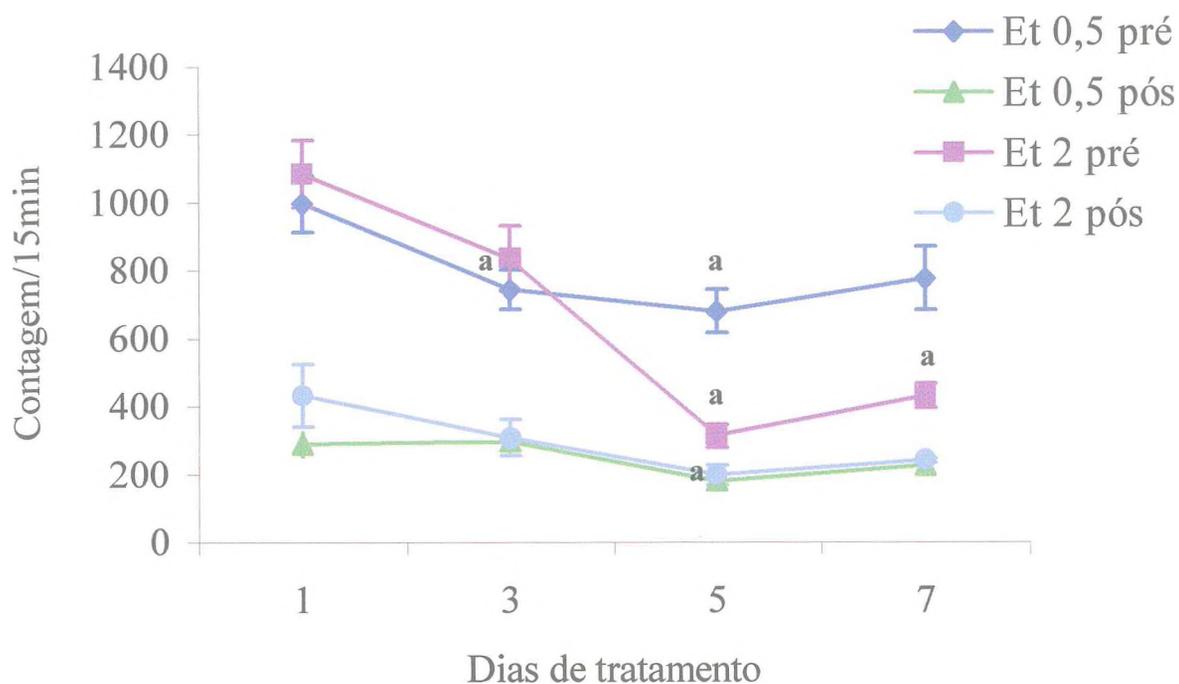
A Atividade locomotora espontânea (ALE) foi realizada na caixa de comportamento, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos como alteração motora/15 minutos. Como apresentado na **Tabela 1**, nenhuma alteração foi observada na ALE após o teste de habituação (realizado antes do tratamento) ou 15 min após o tratamento dos animais no 1<sup>o</sup> ou 7<sup>o</sup> dia, quando comparado ao controle (Habituação- 1<sup>o</sup>: 1063,7±110,7 ou 7<sup>o</sup> dia: 383,8±32,4; Tratamento- 1<sup>o</sup>: 387,9±78 ou 7<sup>o</sup> dia: 249,1±36,6), exceto por um aumento da atividade observado no 7<sup>o</sup> dia, durante o período de habituação, após o tratamento com etanol 0,5 g/kg (777,0±94,2) quanto comparado ao controle e etanol 2 g/kg (432,7±35,0).

Uma diminuição da ALE, durante o período de habituação (pré-tratamento), foi observada após administração de etanol (0,5 ou 2 g/kg, v.o.) no 3<sup>o</sup> (744,2±57,2; 836,3±96,0), 5<sup>o</sup> (681,6±63,0; 315,2±34,4) e 7<sup>o</sup> (777,0±94,2; 432,7±35,0) dia, quando comparada ao 1<sup>o</sup> dia (996,4±82,0; 1084,9±98,2, respectivamente) de habituação. Entretanto, esses valores somente apresentaram diferença estatística no 3<sup>o</sup> [ $U'=134,00$ ;  $p=0,0321$ ] e 5<sup>o</sup> [ $U'=132,00$ ;  $p=0,0092$ ] dia (no tratamento com etanol 0,5 g/kg) ou 5<sup>o</sup> [ $U'=108,00$ ;  $p<0,0001$ ] e 7<sup>o</sup> [ $U'=130,00$ ;  $p<0,0001$ ] dia (com etanol 2 g/kg). Por outro lado, nenhuma alteração foi observada no período de pós-tratamento durante o 3<sup>o</sup> (298,4±41,2; 308,5±52,6), 5<sup>o</sup> (179,9±24,7; 199,0±28,8) e 7<sup>o</sup> (227,5±22,0; 242,2±7,80) dia, quando comparada ao 1 (289,8±34,4; 432,9±92,6) dia de tratamento, exceto por uma diminuição da locomoção dos animais observado no 5<sup>o</sup> dia após tratamento com etanol na menor dose (0,5 g/kg) [ $U'=107,00$ ;  $p=0,0410$ ]. Os valores em parênteses representam média ± EPM de animais tratados com etanol 0,5 ou 2 g/kg, respectivamente).

**Tabela 1. Efeitos da administração repetida de etanol sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos realizada na caixa de comportamento.**

	Habituação		Tratamento	
	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
Controle	1063,7±110,7	383,8±32,4 (08)	387,9±78 (12)	249,1±36,6(08)
Etanol 0,5	996,4±82,0(15)	777,0±94,2(13) <b>a</b>	289,8±34,4 (13)	227,5±22,0(12)
Etanol 2	1084,9±98,2(12)	432,7± 35,0(11) <b>b</b>	432,9± 92,6(12)	242,2±7,8(11)

A ALE foi medida por 15 minutos antes (pré-habituação) e por 15 minutos após a administração (pós-tratamento) de etanol nas doses de 0,5 e 2 g/kg, v.o. durante 1<sup>o</sup> ou 7<sup>o</sup> dias de tratamento. Os valores foram expressos como média ± EPM (n= 12). Para a análise estatística, foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*. **a** e **b** (p<0,05) quando comparados ao controle e etanol 0,5 g/kg, respectivamente.



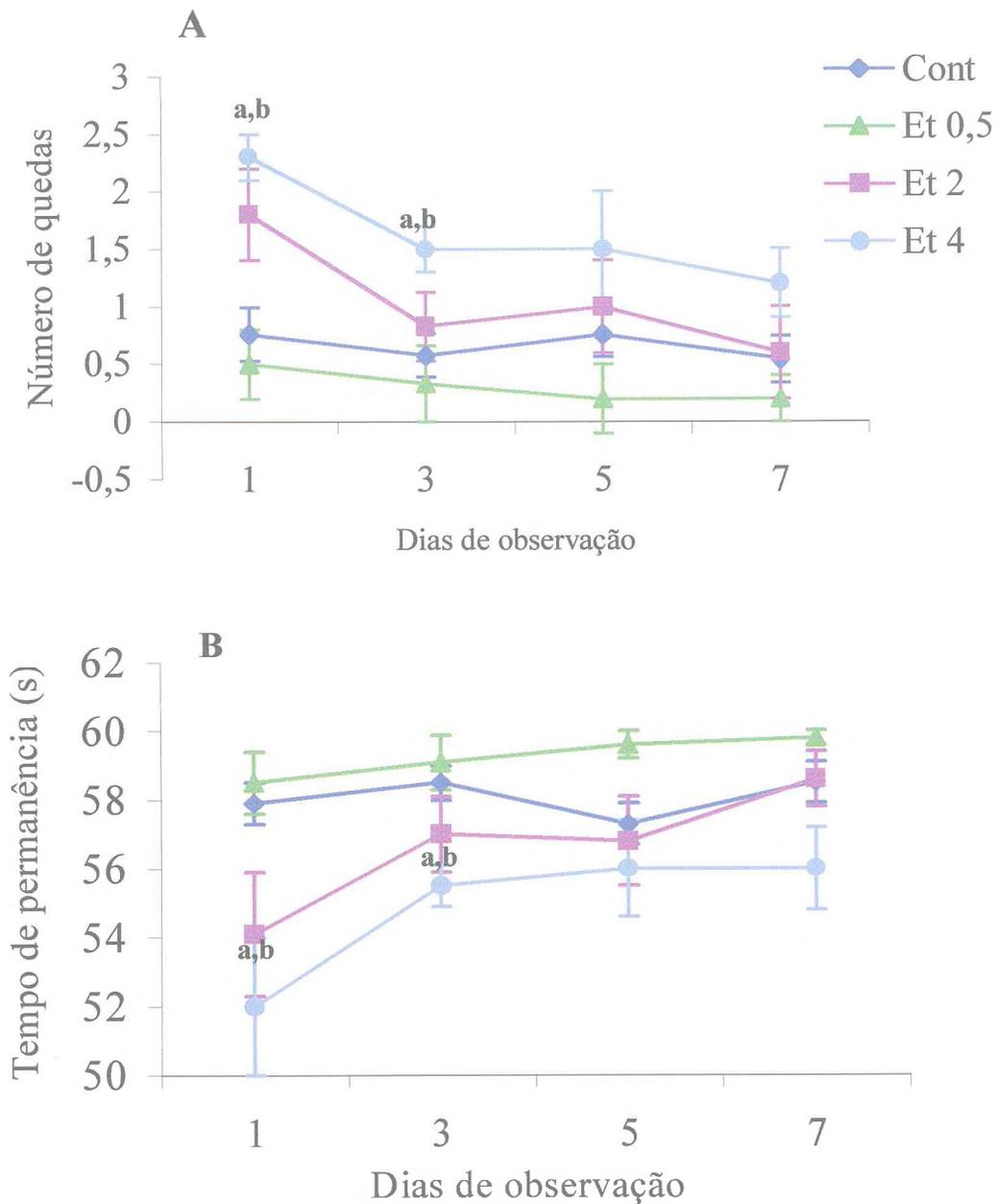
**Figura 10- Efeitos da administração diária de etanol sobre a Atividade locomotora espontânea (ALE) em camundongos.** A ALE foi medida por 15 minutos antes (pré) e por 15 minutos após a administração (pós) de etanol nas doses de 0,5 e 2 g/kg, v.o. durante o 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias de tratamento. Os números representam média  $\pm$  EPM (n=12). Para a análise estatística, foram utilizados Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney como *post hoc*. a ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao seu 1<sup>o</sup> dia de tratamento (controle).

### Teste do Rota Rod

Os animais tratados com etanol, nas doses de 0,5 ou 2 g/kg, v.o., não apresentaram alterações no número de quedas da barra em nenhum dos dias de observação [1<sup>o</sup> (NQ:0,5±0,3; 1,8±0,4 e 0,76±0,23), 3<sup>o</sup> (NQ: 0,33±0,3; 0,83±0,3 e 0,58±0,19), 5<sup>o</sup> (NQ: 0,2±0,2; 1±0,4 e 0,76±0,2) e 7<sup>o</sup> (NQ: 0,2±0,2; 0,6±0,4 e 0,54±0,2)] quando comparados ao grupo controle. Efeitos semelhantes, com essas duas doses, foram observados com relação ao tempo de permanência na barra no 1<sup>o</sup> (TP:58,5±0,9; 54,1±1,8 e 57,9±0,6), 3<sup>o</sup> (TP: 59,1±0,8; 57±1,1 e 58,5±0,5), 5<sup>o</sup> (NQ: 59,6±0,4; 56,8±1,3 e 57,3±0,6) e 7<sup>o</sup> (NQ: 59,8±0,2; 58,6±0,8 e 58,5±0,6) dia quando comparados ao grupo controle (**Figura 11**). Os resultados em parênteses representam média ± EPM de animais tratados com etanol 0,5 ou 2 g/kg,v.o. e controle, respectivamente.

Contudo, os camundongos tratados com uma dose mais alta de etanol (4 g/kg, v.o.), apresentaram um aumento no número de quedas no 1<sup>o</sup> dia (NQ: 2,3±0,2) [KW=12,901; p=.0,0049] tanto em relação ao grupo controle (NQ: 0,76±0,23) [U'=72,000; p=0,0022] quanto ao grupo do etanol 0,5 g/kg (NQ: 0,5±0,3) [U'=34,000; p=0,0087]. Nessa dose, um aumento [KW=8,364; p=.0,0390] no números de quedas também foi observado no terceiro dia (NQ: 1,5±0,2), em relação aos grupos controle (0,5±0,1) [U'=60,000; p=0,0245] e tratado com etanol 0,5 g/kg (0,33±0,3) [U'=31,500; p=0,0260]. Nenhum efeito significativo foi encontrado no 5<sup>o</sup> (1,5±0,5) ou 7<sup>o</sup> (1,2±0,3) dia de observação quando comparado aos controles do 5<sup>o</sup> (0,76±0,2) ou 7<sup>o</sup> (0,54±0,2) dia.

Quanto ao tempo de permanência na barra, uma diminuição foi observada com etanol na dose de 4 g/kg. Essa diminuição foi significativa no 1<sup>o</sup> (TP: 52±2; 58,5±0,9 e 57,9±0,6) [KW= 12,709; p=0,0053] e 3<sup>o</sup> (TP: 55,5±0,6; 59,1±0,8 e 58,5±0,5) [KW= 10,199; p=0,0169] dia, tanto em relação ao grupo controle, quanto ao etanol 0,5 g/kg. Os resultados em parênteses representam grupos tratados com etanol 4 ou 0,5 g/kg e controle, respectivamente. Ainda com essa dose, nenhuma alteração significativa no TP foi observado no 5<sup>o</sup> (56±1,4) e 7<sup>o</sup> (56±1,2) dia em relação aos valores do grupo controle (5<sup>o</sup> : 57,3±1,4; 7<sup>o</sup>: 58,5 0,6).



**Figura 11- Efeitos do etanol no teste de *rota rod* em camundongos.** O teste foi realizado no 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia de tratamento 15 minutos após a administração do etanol (0,5, 2 ou 4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle). Os números representam média  $\pm$  EPM (n= 6-12) do número de quedas na barra (A) e tempo de permanência em segundos (B). Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Tukey como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle ou etanol 0,5 g/kg, vo, respectivamente.

## DISCUSSÃO

No presente trabalho, a administração de dose única de etanol causou uma diminuição na ALE somente após 48 h de sua retirada e com alta dose (4 g/kg, v.o.). Aumentando o tempo de tratamento para 7 dias, um efeito semelhante foi observado na ALE desses animais. Assim, nessas condições experimentais a administração de altas doses de etanol e um tempo de retirada de 48 h foram necessários para diminuir a ALE. Em roedores, o etanol possui atividade excitatória e inibitória que parece ser dependente da raça dos animais e da dose administrada (Cohen et al., 1997; Miquel et al., 1999).

O sistema dopaminérgico é conhecido por estar envolvido em ações comportamentais e endócrinas no cérebro de mamíferos (Kim et al., 1997). Alguns trabalhos mostram que o tratamento prolongado com etanol pode produzir comportamentos de tolerância (Bell et al., 2001) ou sensibilização (Souza-Formigoni et al., 1999) e pode ser resultante da ação do etanol em sistemas como o dopaminérgico, gabaérgico e glutamatérgico.

Segundo Lessov & Phillips (1998), a duração da observação é outro fator importante em testes comportamentais após tratamento com etanol. Assim, os resultados da ALE verificados imediatamente após a retirada de etanol com duração de 3 min de observação não apresentaram diferença significativa, entretanto quando o tempo de observação foi aumentado para 10 min, tanto no 1<sup>o</sup> quanto no 7<sup>o</sup> dia, o etanol em altas dose diminuiu a ALE, mostrando assim um efeito depressor.

No presente trabalho não foi observada nenhuma sensibilização, ou seja um aumento da ALE após o término do tratamento, após o tratamento com etanol, tendo em vista que 7 ou 21 dias após a retirada da droga o efeito demonstrado foi uma diminuição da ALE tanto com a dose de 0,5 quanto com a de 4 g/kg. Gevaerd et al. (1999) também não encontraram efeito de sensibilização após administração de etanol (1,2 g/kg, i.p) no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> ou 10<sup>o</sup> dia de tratamento. Entretanto eles observaram um aumento semelhante da ALE em relação ao controle, nesses 3 dias de observação. Por outro lado, Lessov & Phillips (1998) mostraram sensibilização comportamental

imediatamente após a administração de etanol (2,5 g/kg, i.p.) em camundongos por 10 dias consecutivos e esse efeito persistiu até 29<sup>o</sup> dias após o término do tratamento.

Alguns trabalhos (Lessov & Phillips 1998; Gevaerd et al. 1999) mostram que o comportamento de sensibilização depende de fatores como raça de animais, protocolo experimental, dose administrada e condições ambientais para realização do teste. Os animais utilizados no protocolo experimental do presente trabalho foram ratos da linhagem Wistar, considerada linhagem heterogênea (Spanagel et al., 1995) quanto à preferência por álcool, isso pode ser uma possível explicação para a ausência de sensibilização nesses animais. Segundo Lessov & Phillips (1998), linhagem de camundongos respondem de maneira diferente em testes comportamentais. Assim, estes autores observaram que camundongos da linhagem CON1 e CON2 apresentaram pouca ou nenhuma estimulação ao etanol, enquanto linhagem WSC1 e WSC2 mostraram uma significativa resposta estimulante ao etanol.

A ALE é um teste comportamental que envolve alterações nos sistemas glutamatérgico (Vekovischeva et al., 2000), dopaminérgico (Adams & Moghaddam, 1998) e opióide (Unterwald et al., 1997). Assim, esse comportamento foi observado com drogas antagonistas desses sistemas, após a retirada do etanol (Protocolo 1) ou associadas ao etanol (Protocolo 2).

A administração de ketamina sozinha, ou após a retirada de etanol (Figura 4), não interferiu na ALE dos ratos nos dois tempos de observação (30 min ou 48 h). Entretanto, quando a ketamina foi administrada juntamente com o etanol (Figura 7), uma tendência a diminuição da ALE foi observada 30 min ou 48 h após administração da ketamina que sozinha e após 48 h de retirada, apresentou comportamento semelhante.

O sistema glutamatérgico tem sido explorado como um importante alvo para explicar os efeitos de hiperatividade visto na síndrome de retirada do álcool. Contudo, não está claro como o sistema glutamatérgico altera esse comportamento. Trabalhos utilizando ketamina, um antagonista não competitivo de receptor NMDA, apresentam resultados contraditórios quanto a seu efeito na ALE. Segundo Adams & Moghaddam (1998), a ketamina e a fenciclidina em doses subanestésicas aumentam a ALE em ratos

Sprague-Dawley, e isso pode ser devido ao efluxo de DA e glutamato no NAC, induzido por essas drogas. Por outro lado, Shiigi & Casey (1999), estudando o efeito da ketamina em macacos, observaram que a ketamina causou uma diminuição na ALE pela sua ação antagonista em receptores NMDA. Outros (Wang et al., 2001) não encontraram nenhuma alteração na ALE após a administração de ketamina isolada.

Com base nos resultados do presente trabalho, a associação de etanol com ketamina foi necessária para diminuir a ALE apenas 30 min após a administração do etanol. Entretanto, com 48 h (Et+Ketamina-2) o efeito predominante parece ser da ketamina, tendo em vista que a ALE após tratamento com etanol por 14 dias e com 48 h de retirada os valores voltaram os dos controles. Desde que a ketamina pode aumentar (Adams & Moghaddam, 1998), diminuir (Shiigi & Casey, 1999) ou não alterar (Wang et al., 2000) a ALE devido a seus efeitos a nível de receptores pré e pós sináptico, sugere-se que nas condições estudadas, a ketamina apresentou uma tendência a diminuir a ALE em ratos. Contudo, estudos farmacológicos (Risinger et al., 1992) sugerem que os mecanismos neurais envolvidos nos efeitos do etanol após administração aguda diferem daqueles observados cronicamente.

O haloperidol sozinho diminuiu a ALE aos 30 min após sua administração, mas não as 48 h. Esse efeito continuou (após 30 min) no grupo Et+haloperidol-1 (Figura 5) e Et+haloperidol-2 (Figura 8), mostrando assim que o pré-tratamento com etanol (após 14 dias e 30 min de retirada) não alterou esse comportamento. Contudo, na presença do etanol (Et+haloperidol-2), a diminuição da atividade locomotora causado pelo haloperidol tendeu a aumentar a locomoção do animal. Resultado semelhante foi encontrado por Wolffgramm et al. (1990), onde o haloperidol (1,28 a 1,48 mg/kg/dia) apresentou uma tolerância à sedação locomotora e a co-administração de etanol com haloperidol reduziu o desenvolvimento de tolerância, porém permaneceu o quadro de depressão da atividade locomotora.

Entretanto, quando a ALE foi observada 48 h após a retirada do haloperidol, nos animais expostos previamente ao etanol (Et+haloperidol-1), foi observado uma diminuição da ALE no grupo Et+haloperidol-1, tendo sido este um resultado inesperado, devido ao fato de que os animais tratados apenas com haloperidol não apresentaram nenhuma alteração nesse parâmetro.

O haloperidol é uma droga antagonista dopaminérgica que bloqueia os receptores D2 e D3. O uso prolongado de haloperidol causa um efeito de *upregulation* nesses receptores (Tarazi et al., 1997) que está relacionado a uma resposta locomotora mediada pelo sistema dopaminérgico (Besret et al., 2000). Assim, o tempo de retirada é um fator importante para a determinação da resposta locomotora pelo haloperidol. Rupniack et al. (1985) observaram em ratos que o haloperidol, após 3 meses de tratamento, diminuiu a ALE imediatamente após a administração desse antagonista. Todavia, Besret et al. (2000) observaram um aumento desse comportamento em ratos 5 dias após a retirada do haloperidol, relacionando esse efeito a *upregulation* de receptores D2.

Cohen et al. (1997), trabalhando com a interação entre etanol e haloperidol em camundongos, mostraram que o haloperidol somente com a dose de 0,2 mg/kg diminuiu a hiperatividade causada por etanol (2 ou 3 g/kg). Contudo, nenhuma alteração foi observada na ALE após administração de haloperidol (0,03; 0,1 e 0,2 mg/kg) e 30 min depois do etanol (1 g/kg). Ainda nesse trabalho, uma diminuição da ALE foi observada após a administração de etanol em altas doses (4 e 5 g/kg) e esse efeito foi potencializado pela associação com haloperidol nas doses de 0,2 e 0,3 mg/kg.

No presente estudo, a naltrexona não apresentou efeito na ALE nos dois protocolos estudados, após 30 min (Figuras 6 e 9). Entretanto após 48 h de sua retirada, uma tendência a diminuição foi observada após o tratamento com a naltrexona sozinha e esse comportamento foi mantido tanto no grupo do Et+naltrexona-1 quanto no grupo Et+naltrexona-2, sugerindo que uma exposição prévia ao etanol pode interferir com o comportamento dos animais em respostas à administração da naltrexona.

Os sistemas opióide e dopaminérgico apresentam uma interação que resulta na modulação da ALE. O etanol, através de seu efeito de aumentar a liberação de DA e peptídeos opióides endógenos (POE), pode alterar esse comportamento em roedores. Segundo Altshuler et al. (1980), o etanol modifica a síntese e a liberação de alguns peptídeos opióides, bem como a ativação de receptores opióides do subtipo  $\mu$  e  $\delta$ . Contudo, trabalhos mostraram que a naltrexona bloqueou o aumento da ALE causado

por agonistas opióides (Longoni et al., 1981) ou por baixas doses de etanol (Kiianmaa et al., 1983). Segundo Trudeau et al (1991), animais tratados com naltrexona, apresentaram uma depressão da atividade locomotora após 60 min de sua administração, mas não após 15 min. Contudo, o pré tratamento com etanol bloqueou esse efeito depressor após 60 min. Também Kiianmaa et al. (1983) mostraram que a naltrexona pode antagonizar os efeitos do etanol em baixas (1 mg/kg) (hiperlocomoção) e altas (8 mg/kg) (aumento de tempo de sono) doses.

Vários estudos mostram que nem todas as espécies apresentam efeito de sensibilização ao etanol e que, dentre os roedores, os camundongos são os mais sensíveis com relação à esse fenômeno. Assim, foi investigado o comportamento locomotor desses animais com duas doses de etanol. No presente trabalho o etanol na dose de 4 g/kg, 15 min após a sua administração, não causou nenhuma alteração na ALE. No 7<sup>o</sup> dia, 24 h após a última administração da etanol 0,5 g/kg, um aumento da ALE foi observado em relação ao controle. Segundo Roberts et al. (1995) o comportamento de sensibilização é caracterizado quando ocorre um aumento da ALE desse animal, quando comparado a primeira exposição da droga. De acordo com esse conceito esse aumento não foi considerado de sensibilização, pois foi semelhante ao comportamento observado no 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> dias de administração do etanol (Figura 10).

Como o etanol altera o processo de memória pode-se sugerir que esse aumento, observado na ALE no 7<sup>o</sup> dia (24 h após a administração da droga), poderia ser relacionado com uma perda temporária de memória, onde o animal não apresentaria esse efeito de habituação, causada por baixas doses de etanol.

Durante os testes de ALE com dose elevada de etanol (4 g/kg, v.o.) e retirada de 30 min, uma perda da coordenação motora foi visualizada inicialmente nesses animais. A partir dessas observações camundongos foram submetidos ao teste de *rota rod* para verificar os efeitos do etanol na coordenação motora.

O etanol somente na dose de 4 g/kg causou uma diminuição da coordenação motora, visualizado através de um aumento no número de quedas e diminuição no tempo de permanência na barra. Esse efeito somente foi detectado no 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> dias de observação. No 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias, os animais apresentaram um desempenho semelhante aos

animais controle, sugerindo um efeito de tolerância para esse comportamento. Zaleski et al (2001) também encontraram um efeito de tolerância ao prejuízo locomotor causado pelo etanol 24 h após sua administração e esse efeito foi relacionado ao sistema gabaérgico. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos (Czarnecka & Pietrzak (1991) que observaram uma alteração na coordenação motora após administração aguda de etanol em camundongos.

## CONCLUSÕES

- ✓ A resposta locomotora ao etanol foi dependente da dose e do tempo após a retirada da droga. Assim, somente efeito depressor foi observado 48 h após a administração aguda ou sub-crônica de etanol em altas doses (4 g/kg). Aumentando o tempo de duração do teste e imediatamente após a administração do etanol, um efeito depressor foi observado após altas doses de etanol, confirmando assim a relevância do tempo de observação após à administração da droga, bem como o tempo de duração do experimento.
- ✓ A ketamina não alterou a ALE quando administrada após pré-tratamento com etanol, porém na presença do etanol apresentou uma tendência a diminuir o comportamento locomotor, após 30 min e 48 h, sugerindo que existe uma interação do etanol com o sistema glutamatérgico no que se refere a modulação da ALE.
- ✓ O haloperidol causou uma diminuição da ALE somente 30 min após a sua administração, sendo esse resultado revertido 48 h após a retirada da droga. Esses resultados sugerem que o haloperidol bloqueou o sistema dopaminérgico no corpo estriado e que esse efeito não foi alterado pela presença do etanol.
- ✓ A naltrexona mostrou uma tendência a diminuir a ALE, após 48 h de sua administração e esse efeito não foi influenciado pelo etanol. Pode-se sugerir que esse efeito seja decorrente do bloqueio do sistema opióide causando como consequência uma inibição do sistema dopaminérgico.
- ✓ O etanol, em altas doses, causou incoordenação motora em camundongos apenas nos primeiros dias de tratamento. Esse efeito desapareceu com o decorrer do tratamento, sugerindo assim um quadro de tolerância.

## CAPÍTULO II

**Determinação das concentrações de monoaminas e metabólitos em corpo estriado de ratos após administração de etanol sozinho e/ ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide**

## INTRODUÇÃO

O álcool etílico é uma droga de abuso conhecida por alterar vários sistemas de neurotransmissores do SNC. Segundo Nevo & Hamon (1995), o consumo agudo e crônico do etanol interfere diferentemente com processos de transmissão no SNC, afetando muitos, se não todos os sistemas de neurotransmissores conhecidos. Entretanto, o mecanismo de ação pelo qual o etanol altera esses sistemas ainda não foi totalmente esclarecido (Chandler et al., 1998).

Pesquisas anteriores não são conclusivas quanto às alterações causadas pelo etanol nos sistemas de neurotransmissores. Assim, enquanto alguns estudos (Di Chiara & Imperato, 1985; Imperato & Di Chiara, 1986; O'Brien et al., 1995) mostram que a administração de etanol induz liberação de dopamina e serotonina no núcleo caudado e núcleo acumbente de ratos, outros (Rossetti et al., 1992) observaram que a retirada aguda de álcool reduz a concentração extracelular de dopamina no NAc. Esses achados fortalecem a hipótese que a DA é um neurotransmissor fundamental na mediação do efeito de reforço e recompensa de substância de abuso no cérebro (Koob et al., 1987).

Também, estudos clínicos indicam que inibidores de recaptação de 5-HT exibem alguma eficácia em reduzir o alcoolismo (Naranjo & Sellers, 1989). O sítio de ação dos inibidores de recaptação não é conhecido, porém é possível que eles atuem na via de reforço central no sentido de modificar a ação do etanol (Brodie et al., 1995).

As interações entre o etanol e os sistemas de transmissores monoaminérgicos são complexas. Mecanismos dopaminérgicos e noradrenérgicos, associados com o sistema dos opióides endógenos no cérebro, parecem estar implicados com o efeito de reforço do etanol via retroalimentação positiva (Nevo & Hamon, 1995), enquanto o sistema serotoninérgico medeia o reforço negativo (Selim & Bradberry, 1996). Outro fator relevante para o etanol alterar os neurotransmissores do SNC são as interações do tipo auto-modulatórias que ocorrem entre esses sistemas. Assim, os níveis de dopamina podem ser modulados por peptídios opióides endógenos, glutamato e 5-HT no SNC (Sershen et al., 2000; Nevo & Hamon, 1995).

## **OBJETIVOS**

Os objetivos principais deste estudo foram: 1. Determinar os níveis de monoaminas (NE, DA e 5-HT) e metabólitos (DOPAC, HVA e 5-HIAA) em corpo estriado de ratos, após a administração do etanol em diferentes protocolos de tratamento e de retirada. 2. Verificar as possíveis alterações nas concentrações dessas monoaminas e de seus metabólitos, após administração de antagonistas dos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide na presença do etanol ou após a retirada deste.

## RESULTADOS

Os resultados das determinações dos níveis de monoaminas (NE, DA e 5-HT) e metabólitos (DOPAC, HVA e 5-HIAA) em corpo estriado de ratos tratados com dose única de etanol (4 g/kg, v.o.) e sacrificados 30 min ou 48 h após sua administração são apresentados na **Figura 1**. Houve um aumento nos níveis de DA (46,7%) somente após 30 minutos (4707,2±374,4 ng/g de tecido), sem contudo haver nenhuma alteração significativa após 48 h (4213,6±386 ng/g de tecido), quando comparado ao controle (3209,1±380,2 ng/g de tecido) [F(2,15)=4,025; p=0,0436]. Os metabólitos DOPAC (3459±439,3; 2925,2±180,8 e 3014,7±461,4 ng/g de tecido) e HVA (1258,3±124,9; 912,4±61,5 e 1087,9±179,2 ng/g de tecido) não apresentaram nenhuma alteração significativa quando comparados ao controle (**Figura 1-A**). Os resultados em parênteses representam grupos tratados (após 30 min e 48 h) e grupo controle, respectivamente.

A NE, quando medida em ratos tratados com etanol (4 g/kg, v.o.) e com retirada de 48 h (901,9±54 ng/g de tecido), apresentou um aumento (60%) quando comparada ao controle (564,4 ± 37,9 ng/g de tecido) [F(2,14)=4,776; p=0,0298]. Após 30 minutos, um aumento de NE (753,4±93,3 ng/g de tecido) em relação ao controle (564,4±37,9 ng/g de tecido) também foi observado, porém o resultado não foi estatisticamente significativo (**Figura 1-B**).

Os níveis de serotonina não foram alterados em relação ao controle (334,2±38,2 ng/g de tecido) após 30 min (492±98,6 ng/g de tecido) ou 48 h (208,7±35,6 ng/g de tecido), embora uma tendência a aumento (30 min) e diminuição (48 h), respectivamente, tenham sido observados. Contudo, uma diminuição significativa (58%), após a retirada com 48 h, foi observado em relação ao grupo com retirada de 30 minutos [F(2,16)=4,705; p=0,0274]. O metabólito da serotonina 5-HIAA não apresentou alteração [F(2,16)=2,673; p=0,1039] em nenhum dos tempos de retirada, com relação ao controle (Controle: 488,8±49,1; Et-30 min: 593,4±31,7 e Et- 48 h: 503,1±24,6 ng/g de tecido) (**Figura 1-B**).

A **Figura 2-A** mostra os resultados do tratamento com etanol (0,5 ou 4 g/kg, v.o.) durante 7 dias e após 30 min de administração da droga. Nesse protocolo, o etanol causou um aumento nos níveis de DA (47%), tanto na dose de 0,5 (4334,2±318,8 ng/g de tecido) quanto na de 4 g/kg (4318,49±179,1 ng/g de tecido) quando comparado ao controle (2932,5±200,5 ng/g de tecido) [F(2,23)=14,624; p=0,0001]. Deve-se enfatizar que esse efeito não foi dose dependente no intervalo de tempo utilizado.

Os metabólitos, DOPAC (Controle: 2834,2±234,9; Etanol 0,5: 3103,5± 185,6 ng/g de tecido) e HVA (Controle: 973,4±46,7; Etanol 0,5: 913,6±76,7 e Etanol 4: 1070,8±60,7 ng/g de tecido), não foram alterados significativamente nesse protocolo, exceto pelo aumento observado nos níveis de DOPAC, quando comparado ao controle (73,7%) e etanol 0,5 g/kg (58,7%), após a administração de etanol em altas doses (4924,4±346,3 ng/g de tecido) [F(2,24)=15,228; p=0,001].

Os níveis de NE (Etanol 0,5: 305,8±49,4 e Etanol 4: 258,4±47,9 ng/g de tecido) e 5-HT (Etanol 0,5: 245,4±17,6 e Etanol 4: 232,3±27,1 ng/g de tecido) também não apresentaram alterações em relação ao controle (NE: 309,6±28,6; 5-HT: 287,1±40,5 ng/g de tecido). Por outro lado, os níveis de 5-HIAA foram aumentados tanto em relação ao grupo controle (485,6±62,0 ng/g de tecido) quanto ao etanol 0,5 g/kg (362,3±47,5 ng/g de tecido), após administração de etanol na dose de 4 g/kg (672,3±60,6 ng/g de tecido) [F(2,21)=6,113; p=0,0089].

Ainda com o tratamento de 7 dias, porém com um tempo de retirada de 48 h (**Figura 3-A**), os níveis de DA permaneceram elevados com as doses de 0,5 (4324,1±213,0 ng/g de tecido), 2 (4132,3±532,4 ng/g de tecido) ou 4 g/kg (4143,1±365,2 ng/g de tecido) de etanol, quando comparados aos animais controles (2902,2±161,1 ng/g de tecido) [F(3,42)=7,522; p=0,0004]. Novamente, não foi observada uma relação dose efeito com esse tratamento. Os níveis de DOPAC só foram aumentados com a dose mais alta de etanol (3501,1±328,5 ng/g de tecido), quando comparados ao grupo controle (2592,5±170,4 ng/g de tecido) e ao etanol 0,5 g/kg (2363,2±355,1 ng/g de tecido) [F(3,51)=3,183; p=0,0321]. Nenhuma alteração foi observada com a dose de 2 g/kg (3163,4±203,6 ng/g de tecido). O outro metabólito da DA, HVA não foi alterado com nenhuma dose de etanol (Controle: 1072,4±259,6;

Etanol 0,5: 801,9 $\pm$ 276,9; Etanol 2: 1091,5 $\pm$ 122,6 e Etanol 4: 1030,9 $\pm$ 122,0 ng/g de tecido).

Na **Figura 3-B** enquanto os níveis de NE foram aumentados após administração de etanol na dose de 0,5 g/kg (462,9 $\pm$ 25,9 ng/g de tecido) em relação aos grupos controle (334,2 $\pm$ 33,9 ng/g de tecido), etanol 2 (268,4 $\pm$ 42,3 ng/g de tecido) e etanol 4 (170,1 $\pm$ 10,8 ng/g de tecido), uma diminuição foi observada nessa monoamina após a administração de etanol na maior dose (4 g/kg) em relação ao grupo controle [F(3,43)=8,618; p=0,002].

Os níveis de 5-HT e de seu metabólito somente foram diminuídos após a administração de etanol em baixas doses (5-HT: 283,5 $\pm$ 35,4 e 5-HIAA 319,6 $\pm$ 40,3 ng/g de tecido) em relação ao controle (5-HT: 380,6 $\pm$ 26,1 e 5-HIAA: 502,5 $\pm$ 26,6 ng/g de tecido). Entretanto, um aumento de 5-HT [F(3,49)=4,594; p=0,0068] e 5-HIAA [F(3,46)=6,164; p=0,014] foi observado nas doses de 2 (5-HT: 479,6 $\pm$ 30,7 e 5-HIAA: 559,5 $\pm$ 77,2 ng/g de tecido) ou 4 g/kg (5-HT: 448,0 $\pm$ 59,0 e 5-HIAA: 690,9 $\pm$ 114,1 ng/g de tecido) quanto comparado ao grupo tratado apenas com etanol 0,5 g/kg (5-HT: 283,5 $\pm$ 35,4 e 5-HIAA 319,6 $\pm$ 40,3 ng/g de tecido).

No tratamento crônico com etanol e após 30 min da última administração (**Figura 4**), os níveis de DA foram diminuídos em ambas as doses, 2 (1560,9 $\pm$ 144,81 ng/g de tecido) ou 4 (2001,9 $\pm$ 154,5 ng/g de tecido) g/kg, em relação ao controle (3103,0 $\pm$  245,7 ng/g de tecido) [F(2,26)=8,884; p=0,0013]. Resultado semelhante foi observado com DOPAC (Controle: 2518,4 $\pm$ 188,0; Etanol 2: 1998,8 $\pm$ 234,2 e Etanol 4: 1514,4 $\pm$ 213,1 ng/g de tecido), embora uma significância estatística [F(2,32)=3,492; p=0,0433] somente tenha sido observada com a dose mais alta de etanol em relação ao grupo controle (**Figura 4-A**). Os resultados com HVA no tratamento crônico, assim como no protocolo agudo e sub-crônico, também não mostraram diferenças significativas em relação ao controle (1097,8 $\pm$ 59,9 ng/g de tecido) com ambas as doses: 2 (1391,4 $\pm$ 119,7 ng/g de tecido) e 4 g/kg (994,2 $\pm$ 124,8 ng/g de tecido).

Ainda nesse protocolo (**Figura 4-B**), enquanto os níveis de NE diminuíram com as duas doses estudadas de etanol (Etanol 2: 98,9 $\pm$ 19,4 e Etanol 4: 87,5 $\pm$ 19,6 ng/g de tecido) [F(2,24)=9,770; p=0,0009], os níveis de 5-HT (Etanol 2: 637,9 $\pm$ 95,1 e Etanol 4:

746,8±51,9 ng/g de tecido) [F(2,31)=18,355; p<0,0001] e 5-HIAA (Etanol 2: 1488,1±149,2 e Etanol 4: 1527,8±131,2 ng/g de tecido) [F(2,35)=50,652; p<0,0001] aumentaram em relação ao grupo controle (NE: 285,0±33,3; 5-HT: 407,0±24,9 e 5-HIAA: 652,4±38,0 ng/g de tecido).

Os níveis de DA [F(2,22)=8,702; p=0,0019] e DOPAC [F(2,26)=6,885; p=0,043] continuaram diminuídos em relação ao controle (DA: 3415,8±451,3 e DOPAC: 2576,4±261,9 ng/g de tecido), com as doses de 2 (DA: 2114,5±126,4 e DOPAC: 1542±141,3 ng/g de tecido) ou 4 g/kg (DA: 1785,1±234,2 e DOPAC: 1218,8±271,7 ng/g de tecido), após o tratamento de 30 dias e com retirada de 48 h (**Figura 5-A**). Essa diminuição não foi dose-dependente. Novamente, nenhuma alteração foi observada nos níveis de HVA (Controle: 944,0±103,4, Etanol 2: 1182,4±125,2 e Etanol 4: 1119,7±192,7 ng/g de tecido) após 48 h de retirada do etanol nas duas doses estudadas.

Os níveis de NE não foram alterados após o uso crônico e com o tempo de retirada de 48 h [F(2,16)=3,128; p=0,0753], contudo uma tendência à diminuição foi evidenciado após a retirada de etanol 4/kg (167,7±13,4 ng/g de tecido) em relação ao controle (256,3±29 ng/g de tecido).

Efeito inverso, foi observado nas concentrações de 5-HT e seu metabólito após tratamento de 30 dias e retirada de 48 h (**Figura 5-B**) quando comparado com a retirada de 30 min. Os níveis de 5-HT (310,6±25,8; 228,0±46,8 e 407,0±24 ng/g de tecido) [F(2,18)=5,043; 0,0200] e 5-HIAA (474,0±63,8; 304,4±37,2 e 652,4±38 ng/g de tecido) [F(2,16)=7,636; p=0,0057] foram diminuídos em ambas as doses de etanol quando comparado ao grupo controle. Os resultados em parênteses representam média ± EPM dos grupos tratados com etanol 2 ou 4 g/kg e controle, respectivamente.

A **Figura 6** mostra os efeitos do etanol (4 g/kg, v.o., e retirada de 48 h) sobre as concentrações de monoaminas em função do tempo de tratamento. Nesse protocolo, observou-se que os níveis de DA foram aumentados no 1<sup>o</sup> (45,2%) e 7<sup>o</sup> (42,7%) dia de tratamento com a droga, quando comparado ao controle. No 14<sup>o</sup> dia, os níveis tenderam a voltar aos valores do controle, embora um aumento não significativo tenha sido observado. No 30<sup>o</sup> dia, um efeito oposto foi encontrado. Os níveis de DA foram

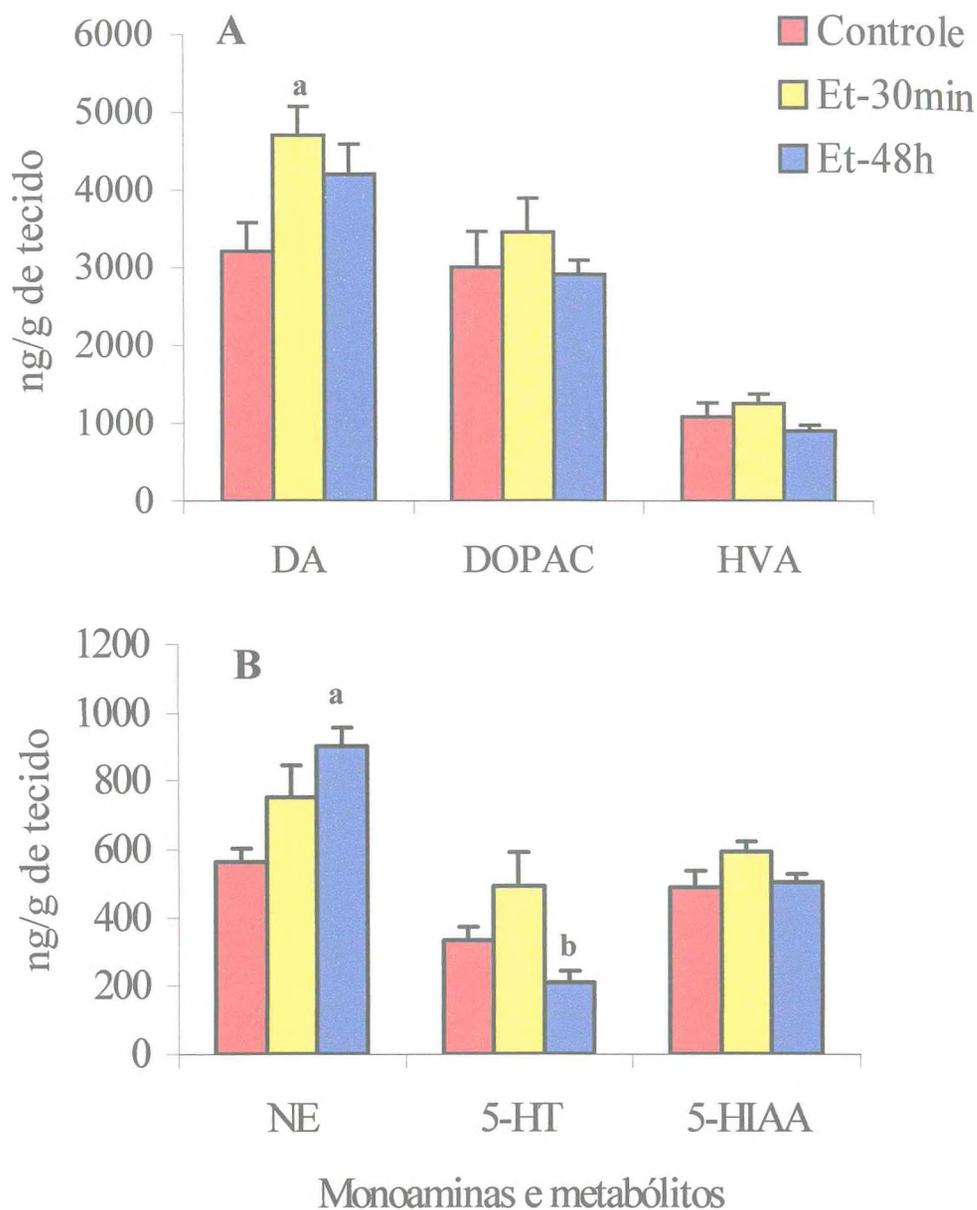
diminuídos quando comparados ao controle (38,3%) e aos outros dias de tratamento (1<sup>o</sup>: 57,4%; 7<sup>o</sup>: 56,7% e 14<sup>o</sup> dia: 49,8%) [F(4,43)=11,905; p<0,0001].

Resultados semelhantes foram observados com DOPAC. Uma tendência ao aumento dos níveis deste metabólito foi observada no 7<sup>o</sup> (35%) e 14<sup>o</sup> dia (32%) quando comparado ao controle, e uma diminuição significativa também foi evidenciada no 30<sup>o</sup> tanto em relação ao controle (53%) quanto nos dias 1, 7 e 14 de tratamento: (1: 58,3%; 7: 65,2% e 14 dia: 64,4%) [F(4,53)=8,180; p<0,0001]. O outro metabólito da DA, HVA, não apresentou alteração em relação ao controle em nenhum dos dias de tratamento.

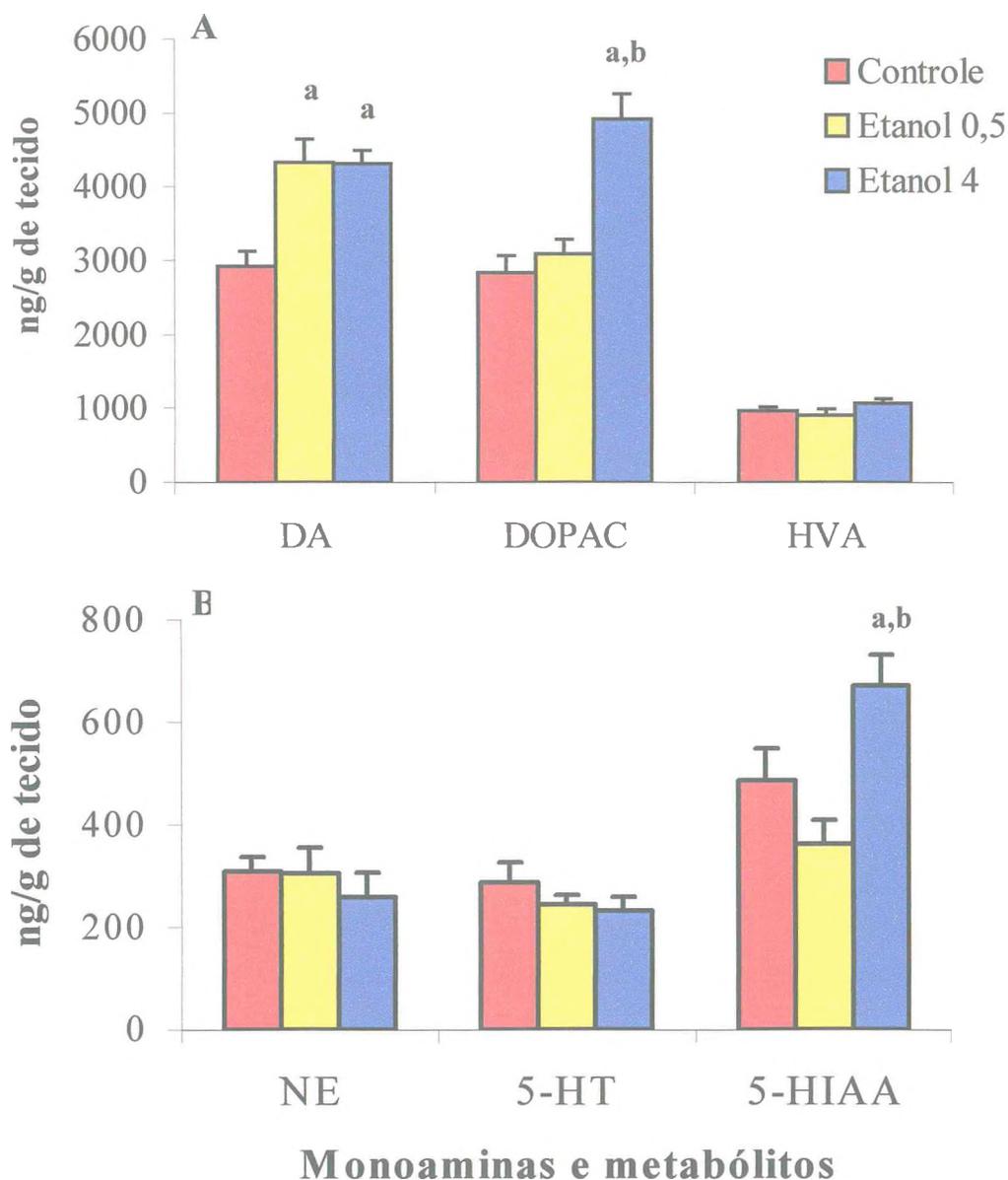
Quanto aos níveis de NE (**Figura 6-B**), um efeito bifásico foi observado no 1<sup>o</sup> (aumento- 170%), 7<sup>o</sup> (diminuição- 49,1%) e 30<sup>o</sup> dia (diminuição- 49,8%) quando comparados ao grupo controle [F(4,43)=26,758; p<0,0001]. Contudo, esses níveis não foram alterados no 14<sup>o</sup> dia em relação ao controle.

Uma diminuição dos níveis de 5-HT foi verificada no 1<sup>o</sup> (45,2%) dia de tratamento em relação ao controle. Contudo, no 7<sup>o</sup> dia os níveis de 5-HT retornaram aos valores do grupo controle (380,6±26,1 ng/g de tecido). No 14<sup>o</sup> (282,0±10,8 1 ng/g de tecido) e 30<sup>o</sup> (228,0±46,8 1 ng/g de tecido) dias, os níveis de 5-HT voltaram a diminuir novamente [F(4,48)=5,575; p=0,0010] em relação ao controle.

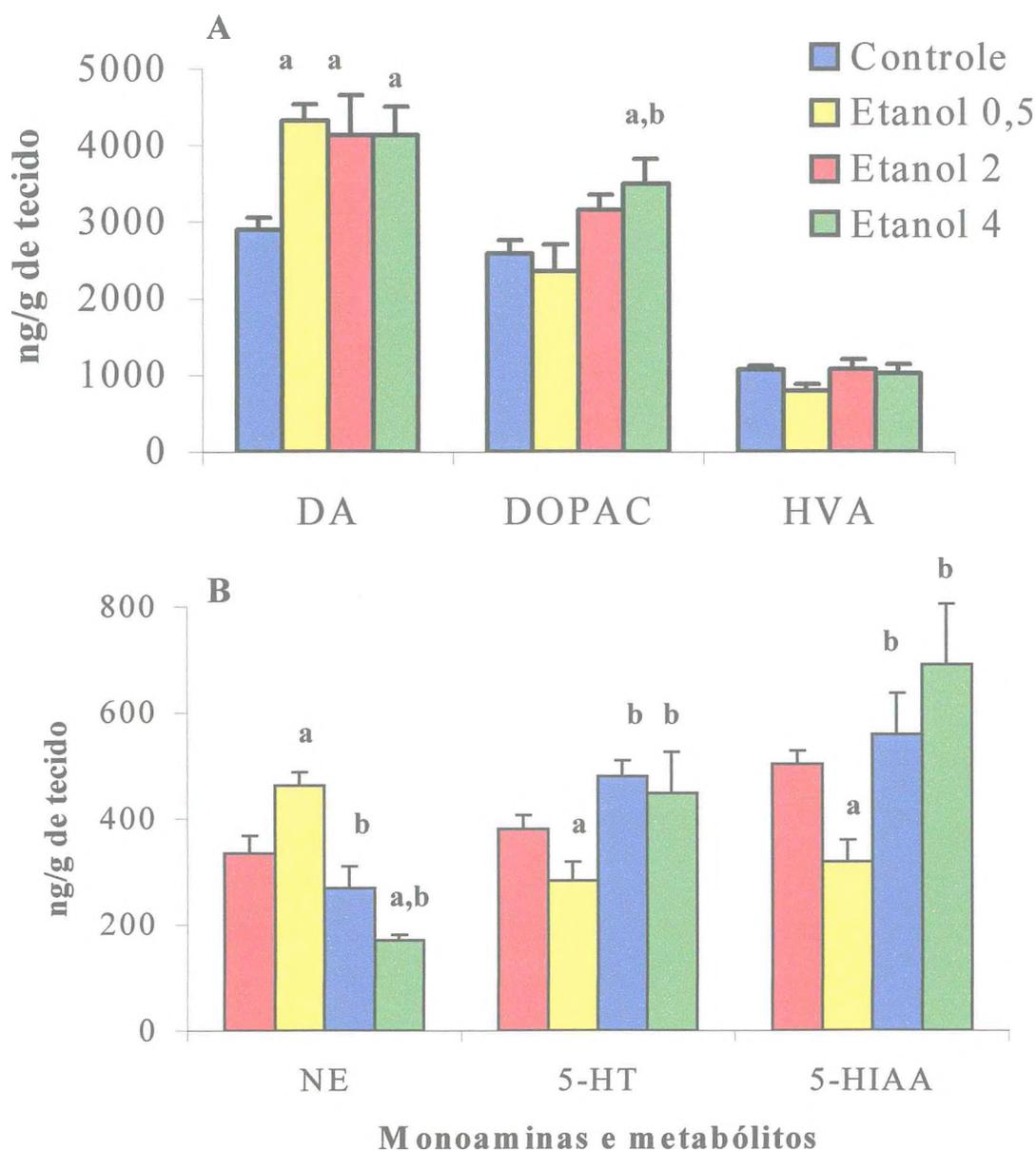
Quanto ao metabólito da serotonina, nenhuma alteração foi observada após uma dose única de etanol (4 g/kg, v.o.) em relação ao controle. Entretanto, com o decorrer do tratamento um aumento (7<sup>o</sup> dia) e uma tendência a diminuição (14<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias) foram observados em relação ao controle e grupo tratado com dose única de etanol. Pode-se dizer que a diminuição observada nos níveis de 5-HIAA, no 14<sup>o</sup> (48,4%) e 30<sup>o</sup> (55,9%) dia, foi significativa em relação ao 7<sup>o</sup> dia [F(4,45)=6,524; p=0,0014].



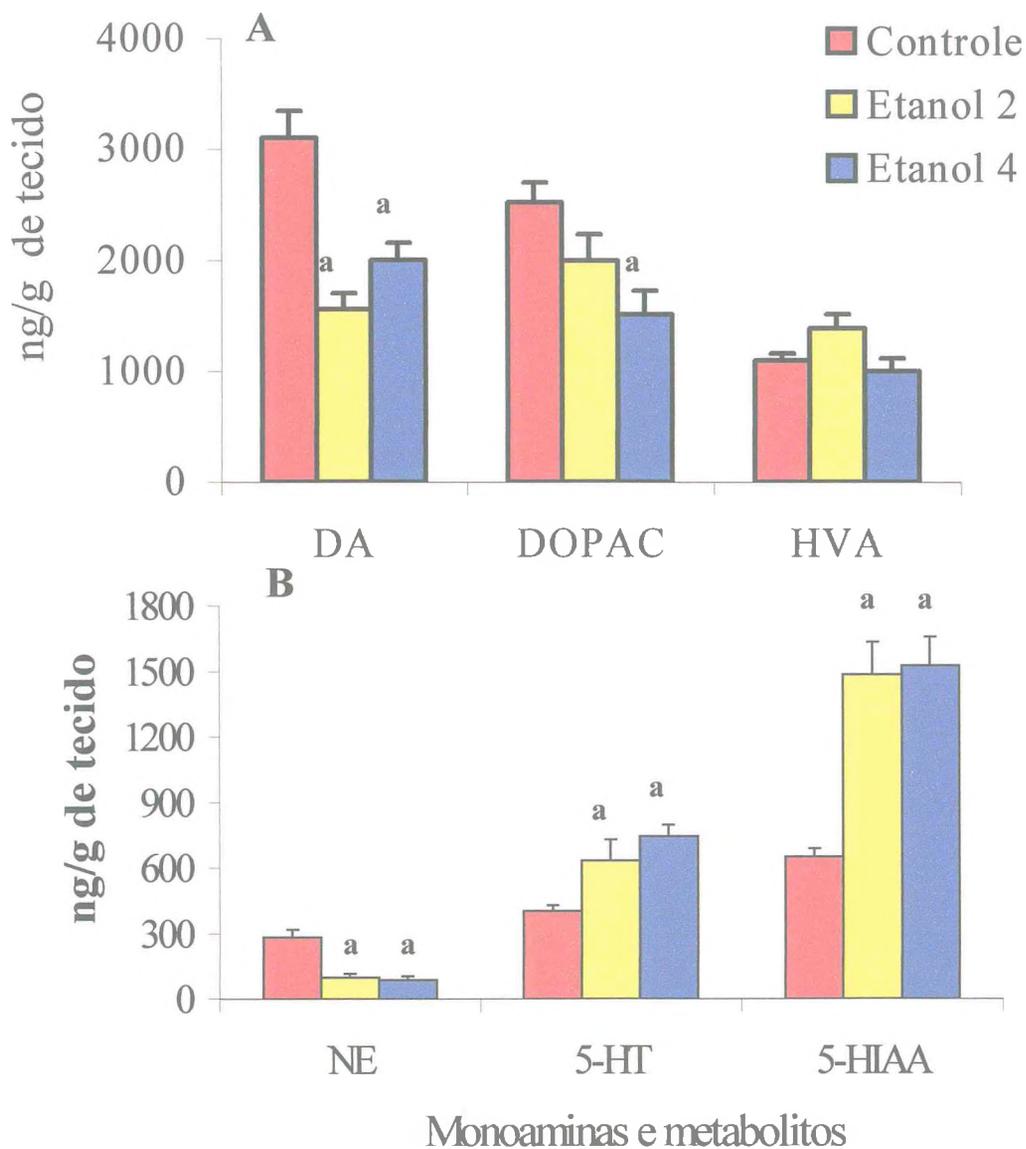
**Figura 1-** Efeitos da administração aguda do etanol sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais ( $n= 5-6$ ) foram tratados com uma única dose de etanol (4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle) e sacrificados 30 min ou 48 h após o tratamento, para determinação de monoaminas. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a e b ( $p<0,05$ ) quando comparados ao controle e etanol- 30 min, respectivamente.



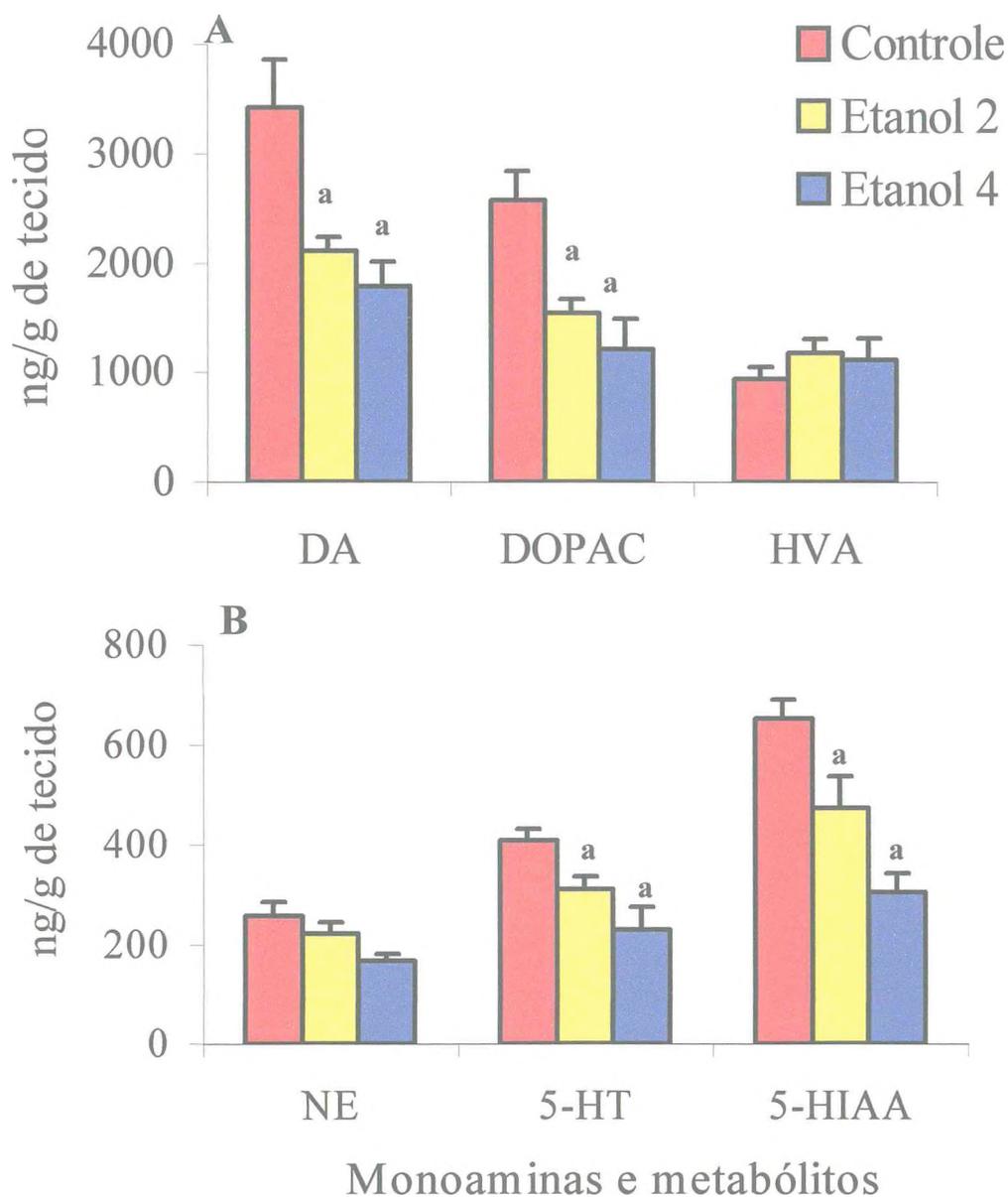
**Figura 2-** Efeitos da administração do etanol após 7 dias de tratamento e 30 min de retirada sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais (n= 5-10) foram tratados diariamente com etanol (0,5 ou 4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle e etanol 0,5 g/kg, respectivamente.



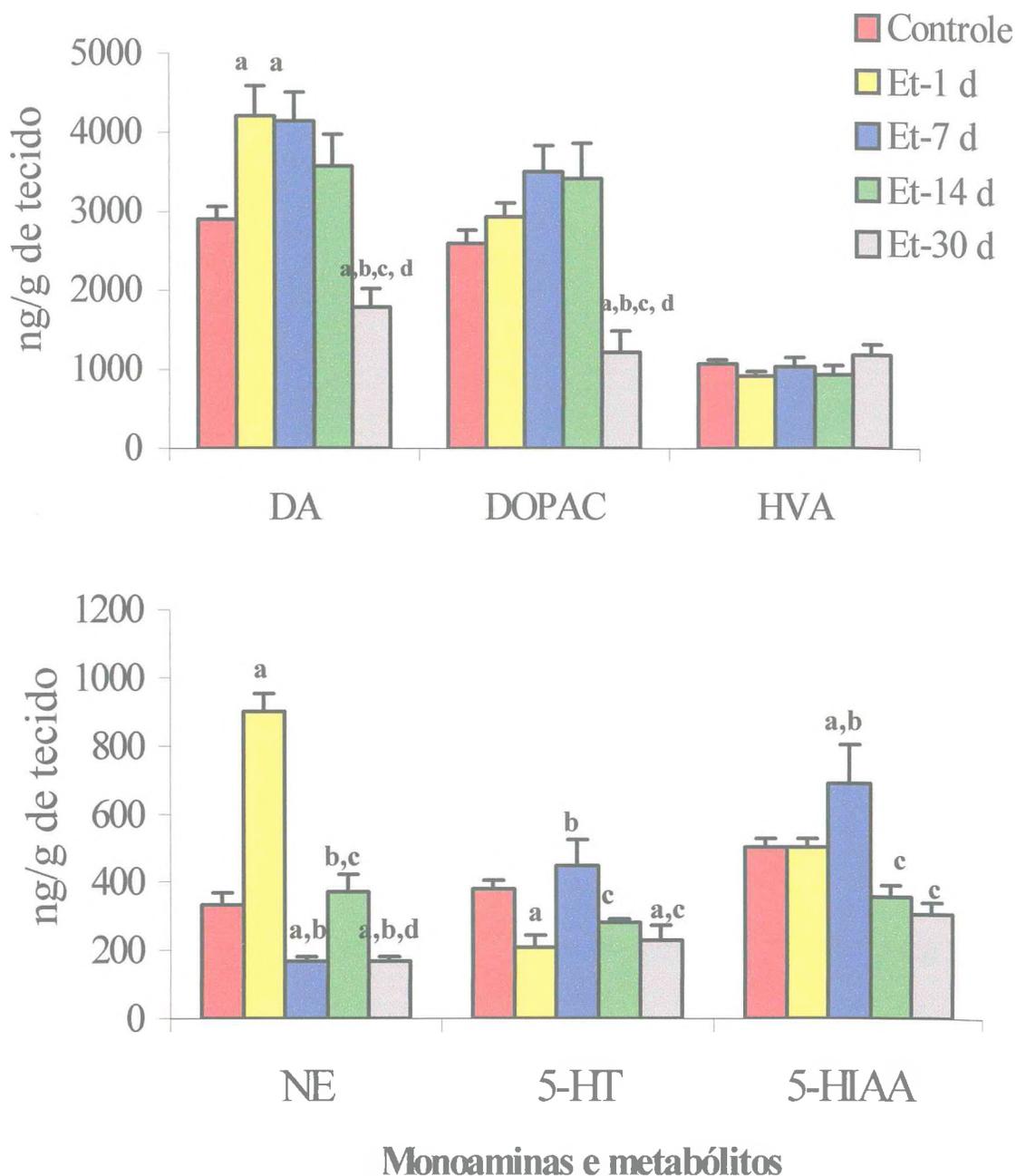
**Figura 3-** Efeitos da administração do etanol durante 7 dias de tratamento e 48 h de retirada sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais (5-6 por grupo) foram tratados diariamente com etanol (0,5, 2 ou 4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle e Et-0,5 g/kg, respectivamente.



**Figura 4-** Efeitos da administração de etanol durante 30 dias e retirada de 30 min sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais ( $n= 5-10$ ) foram tratados diariamente com etanol (2 ou 4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a ( $p<0,05$ ) quando comparados ao controle.



**Figura 5-** Efeitos da administração do etanol durante 30 dias e retirada de 48 h sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais (n=5-10) foram tratados diariamente com etanol (2 ou 4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle.



**Figura 6-** Efeitos da administração aguda ou repetida do etanol sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais ( $n= 5-10$ ) foram tratados durante 1, 7 14 ou 30 dias com etanol (4 g/kg, v.o.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após o tratamento. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, b, c e d ( $p<0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 1, 7 e 14 dias, respectivamente.

## Resultados dos Protocolos 1 e 2

Os níveis de monoaminas e metabólitos foram verificados na presença de etanol e/ou ketamina, haloperidol e naltrexona em dois protocolos. No protocolo 1 os antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide foram administrados após exposição prévia ao etanol e no protocolo 2 o etanol e esses antagonistas foram administradas associadas após o sétimo dia de tratamento com etanol (conforme descrito em materiais e métodos). Os resultados do protocolo 1 e 2 foram descrito abaixo:

### -Protocolo 1:

A **Figura 7** mostra os resultados da administração de ketamina após a retirada de etanol (Et+Ketamina-1), bem como a administração de ketamina (25 mg/kg, i.p.) ou etanol (4 g/kg, v.o.) sozinhos durante um período de sete dias. No grupo da retirada, os animais foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia; a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com ketamina até o 14<sup>o</sup> dia, sendo os animais sacrificados após 48 h da última administração. Nessa figura, os níveis de DA foram aumentados nos grupos tratados com etanol (46%) e ketamina (44,2%) isolados [F(3,32)=3,855; p=0,0195] quando comparados ao controle (**Figura 7-A**). No grupo da retirada, os níveis de DA (3510,6±578,6 ng/g de tecido) apresentaram uma diminuição em relação aos grupos tratados isoladamente, e voltaram aos valores dos controles (2826,5±176,5 ng/g de tecido).

Os níveis de DOPAC não foram diferentes estatisticamente após o tratamento com ketamina (3129,9±308,2 ng/g de tecido) e Et+ketamina-1 (2759,5±489 ng/g de tecido) quando comparados ao controle (2518,4±188,0 ng/g de tecido). Entretanto, um aumento deste metabólito foi observado após o tratamento com etanol (39%) em relação ao controle. Ao contrário do outro metabólito da DA, HVA, apresentou níveis diminuídos, após o tratamento com ketamina (720,3±88,3 ng/g de tecido) e com a associação (554,4±56 ng/g de tecido) quando comparados ao controle (1097,8±59,9 ng/g de tecido) e etanol (1030,9±122 ng/g de tecido) [F(3,38)=8,355; p=0,003].

Os níveis de NE (**Figura 7-B**) foram diminuídos na presença de etanol (170,1±10,8 ng/g de tecido) e aumentados no grupo da retirada de etanol (614,1±108,1

ng/g de tecido), quando comparados ao controle (327,1±41,1 ng/g de tecido) [F(3,35)=9,179; p=0,0002]. Contudo, uma inversão de efeitos foi observada entre os grupos tratados apenas com etanol e Et+ketamina-1. A ketamina sozinha apresentou um aumento não significativo em relação ao controle (51,7%) e significativo em relação ao grupo do etanol sozinho (191,6 ng/g de tecido).

Os níveis de serotonina e de 5-HIAA não foram alterados no grupo Et+ketamina-1, embora o grupo tratado apenas com ketamina tenha diminuído os níveis de 5-HT (47,4%; 52,8% e 46,9%) e 5-HIAA (55,6%; 64,9% e 49,8%) quando comparados aos grupos controle, etanol e Et+ketamina-1, respectivamente.

Quanto ao grupo onde o etanol foi retirado e o tratamento continuou apenas com haloperidol (Et+haloperidol-1), nenhuma alteração foi observada nos níveis de DA (3441,0±575,0 ng/g de tecido) e DOPAC (2500,0±188,0 ng/g de tecido) em relação aos grupos controle (DA:2826,5±176,5; DOPAC:2518,4±188 ng/g de tecido), etanol (DA:4143,1±365,2; DOPAC: 3501,1±328,5 ng/g de tecido) ou haloperidol (DA: 3090,9±258,9; DOPAC: 2067,0±304,5 ng/g de tecido) (**Figura 8-A**). Todavia, um aumento desta monoamina (46,6%; 34%) [F(3,31)=4,466; p=0,0110] e seu metabólito (39%; 69,4%) [F(3,42)=3,912; p=0,0155] tenha sido observado após o tratamento com etanol quando comparado ao controle e tratado com haloperidol, respectivamente. Por outro lado, nos grupos Et+haloperidol-1 (671,4±48,9 ng/g de tecido) ou haloperidol (671,4±48,9 ng/g de tecido) os níveis de HVA foram diminuídos em relação aos controles (1097,8±59,9 ng/g de tecido) e ao grupo tratado com etanol (1030,9±122 ng/g de tecido) [F(3,39)=10,014; p<0,0001].

Enquanto o etanol diminuiu os níveis de NE (170,1±10,8 ng/g de tecido) quando comparado ao controle (327,1±41,1 ng/g de tecido), haloperidol (426,1±52,9 ng/g de tecido) e Et+haloperidol-1 (413,4±28,6 ng/g de tecido), os animais que receberam apenas haloperidol sozinho, ou após a retirada de etanol, não apresentaram alterações em relação ao controle [F(3,35)=5,641; p=0,0032]. Esses resultados mostram que após a retirada do etanol o seu efeito é abolido e predomina o efeito do haloperidol.

Os níveis de 5-HT [F(3,39)=2,449; p=0,0493] e 5-HIAA [F(3,53)=3,659; p=0,0184] apresentaram uma diminuição após o tratamento com o haloperidol sozinho

(5-HT: 233,3±48,7; 5-HIAA: 304,2±45,1 ng/g de tecido) ou Et+haloperidol-1 (5-HT: 330,1±55,4; 5-HIAA: 410,7±32,6 ng/g de tecido) tanto em relação ao controle (5-HT: 402,0±33,6; 5-HIAA: 546,4±36,2 ng/g de tecido), quanto ao grupo tratado com etanol (5-HT: 448±59; 5-HIAA: 690,9±114,1 ng/g de tecido). Contudo, esses dados só apresentaram diferença estatística no grupo tratado com haloperidol em relação ao etanol sozinho (**Figura 8-B**).

No outro protocolo de retirada do etanol, onde o tratamento continuou com naltrexona (Et+naltrexona-1), nenhuma alteração foi observada nos níveis de DA (3316,9±480,2 ng/g de tecido) em relação ao controle (2826,5±176,5 ng/g de tecido) e ao grupo tratado apenas com naltrexona (3207,6±572,5 ng/g de tecido). Embora sem significância, foi observado que o grupo Et+naltrexona-1 impediu que os níveis desta monoamina fossem aumentados, como observado com o grupo tratado apenas com etanol (4143,1±365,2 ng/g de tecido) [F(3,32)=3,220; p=0,0371]. Por outro lado, o Et+naltrexona-1 bloqueou o aumento nos níveis de DOPAC (1924,5±360,7 ng/g de tecido), causado pela administração de etanol sozinho (3501,1±328,5 ng/g de tecido) [F(3,41)=4,372; p=0,0022]. Os níveis de DOPAC não foram diferentes entre os grupos controle (2518,4±188 ng/g de tecido), naltrexona (2272,5±212,8 ng/g de tecido) e Et+naltrexona (1924,5±360,7 ng/g de tecido). Nenhum efeito significativo foi observado nos níveis de HVA entre os grupos tratados com etanol e/ou naltrexona em relação aos controles (1097,8±59,9 ng/g de tecido) (**Figura 9-A**).

Os níveis de NE, após a administração de Et+naltrexona-1, se comportaram de maneira semelhante à associação de etanol com o haloperidol. A administração de naltrexona após a retirada de etanol (454,3±68,6 ng/g de tecido) evitou a diminuição de NE causada pelo grupo do etanol sozinho (170,1±10,8 ng/g de tecido) (quando comparado ao controle) [F(3,35)=6,030; p=0,0022]. Nenhum efeito foi observado entre os grupos controle (327,1±41,1 ng/g de tecido), naltrexona (440,6±36,5 ng/g de tecido) e Et+naltrexona-1 (454,3±68,6 ng/g de tecido) (**Figura 9-B**).

Quanto aos resultados com 5-HT e 5-HIAA, uma diminuição desta monoamina e de seu metabólito foi observada após o tratamento com naltrexona (5-HT: 218,8±28,9; 5-HIAA: 281,0±32,4 ng/g de tecido) em relação ao controle (5-HT: 402±33,6; 5-HIAA: 546,4±36,2 ng/g de tecido), etanol (5-HT: 448,0±59; 5-HIAA:

690,9±114,1 ng/g de tecido) e Et+naltrexona-1 (5-HT: 331,8±59; 5-HIAA: 532,7±33,6 ng/g de tecido). Deve-se salientar que este efeito somente foi significativo quando o grupo da naltrexona foi comparado aos grupos controle e etanol. Nenhuma outra alteração foi observada nos níveis de 5-HT e 5-HIAA.

### **-Protocolo 2:**

A **Figura 10** mostra os resultados da administração associada de etanol + ketamina (Et+Ketamina-2), ketamina ou etanol sozinho. No grupo da associação, os animais foram tratados somente com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a ketamina foi administrada e o tratamento associado continuou até o 14<sup>o</sup> dia, sendo os animais sacrificados após 48 h. Os níveis de DA foram elevados após o tratamento com etanol (3570,6±407 ng/g de tecido), ketamina (4075±501 ng/g de tecido) e a associação (3800,9±478,9 ng/g de tecido) quando comparado ao controle (2826,5±176,5 ng/g de tecido) (**Figura 10-A**). Entretanto, diferença significativa somente foi observada entre os grupos da ketamina e controle [F(3,29)=3,286; p=0,0365]. Nenhuma alteração foi encontrada entre os grupos tratados com etanol e/ou ketamina. Uma tendência a elevação dos níveis de DOPAC também foi evidenciada após o tratamento com etanol (3418,8±435,4 ng/g de tecido) ou ketamina (3129,9±308,2 ng/g de tecido) sozinhos, em relação ao controle (2518,4±188 ng/g de tecido). Contudo, no grupo onde o etanol foi associado com ketamina essa elevação foi estatisticamente significativa [F(3,41)=3,298; p=0,0306]. Quanto aos níveis de HVA, uma tendência [F(3,39)=2,451; p=0,0792] de diminuição foi observada após a administração de ketamina (720,3±88,3 ng/g de tecido) em relação ao controle (1097,8±59,9 ng/g de tecido). Contudo, esse efeito parece ter sido bloqueado pela associação de Et+ketamina-2 (1117,8±155,5 ng/g de tecido).

Os níveis de NE apresentaram um aumento, não significativo, no grupo tratado com ketamina (496,3±69,7 ng/g de tecido) quando comparado ao controle (327,1±41,1 ng/g de tecido). Todavia, esse efeito foi potencializado pela associação de Et+ketamina (594,3±53,8 ng/g de tecido) quando comparado ao controle e ao grupo tratado apenas com etanol (373,9±48,7 ng/g de tecido). Nenhuma alteração foi observada nos níveis de NE entre os animais tratados com etanol e ketamina sozinhos.

Uma diminuição nos níveis de 5-HT [ $F(3,40)=4,265$ ;  $p=0,0110$ ] e 5-HIAA [ $F(3,55)=5,036$ ;  $p=0,0039$ ] foi observada após o tratamento com ketamina (5-HT:  $211,4 \pm 19,9$ ; 5-HIAA:  $242,6 \pm 16,1$  ng/g de tecido) quando comparado ao controle (5-HT:  $402 \pm 33,6$ ; 5-HIAA:  $546,4 \pm 36,2$  ng/g de tecido) (**Figura 10-B**). A associação desta droga com o etanol (5-HT:  $304,5 \pm 25,0$ ; 5-HIAA:  $496,4 \pm 26,7$  ng/g de tecido) apresentou uma tendência a bloquear o efeito da ketamina e elevou os resultados para os níveis dos controle. Nesse protocolo, os níveis de 5-HT e 5-HIAA também apresentaram uma tendência a diminuir após o tratamento com etanol quando comparado ao controle.

Na associação de etanol com haloperidol (Et+haloperidol-2), os níveis de DA ( $4597,2 \pm 399,5$  ng/g de tecido) [ $F(3,30)=7,875$ ;  $p=0,0006$ ] e DOPAC ( $3712,9 \pm 326,9$  ng/g de tecido) [ $F(3,40)=5,121$ ;  $p=0,0046$ ] foram elevados tanto em relação ao grupo controle (DA:  $2826,5 \pm 176,5$ ; DOPAC:  $2518,4 \pm 188$  ng/g de tecido), quanto ao grupo tratado apenas com haloperidol (DA:  $3090,9 \pm 258,9$ ; DOPAC:  $2067,0 \pm 304,5$  ng/g de tecido) (**Figura 11-A**). Esse aumento também foi evidenciado nos níveis de DA após o tratamento com a associação, quando comparado ao grupo do etanol. Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de DA entre os grupos controle, etanol e haloperidol. Entretanto, uma inversão de efeitos foi evidenciada nos níveis de DOPAC entre os grupos tratados com etanol ou haloperidol.

Enquanto os níveis de HVA foram diminuídos na presença de haloperidol sozinho ( $556,5 \pm 47,4$  ng/g de tecido) quando comparado aos grupos controle ( $1097,8 \pm 59,9$  ng/g de tecido) e etanol ( $933,4 \pm 112,1$  ng/g de tecido), a associação de haloperidol com etanol ( $905,1 \pm 63,6$  ng/g de tecido) bloqueou esse efeito e elevou os níveis deste metabólito para os valores dos animais controle e tratados com etanol [ $F(3,38)=7,865$ ;  $p=0,004$ ]. Deve-se dizer que os animais tratados com etanol não sofreram alterações nos níveis de HVA quando comparados aos controles.

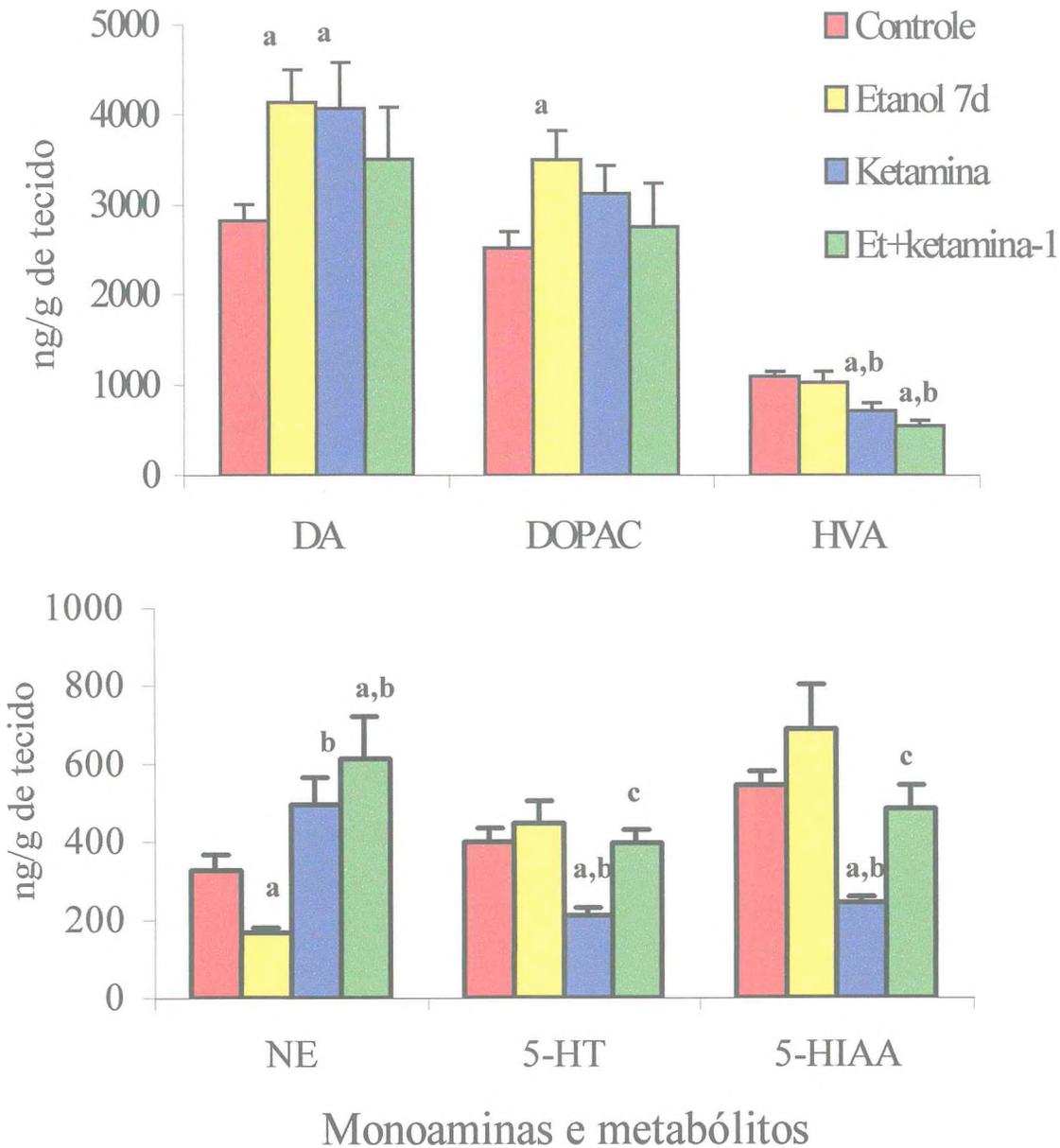
Quanto aos níveis de NE, nenhum efeito significativo foi observado em relação ao controle ( $327,1 \pm 41,1$  ng/g de tecido). Entretanto, uma tendência a elevação desta monoamina foi observado após a associação de Et+haloperidol-2 ( $515,9 \pm 42,1$  ng/g de tecido) quando comparado ao grupo controle e etanol sozinho ( $373,9 \pm 48,7$  ng/g de tecido) (**Figura 11-B**).

Ainda neste protocolo experimental, os níveis de 5-HT foram diminuídos após a associação de Et+haloperidol-2 (147,3±10,8 ng/g de tecido) ou haloperidol (233,3±48,7 ng/g de tecido), quando comparado ao grupo controle (402±33,6 ng/g de tecido) [F(3,38)=7,517; p=0,0005]. Entretanto, uma diminuição não significativa também foi observada com os animais tratados com etanol (282,0±10,8 ng/g de tecido) isolados, quando comparado ao controle. Efeito oposto foi verificado com o metabólito da 5-HT quando associado Et+haloperidol-2. Enquanto a associação de Et+haloperidol-2 potencializou a diminuição dos níveis de 5-HT quando comparado aos grupos etanol (47,8%) ou haloperidol (37%), a associação destas drogas bloqueou a diminuição dos níveis de 5-HIAA (473,6±14,3 ng/g de tecido) [F(3,53)=3,625; p=0,0191] observada após o tratamento isolado com haloperidol (304,2±45,1 ng/g de tecido) e não foi diferente do grupo tratado apenas com etanol (356,2±34,8 ng/g de tecido) (**Figura 11-B**).

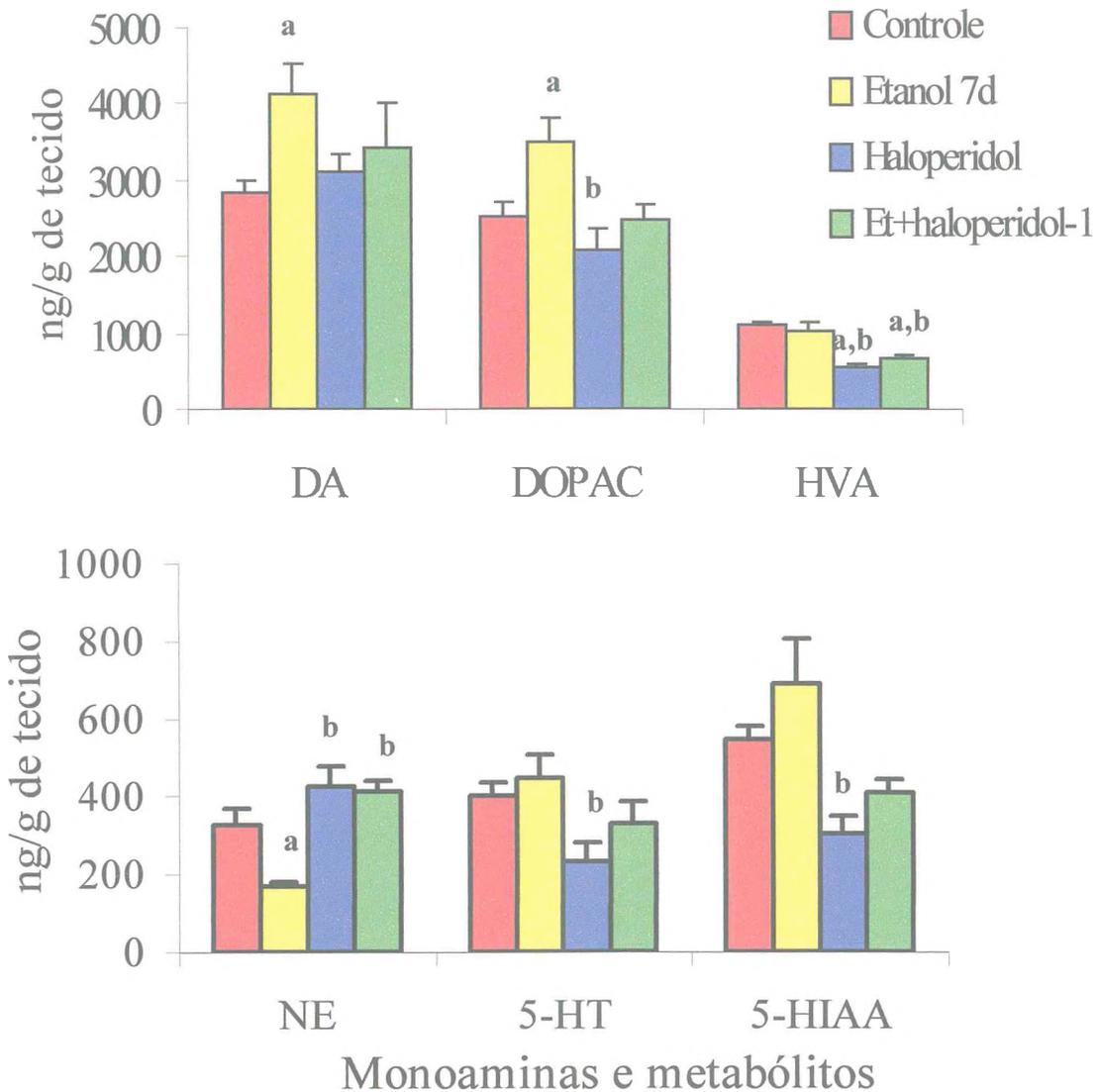
A **Figura 12-A** mostra os resultados do tratamento sozinho e/ou associado de etanol e naltrexona. Os níveis de DA não foram alterados de maneira significativa após a administração de etanol e/ou naltrexona em relação ao controle (2826,5±176,5 ng/g de tecido) [F(3,30)=1,430; p=0,2558]. Os níveis de DOPAC também não foram diferentes estatisticamente [F(3,40)=2,162; p=0,1089], embora uma tendência ao aumento desse metabólito tenha sido observada após o tratamento com etanol (3418,8±435,4 ng/g de tecido), quando comparado ao controle (2518,4±188 ng/g de tecido) ou naltrexona (2272,5±212,8 ng/g de tecido). Os níveis de HVA não foram diferentes em nenhum tratamento quando comparado ao grupo controle (1097,8±59,9 ng/g de tecido). Contudo, um aumento de HVA foi evidenciado após a associação de Et+naltrexona (1263,8±109,2 ng/g de tecido) quando comparado ao grupo tratado apenas com naltrexona (767,8±139,4 ng/g de tecido) [F(3,38)=3,548; p=0,0242].

A associação destas drogas também elevou os níveis de NE (624,3±70,4 ng/g de tecido) quando comparado ao controle (327,1±41,1 ng/g de tecido) e etanol (373,9±48,7 ng/g de tecido) [F(3,34)=6,080; p=0,0022]. Essa elevação também foi observada em relação ao grupo tratado apenas com naltrexona (440,6±36,5 ng/g de tecido), porém de maneira não significativa.

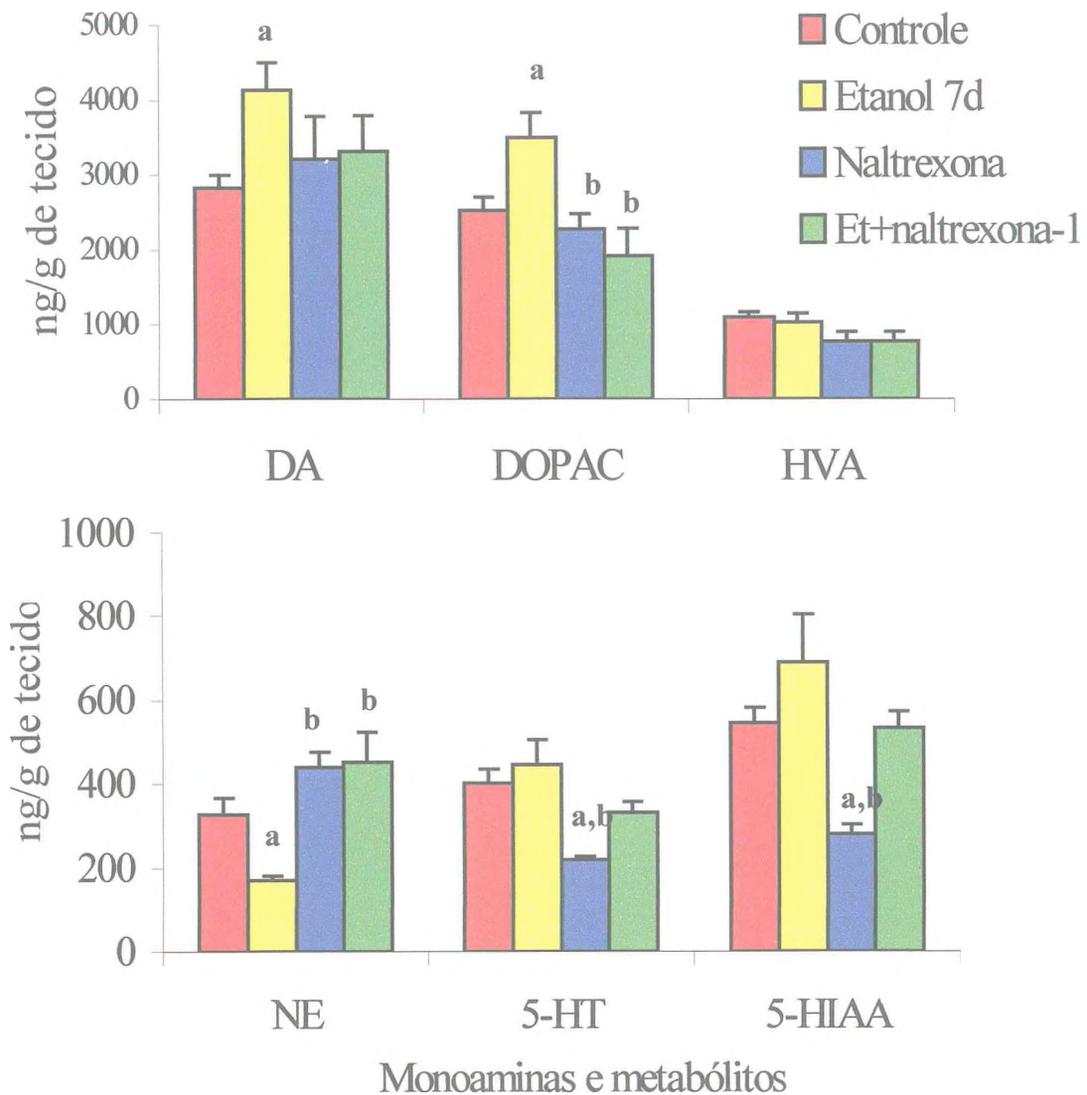
Quanto aos níveis de 5-HT (**Figura 12-B**), uma diminuição foi observada após o tratamento com etanol ( $282,0 \pm 10,8$  ng/g de tecido), naltrexona sozinho ( $218,8 \pm 28,9$  ng/g de tecido) ou associado ( $185,2 \pm 26,5$  ng/g de tecido) com etanol, quando comparado ao grupo controle ( $402,0 \pm 33,6$  ng/g de tecido) [ $F(3,39)=6,996$ ;  $p=0,0008$ ]. Por outro lado, o seu metabólito somente foi diminuído no grupo da naltrexona ( $281,0 \pm 32,4$  ng/g de tecido) quando comparado ao controle ( $546,4 \pm 36,2$  ng/g de tecido) [ $F(3,54)=4,033$ ;  $p=0,0119$ ]. Nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos controle, etanol ( $356,2 \pm 34,8$  ng/g de tecido) e Et+naltrexona-2 ( $477,3 \pm 40,3$  ng/g de tecido).



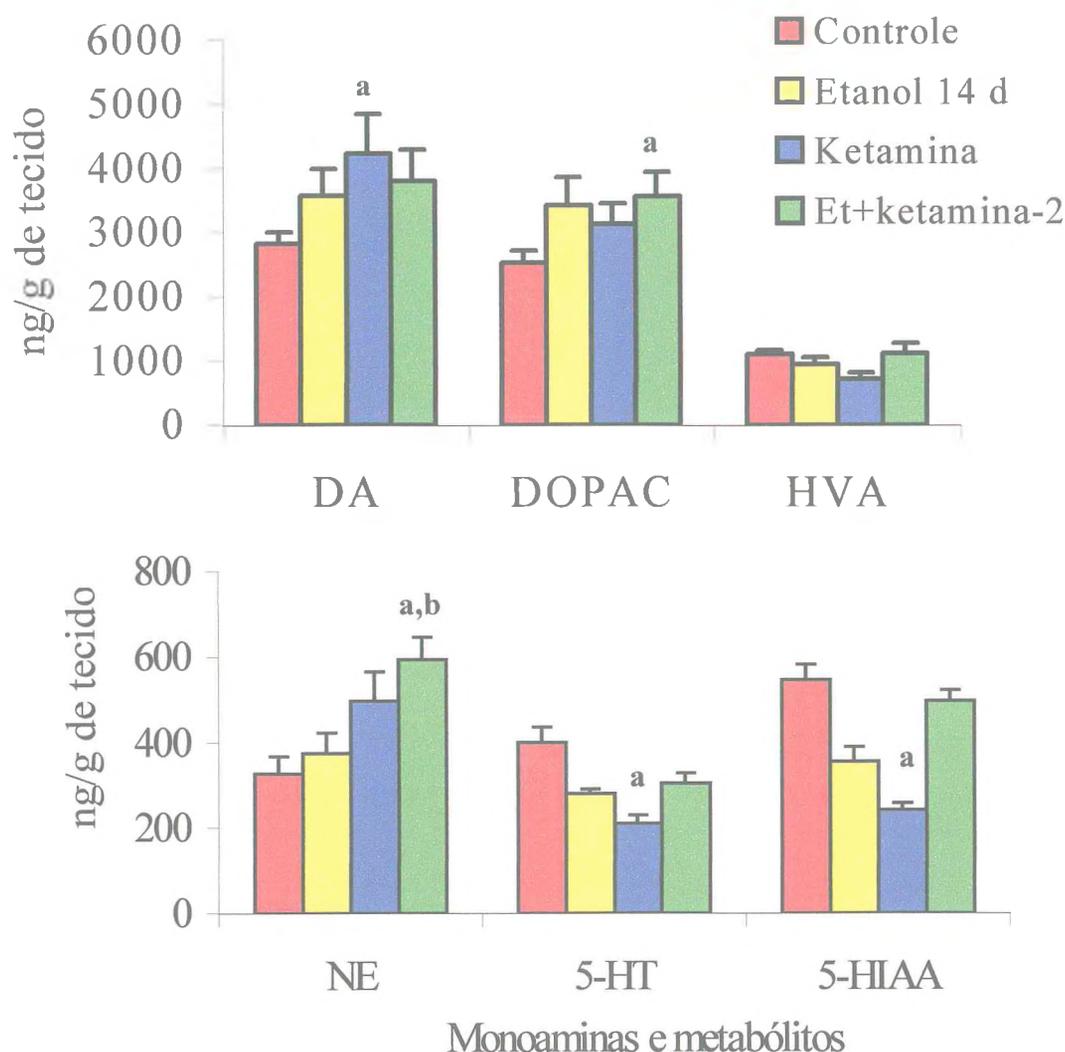
**Figura 7-** Efeitos da administração do etanol, ketamina ou Et+ketamina-1 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, vo), ketamina (25 mg/kg, ip) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais da associação Et+ketamina-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com ketamina até o 14<sup>o</sup> dia e 48 h após a última administração das drogas os animais foram sacrificados. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol e ketamina, respectivamente.



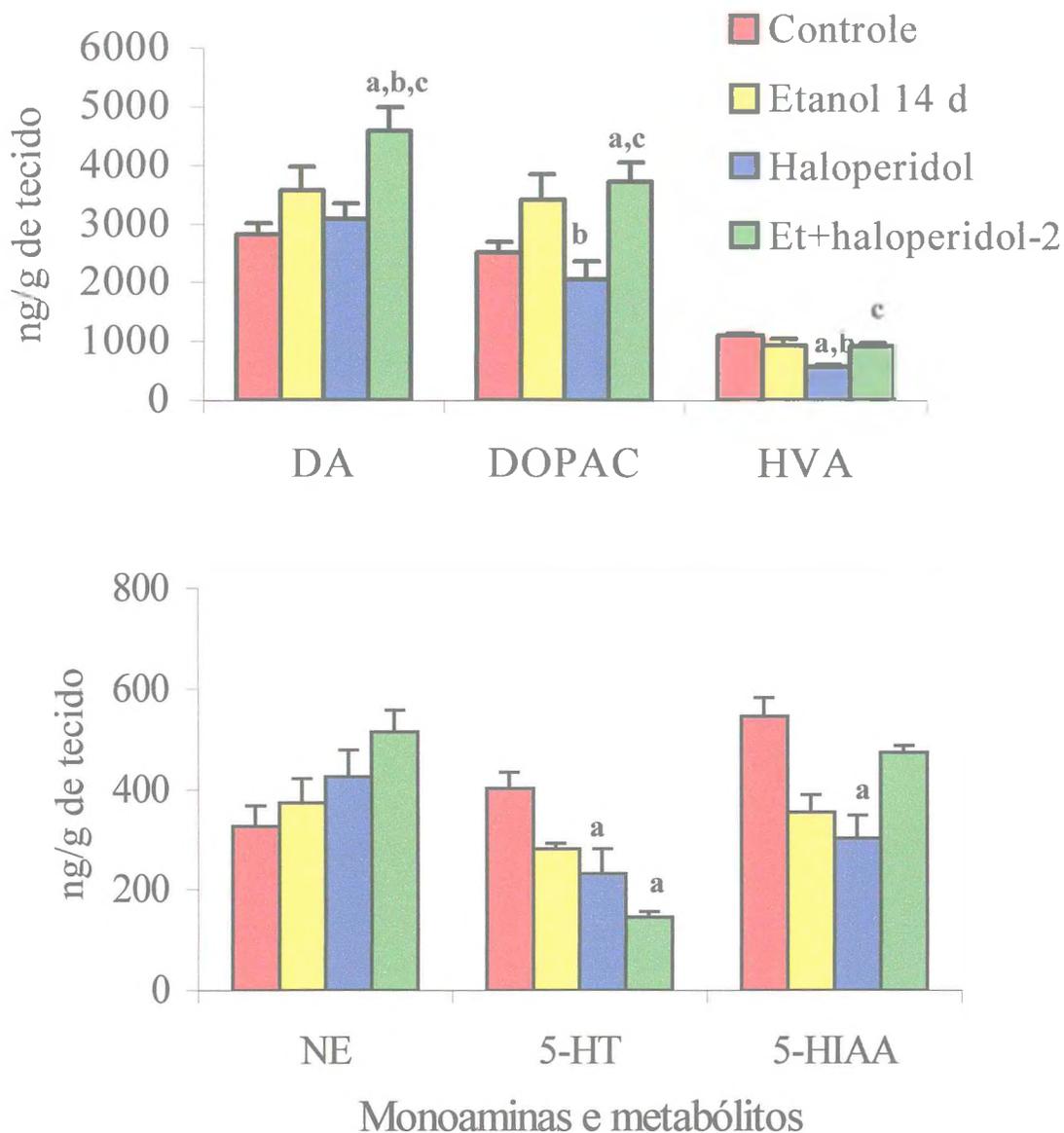
**Figura 8-** Efeitos da administração do etanol, haloperidol ou Et+haloperidol-1 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o), haloperidol (1 mg/kg, i.p.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais da associação Et+haloperidol-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com haloperidol até o 14<sup>o</sup> dia e 48 h após a última administração das drogas os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle e etanol, respectivamente.



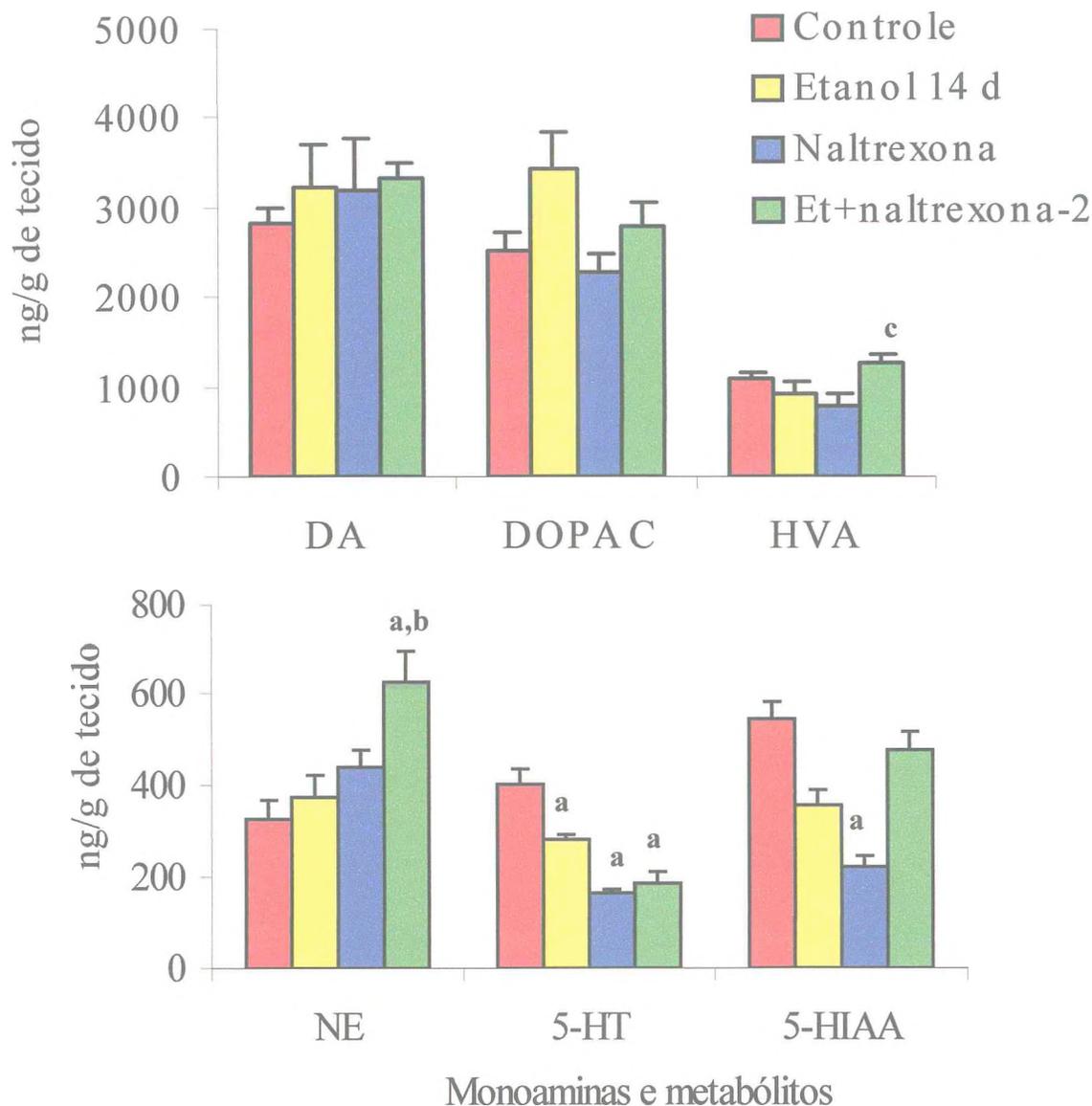
**Figura 9-** Efeitos da administração do etanol, naltrexona ou Et+naltrexona-1 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o.), naltrexona (10 mg/kg, v.o.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48h após a última administração da droga. Os animais da associação Et+naltrexona-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com naltrexona até o 14<sup>o</sup> dia e 48 h após a última administração das drogas os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle e etanol, respectivamente.



**Figura 10-** Efeitos da administração do etanol (14 d), ketamina ou Et+ketamina-2 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais dos grupos controle (água destilada) e ketamina (25 mg/g, i.p.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+ketamina-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a ketamina foi administrada. Essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e 48 h após a última administração das drogas os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle e etanol 14 d, respectivamente.



**Figura 11-** Efeitos da administração do etanol, haloperidol ou Et+haloperidol-2 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais dos grupos controle (água destilada) e haloperidol (1 mg/kg, i.p.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+haloperidol-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, o haloperidol foi administrado. Essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e 48 h após a última administração das drogas os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, b e c ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 14 d e haloperidol, respectivamente.



**Figura 12-** Efeitos da administração do etanol, naltrexona ou Et+naltrexona-2 sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA (A) ou NE, 5-HT e 5-HIAA (B) no corpo estriado de ratos. Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais dos grupos controle (água destilada) e da naltrexona (10 mg/kg, v.o.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+naltrexona-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a naltrexona foi administrada. Essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e 48 h após a última administração das drogas os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, b e c ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 14 d e naltrexona, respectivamente.

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo, mostraram que o etanol significativamente aumentou os níveis de DA (30 min) e NE (48 h), após o tratamento agudo com dose de 4 g/kg, v.o. A exposição dos animais à doses repetidas de etanol (4 g/kg, diariamente durante sete dias), manteve os níveis elevados de DA e DOPAC após 30 min e 48 h, da última administração e diminuiu os níveis de NE após 48 h de retirada. Efeito semelhante foi observado nos níveis de DA nas outras duas doses estudadas (Et 0,5 e 2 g/kg), mostrando assim que esse aumento não foi dose dependente no intervalo de doses utilizadas. Por outro lado, nenhuma alteração foi observada nos níveis de HVA. Estudos usando doses moderadas de etanol demonstraram um aumento no *turnover* e na liberação de DA (Imperato & Di Chiara, 1986) em várias regiões cerebrais durante intoxicação, e contrariamente uma dramática diminuição de liberação de DA durante retirada do etanol em NAc (Diana et al., 1993) e corpo estriado (Rossetti et al., 1992), efeitos esses revertidos por doses elevadas de etanol. Contudo, nas condições experimentais daqueles estudos, a mensuração de DA foi extracelular realizada através de técnica de microdiálise, enquanto no presente trabalho foi determinado o conteúdo total de DA do tecido.

Bailey et al. (2000) observaram que, 24 h após o término do tratamento com etanol administrado cronicamente (três semanas), aumentos de NE e DA foram evidenciados no corpo estriado e área tegmentar ventral, enquanto Varkov & Malikova (1985) observaram diminuições nas concentrações de NE, DA e HVA após a ingestão voluntária de etanol por 8 meses. Contudo, enquanto alguns dados da literatura (Varkov & Malikova, 1985) são divergentes dos nossos, outros (Mirovsky et al., 1995) similarmente aos deste trabalho mostraram um aumento de DA no corpo estriado após a retirada do etanol.

Quanto aos níveis de NE, Rossetti et al. (1992) encontraram um efeito bifásico na liberação deste neurotransmissor no córtex frontal, sendo que em baixa dose o etanol (0,2 g/kg) aumentou a liberação, enquanto que em alta dose (2 g/kg) inibiu a liberação de NE. Os autores sugerem que a diminuição cortical de NE pode refletir as propriedades sedativas e hipnóticas do etanol, observadas quando altas doses são administradas; e o aumento da liberação de NE pode representar uma correlação

bioquímica com o quadro de euforia provocado por baixas doses de etanol. Outros estudos (Eisenhofer et al., 1990), examinando o *turnover* de NE e DA depois de 2 ou 7 dias de contínua ingestão de etanol, observaram uma redução de DA no corpo estriado e um aumento de NE no tronco cerebral em torno de 8 horas após a retirada de etanol. Os resultados sugerem que mudanças no *turnover* de neurotransmissores, em regiões específicas do cérebro, podem refletir alterações na atividade neuronal que resultam da retirada do etanol ou podem ser determinantes de sintomas específicos da retirada do etanol. Contudo, o trabalho de Inoue (2000) mostra que o etanol não afeta a acumulação de L-DOPA em córtex cerebral rico em noradrenalina, indicando assim que a síntese de NE não é afetada pelo etanol.

A administração repetida de altas doses de etanol (4 g/kg), durante um período de 7 dias após 30 min, causou um aumento nos níveis de 5-HIAA. Entretanto, quando o tempo de retirada foi prolongado para 48 h, os valores voltaram para os níveis dos animais controle, embora uma tendência a aumento ainda tenha sido observada. A dose e o tempo de retirada do etanol parecem ser fatores relevantes na mensuração de serotonina. Assim, diminuições dessa monoamina e de seu metabólito foram observados, após a administração de baixas doses de etanol (0,5 g/kg) e com retirada de 48 h. Esses resultados mostraram que os níveis de 5-HT e de seu metabólito não são constantes na presença do etanol e sofrem variação com a dose e tempo de retirada da droga.

Estudos em animais demonstram que a exposição aguda ao etanol eleva os níveis de serotonina dentro de áreas cerebrais (Le Marquand et al., 1994), sugerindo que uma maior quantidade de serotonina é liberada de axônios serotoninérgicos ou que o neurotransmissor é mais lentamente removido da fenda sináptica. Entretanto, o consenso geral é de que existe uma relação inversa entre o sistema serotoninérgico cerebral e a preferência por álcool (Nevo & Hamon, 1995). Evidências (Le Marquand et al., 1994; McBride et al., 1995) mostraram que níveis de 5-HT e metabólitos cerebrais foram menores em ratos que preferem álcool do que naqueles que não o preferem. Essas observações levam a hipotetizar que, em alcoólatras, este fato em parte representa uma tentativa do organismo para normalizar os níveis de 5-HT em regiões cerebrais chaves, já que o consumo agudo de álcool pode elevar os níveis de serotonina.

No nosso trabalho, com o propósito de investigar os níveis de monoaminas após uma longa exposição ao etanol, os animais foram tratados por 30 dias e as monoaminas e metabólitos foram mensurados 30 min e 48 h após a última administração de etanol (2 ou 4 g/kg, v.o.). Significantes diminuições de DA e DOPAC com ambas as doses e nos dois tempos de retirada foram observados. Os nossos resultados estão de acordo com aqueles de Gil et al. (1992) que mostraram notável diminuição dos níveis de DA e DOPAC em corpo estriado de ratos, 24 h após a retirada de etanol administrado durante 40 dias. Similarmente, Bailey et al. (2000) observaram diminuição de DA e de seus metabólitos no corpo estriado durante a fase de retirada após 24 h da administração crônica de etanol. Contudo, esses pesquisadores não observaram nenhuma alteração 6 dias ou 2 meses depois da retirada do álcool em corpo estriado. Entretanto, esses efeitos sugerem que após longa administração de etanol os níveis de DA e DOPAC foram depletados, hipótese essa confirmada pelos resultados do presente trabalho, de vez que houve uma diminuição dos níveis de DA e DOPAC após a retirada de 30 min e 48 h.

Por outro lado, nenhuma alteração foi observada nos níveis de HVA, após 30 dias de tratamento. Segundo Potschka et al. (1999), o HVA reflete o nível de DA liberado para a fenda sináptica (liberação de DA-extraneuronal) e o DOPAC a degradação de DA intraneuronal (refletindo na síntese de DA-intraneuronal). Contudo, alguns trabalhos (Westerink & Kikkert, 1986) não concordam com essa interpretação, pois acreditam que drogas que agem a nível central podem inibir o efluxo de HVA e DOPAC no cérebro de ratos. Assim, analisando os resultados do presente trabalho, podemos sugerir que a degradação extraneuronal não foi alterada, enquanto a intraneuronal foi diminuída em ambos os períodos de retirada. A literatura não é conclusiva sobre as mudanças ocorridas nos níveis de HVA. Alguns investigadores observaram um aumento (Uzbay et al., 1998) enquanto outros observaram diminuição (Gil et al., 1992) nos níveis de HVA. Essas discrepâncias podem estar relacionadas a procedimentos experimentais diferentes tais como período de exposição ao álcool, agudo ou crônico, dose de etanol, espécie animal utilizada e intervalos de observação experimental (Boone et al., 1997; Shimada et al., 1997).

Os resultados de 5-HT e 5-HIAA apresentaram um efeito bifásico tempo dependente. Assim, elevações nos níveis de 5-HT e 5-HIAA foram observadas após 30 dias de tratamento com retirada de 30 min e uma diminuição foi observada após 48 h de

retirada. Esses resultados mostraram que, mesmo depois de um longo período de tratamento com etanol, os neurônios serotoninérgicos ainda conseguem sintetizar e liberar 5-HT, entretanto com o aumento do tempo de retirada ocorre um quadro de depleção semelhante àquele da DA. Uzbay et al. (1998) observaram uma diminuição nos níveis de 5-HT durante as primeiras 6 horas de retirada de etanol e de acordo com esses autores, isso pode indicar que a diminuição na atividade serotoninérgica pode estar envolvida na fase inicial da retirada do etanol. Várias evidências (Badawy and Ewans, 1983; Kempf et al., 1990; Weiss et al., 1996; Pistis et al., 1997) também mostraram diminuição no conteúdo de 5-HT e 5-HIAA em roedores em todo o cérebro, bem como nas preparações de tecido de áreas límbicas e corpo estriado após a retirada de etanol.

Nenhuma alteração foi observada nos níveis de NE após tratamento crônico com etanol (2 e 4 g/kg) e retirada de 48 h. Entretanto, após 30 min de retirada uma grande diminuição nos níveis de NE foi observada em ambas as doses. Este trabalho concorda com outros (Gothert et al., 1979), onde uma diminuição de NE também foi observada após o tratamento com etanol. Contudo resultados contraditórios ainda são encontrados na literatura (Liljequist et al., 1981).

No presente trabalho os níveis de monoaminas foram determinados no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia, após a administração de etanol (4 g/kg) e retirada de 48 h. Assim, um aumento (1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias) e diminuição (30<sup>o</sup> dia) dos níveis de DA e DOPAC, bem como um aumento inicial nos níveis de NE foram observados em função do tempo de administração do etanol. Os níveis de 5-HT também sofreram uma alteração tempo dependente. Assim, este trabalho mostrou claramente que o etanol altera essas monoaminas e metabólitos, exceto o HVA, e que a duração do tratamento e o tempo de retirada são dois dos principais fatores envolvidos no efeito final do etanol.

Os níveis de monoaminas e metabólitos também foram verificados após tratamento com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide na presença do etanol (protocolo 2) ou após uma exposição prévia ao etanol e conseqüente retirada (protocolo 1) em corpo estriado de ratos.

A administração de ketamina, após uma exposição prévia ao etanol (Et+ketamina-1) não alterou os níveis de DA e DOPAC, embora o etanol ou a própria

ketamina alterem essa monoamina. Um efeito inverso foi observado tanto com a ketamina quanto com Et+ketamina-1, nos níveis de HVA (Figura 7), sugerindo que a ketamina diminui a liberação de DA no corpo estriado de ratos e o aumento observado com a DA não foi devido ao aumento de sua liberação. Entretanto, quando a ketamina foi administrada, a partir do 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes do etanol (Et+ketamina-2) um aumento de DA e DOPAC foram observados, sem nenhuma alteração nos níveis de HVA sugerindo que na presença do etanol ocorre uma alteração de DA, possivelmente através do aumento da síntese desta monoamina, com consequente aumento de DOPAC. Estes resultados indicam que a exposição prévia ao etanol modifica os efeitos da ketamina, mostrando assim uma interação do etanol com os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, fenômeno esse já observado em outros estudos (Carlsson & Carlsson, 1990).

Se o fenômeno de reforço ao etanol é entendido como um aumento de DA no CE e NAc (Di Chiara, 1995; Di Chiara, 1990), o uso de ketamina fica prejudicado para esse propósito, desde que no presente estudo e em outros (Potschka et al., 1999; Miller & Abercrombie, 1996), drogas antagonistas do sistema glutamatérgico, como a ketamina, causaram um aumento de DA. Contudo, a ketamina parece aumentar os níveis de DA através dos seguintes mecanismos: bloqueio de receptores pré-sinápticos dopaminérgicos (Potschka et al., 1999); bloqueio da modulação inibitória via receptores NMDA (Potschka et al., 1999); diminuição da atividade de neurônios gabaérgicos em CE, o que resulta em uma menor inibição de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais e consequentemente um aumento da liberação de DA no CE (Carlsson & Carlsson, 1990) ou ainda pelo efeito de *upregulation* causado após inibição prolongada dos receptores NMDA e consequente modulação positiva na liberação de glutamato (Moghaddam & Adams, 1998).

Segundo estudo realizado por Potschka et al. (1999), a administração de D-CPPene 3-(2-carboxipiperazina-4-yl) profenil-1-fosfonato, uma antagonista competitivo de receptor NMDA, aumentou os níveis de DA e HVA, sem alterar os níveis de DOPAC. Contudo, existem algumas controvérsias, se antagonistas competitivos ou não-competitivos de NMDA aumentam o *turnover* de DA no CE e NAc de ratos (Rao et al., 1991; Whitton et al, 1992; Waters et al., 1996).

Os níveis de NE foram aumentados tanto no grupo Et+ketamina-1, quanto no grupo Et+ketamina-2; mostrando que, durante a exposição prévia ao etanol (Et+ketamina-1), um efeito inverso foi causado pela administração de ketamina, quando comparado ao etanol sozinho. Segundo Davis (1978), o sistema noradrenérgico cerebral tem um importante papel no efeito de reforço da retirada do etanol, que parece ser modulado via sistema dopaminérgico. Entretanto, uma clara correlação também é vista entre os sistemas glutamatérgico e noradrenérgico. Segundo Sepulveda et al. (1995), os receptores de NMDA causam a liberação de NE no giro denteado após o tratamento de 30 dias com etanol. Contudo, efeito inverso foi observado por Engberg & Hajas (1992) que mostraram um aumento na liberação de NE, causado pelo glutamato, e que esse efeito foi inibido por etanol. Ainda Nishimura et al. (1998) trabalhando com cultura de células, encontraram que a ketamina inibe a proteína transportadora de NE. Assim, como comentado anteriormente os diferentes protocolos experimentais mostrados na literatura podem explicar as diferenças encontradas nos resultados dos estudos com etanol.

Nós mostramos que enquanto a ketamina sozinha diminuiu os níveis de 5-HT e 5-HIAA, esse efeito foi revertido no grupo exposto previamente ao etanol. Entretanto, no grupo da associação (Et+ketamina-2) os níveis de 5-HT e 5-HIAA apresentaram uma tendência a voltar para os níveis do controle e do etanol sozinho. Esses achados sugerem que a exposição prévia ao etanol parece causar uma alteração neuroquímica (a nível de receptores, recaptação ou liberação do neurotransmissor) duradoura, impedindo que os níveis de 5-HT e 5-HIAA se comportem de maneira semelhante ao da ketamina sozinha. Segundo Bailey et al. (2000), a administração aguda e crônica de etanol produz diferentes efeitos no conteúdo de monoaminas na área tegmentar ventral e no corpo estriado de camundongos com alterações observadas na área tegmentar ventral que permanecem até 2 meses após ter cessado o tratamento crônico com etanol. Segundo os autores, essas alterações a longo prazo podem estar implicadas no desejo de continuar a usar a droga.

O sistema glutamatérgico também tem uma relação direta com o sistema serotoninérgico. Assim alguns trabalhos mostraram que a administração de antagonistas

de receptores NMDA aumentam os níveis de 5-HT no CE (Wedzony et al., 1996; Dai et al., 1995), enquanto outros não mostraram nenhum efeito (Nevo & Hamon, 1995).

Enquanto a administração de haloperidol sozinho, ou após a exposição ao etanol (Et+haloperidol-1), não causou nenhuma alteração nos níveis de DA e DOPAC em relação ao controle, uma diminuição de HVA foi observada após esses tratamentos. Entretanto, quando essas drogas foram administradas associadas (Et+haloperidol-2) foram aumentados os níveis de DA e DOPAC enquanto nenhuma alteração foi detectada nos níveis de HVA. Analisando esses resultados, a administração de Et+haloperidol-2 parece aumentar a síntese de DA, pois os níveis de DOPAC também foram aumentados e os de HVA inalterados.

Esses resultados mostram uma importante implicação para a terapêutica da retirada do álcool com drogas antagonistas dopaminérgicas. Assim, observa-se que a ingestão do etanol durante o tratamento do alcoolismo pode desequilibrar e alterar o estado de abstinência, e o indivíduo, pela elevação dos níveis centrais de DA, voltar a utilizar a droga. Esse, segundo alguns autores (Weiss et al., 1990), pode ser um ponto relevante relacionado ao limitado uso do haloperidol na terapêutica do alcoolismo. Outro ponto relevante que foi hipotetizado a partir do presente trabalho, é de que o haloperidol poderá servir como uma droga preventiva para o alcoolismo em famílias com história de alcoolismo severo. Contudo, estudos futuros serão necessários para testar essa hipótese.

Os níveis de NE foram aumentados tanto no grupo Et+haloperidol-1, quanto no grupo Et+haloperidol-2, em relação àquele tratado apenas com o etanol, embora durante a associação (Et+haloperidol-2) os níveis de NE apresentaram uma tendência à potencialização do efeito das drogas. Segundo Westerink et al. (2001), o haloperidol aumenta os níveis extracelulares de NE em córtex prefrontal de ratos e esse efeito parece ser resultado de inibição de receptores 5-HT<sub>2</sub> e não somente o efeito em receptores D<sub>2</sub>. Também, Bazyan et al. (2000) mostraram que o haloperidol interagindo com autoreceptores-DA em terminações dopaminérgicas e com heteroreceptores-DA em terminais noradrenérgicos induz uma potencialização a longo prazo de K<sup>+</sup>, levando a liberação de NE e DA, de maneira cálcio dependente.

Nós observamos que enquanto o haloperidol sozinho diminuiu os níveis de 5-HT e 5-HIAA, esse efeito foi revertido no grupo com exposição prévia ao etanol. Entretanto, no grupo da associação (Et+haloperidol-2), os níveis de 5-HT continuaram diminuídos, enquanto seu metabólito voltou para valores semelhantes daqueles do controle e etanol. Novamente, o etanol parece produzir uma alteração neuroquímica que após 9 dias de sua retirada ainda interfere com a ação do haloperidol.

Estudos têm mostrado que existe uma relação de automodulação entre os sistema de monoaminas cerebrais (Sershen et al., 1997). Assim, a 5-HT aumenta a liberação de DA no tecido estriado (Sershen et al., 2000) e isso tem sido especulado estar relacionado com o bloqueio de recaptção de DA e ação a nível de receptor pré-sináptico da 5-HT. Contudo, não se pode esquecer que o haloperidol atua também em receptores de serotonina (Rang et al., 2001) e essa interação também pode interferir na regulação de serotonina.

O tratamento com naltrexona sozinha, ou após a exposição prévia ao etanol (Et+naltrexona-1), não alterou os níveis de DA, DOPAC e HVA. Entretanto, o grupo Et+naltrexona-1 bloqueou o aumento causado por etanol nos níveis de DA e DOPAC, sugerindo que a exposição prévia ao etanol não parece interferir com os efeitos da naltrexona. Outro achado relevante é de que a naltrexona sozinha não interfere nos níveis de DA e de seus metabólitos no CE. Esse resultado está de acordo com trabalho prévio (Benjamin et al., 1993), onde a naltrexona sozinha não diminuiu os níveis basais de DA no NAc. Durante a administração associada de etanol e naltrexona, nenhuma diferença foi observada nos níveis de DA, DOPAC e HVA, exceto por um aumento de HVA após a associação quando comparado ao grupo da naltrexona. Esses resultados confirmam assim o uso terapêutico da naltrexona (O'Brien et al., 1996) no tratamento do alcoolismo. Diferentemente do haloperidol, a naltrexona bloqueou o aumento de DA, tanto em animais previamente expostos ao etanol quanto durante as associações com etanol.

Vários trabalhos (Di Chiara, 1995; Mathews & German, 1984) mostraram que o etanol afeta a síntese e liberação de monoaminas no cérebro e que a liberação de DA

parece também estar relacionada com o sistema opióide endógeno. Segundo Spanagel et al. (1992), a atividade de receptores  $\mu$ -opióides originados na área A10 do tronco encefálico aumentam a atividade basal do sistema de reforço mesolímbico. Gonzales & Weiss (1998) mostraram que a naltrexona reduz a atividade do sistema dopaminérgico induzida pelo etanol e segundo Inoue (2000) esse efeito parece ser consequência do bloqueio nos disparos de neurônios dopaminérgicos na área A9 e A10, localizadas no tronco encefálico, e da diminuição da síntese de DA no corpo estriado e núcleo acumbente.

Nenhum efeito foi visualizado nos níveis de NE após a administração de naltrexona ou Et+naltrexona-1. A associação de Et+naltrexona-2 elevou os níveis dessa monoamina em corpo estriado. Enquanto nenhum efeito foi observado pela naltrexona nos níveis de NE no presente trabalho, outros (De Vries et al., 1993) mostraram que a morfina, uma droga agonista do sistema opióide, aumenta os níveis de NE em córtex cerebral.

No presente trabalho, a naltrexona diminuiu os níveis de 5-HT e 5-HIAA e esse efeito tendeu a reverter após a exposição prévia de etanol (Et+naltrexona-1). Por outro lado, quando a naltrexona foi associada com o etanol (Et+naltrexona-2), os níveis de 5-HT continuaram diminuídos e os de 5-HIAA apresentaram uma tendência a voltar para os níveis dos grupos controle e tratado pelo etanol. Os resultados sugerem que a exposição prévia ao etanol implica em resultados diferentes quando comparados a naltrexona sozinha. Por outro lado, a administração associada de naltrexona + etanol não é capaz de reverter o efeito causado por naltrexona sozinha. Também foi observado, que diferentemente da DA, a naltrexona interfere com o *turnover* de 5-HT, provavelmente por diminuir a liberação de 5-HT, visto que os níveis de 5-HIAA também foram diminuídos.

A administração de antagonista opióide induz marcada alteração nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (Viveros et al., 1995), onde o tratamento com naltrexona afeta diferentemente os dois sistemas de monoaminas, dependendo da área cerebral (CE, mesencéfalo ou hipotálamo) estudada e do estado de desenvolvimento do animal (De Cabo et al., 1994). Em estudo realizado por Inoue (2000), a naltrexona

reduz o aumento na síntese de 5-HT em hipocampo causado pelo etanol e Benjamin et al. (1993) mostraram que a administração de naltrexona não interferiu com o aumento de 5-HT em núcleo acumbente de ratos, causado pelo etanol.

## CONCLUSÕES

- ✓ O etanol alterou as concentrações de monoaminas NE, DA e 5-HT e seus metabólitos DOPAC e 5-HIAA no corpo estriado de ratos. Essa alteração varia com relação à duração do tratamento, dose administrada e, principalmente, com o tempo de retirada da droga. Assim, podemos sugerir que, através do efeito sobre esses neurotransmissores, o etanol possivelmente produz efeitos comportamentais e motivacionais no indivíduo.
- ✓ O etanol sozinho não interferiu, em nenhum dos protocolos experimentais utilizados, nos níveis de HVA, sugerindo que a alteração causada pelo etanol no sistema dopaminérgico ocorre principalmente a nível de neurônio pré-sináptico, através de alteração na síntese ou no *turnover* dessa monoamina.
- ✓ Enquanto aumentos nos níveis de dopamina foram observados após o tratamento agudo e sub-crônico com etanol, uma diminuição foi observada após o tratamento crônico. Esses resultados podem refletir uma depleção desse neurotransmissor. Essa hipótese foi confirmada pela presença de níveis baixos de DA com 30 dias de tratamento com etanol (4 g/kg), e após 30 min ou 48 h.
- ✓ A ketamina sozinha aumentou os níveis de DA e diminuiu os de 5-HT no corpo estriado de ratos, mostrando assim uma interação entre esses sistemas de neurotransmissores. O aumento de DA e DOPAC induzido pela associação de etanol + ketamina, parece refletir um aumento da síntese dessa monoamina, desde que nenhuma alteração foi observada com os níveis de HVA.
- ✓ A ketamina também interferiu com o sistema noradrenérgico, sendo esse efeito potencializado na presença do etanol. Esses resultados sugerem que o etanol pode modular via sistema glutamatérgico a liberação de noradrenalina.
- ✓ O aumento nos níveis de DA, em CE de animais tratados com a associação de etanol mais haloperidol, pode refletir uma complicação terapêutica quando da

utilização de haloperidol, em pacientes que continuam ingerindo álcool, pois o processo de reforço é entendido como um aumento desse neurotransmissor no corpo estriado e núcleo acumbente.

- ✓ O haloperidol diminuiu os níveis de 5-HT e seu metabólito em corpo estriado de ratos. Esse resultado pode representar uma interação do tipo modulatória entre os sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos, bem como um efeito direto do haloperidol em receptores serotoninérgicos pós-sinápticos. A associação de etanol mais haloperidol também apresentou uma diminuição nos níveis dessa monoaminas.
  
- ✓ A naltrexona não alterou os níveis de DA no corpo estriado e apresentou uma tendência a antagonizar o aumento produzido pelo etanol na neurotransmissão dopaminérgica em ambos os protocolos experimentais. Esses resultados mostram uma clara relação entre os sistemas dopaminérgicos e opióide, este último modulando a liberação de DA no corpo estriado de ratos.
  
- ✓ Uma diminuição dos níveis de 5-HT, causado pela naltrexona, leva a sugerir que o sistema opióide também apresenta um efeito modulatório sobre o sistema serotoninérgico ou por uma ação direta ou indireta, via sistema dopaminérgico. A diminuição de 5-HT, observada na associação entre etanol e naltrexona, pode sugerir ou um efeito do etanol ou da naltrexona, tendo em vista que ambas as drogas deprimem a neurotransmissão serotoninérgica

### **CAPÍTULO III**

**Densidade de receptores dopaminérgicos (D1 e D2-símile) em corpo estriado de ratos após administração de etanol sozinho e/ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide.**

## INTRODUÇÃO

A administração de drogas de abuso como morfina, anfetamina, cocaína e etanol induzem liberação de dopamina no núcleo caudado e NAc de ratos (Di Chiara & Imperato, 1988). Outros estudos (Civelli et al., 1993; Seeman & Van Tol, 1994; Kim et al., 1997; Cohen et al., 1998) sugerem que a ativação de receptores dopaminérgicos D1 e D2-símile no cérebro de mamíferos é responsável pelo processo de recompensa ou compulsão induzido pelo álcool. Os subtipos de receptores dopaminérgicos, D1, D2 e D3, parecem preferencialmente estar envolvidos no efeito da dopamina com a auto-administração de etanol em ratos (Cohen et al., 1998; El-Ghundi et al., 1998; Sautel et al., 1995; Kim et al., 1997).

Entretanto, resultados prévios dos efeitos de administração repetida de etanol em receptores dopaminérgicos D1 e D2-símile parecem contraditórios e inconclusivos. Assim, Lograno et al. (1993) demonstraram que o tratamento com etanol (3 % v/v) durante oito semanas, em ratos, aumentou a densidade de receptores D1 nos núcleos caudado e putamen, sem nenhuma alteração na densidade de receptores D2. Por outro lado, Hruska (1988) observou que a administração de etanol, em uma dieta líquida por 21 dias, produziu um aumento na densidade máxima de receptores D1 e D2 em corpo estriado sem nenhuma alteração na afinidade destes receptores. Enquanto, Pellegrino & Druse (1992) demonstraram que o consumo de etanol (6,6 %-v/v), em uma dieta líquida por um mês, causou uma diminuição de 25 % nos receptores D1 no NAc e nenhuma diferença na densidade de receptores D1 e D2 em corpo estriado.

Contudo, o mecanismo de alteração de receptores dopaminérgicos pela presença de etanol, parece influenciar outros sistemas de neurotransmissores. Segundo Cepeda et al. (1993), a neurotransmissão de DA pode modular a liberação de outros neurotransmissores através da interação dessa monoamina com os seus diferentes subtipos de receptores. Um exemplo é a neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica, onde a ligação de DA no receptor D1 intensifica o efeito excitatório do glutamato no receptor NMDA. De maneira inversa, a ativação de receptores D2 inibe o efeito induzido pela ligação do glutamato a outro subtipo de receptor glutamatérgico (AMPA). Conseqüentemente, a DA pode facilitar ou inibir a neurotransmissão excitatória, dependendo do subtipo de receptor ativado (Kitai & Surmeier 1993).

## OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi determinar a densidade de receptores dopaminérgicos (D1 e D2-símile) em corpo estriado de ratos após administração do etanol em função da duração do tratamento e do tempo de retirada, bem como verificar a densidade destes receptores após administração de drogas antagonistas dos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide administradas associadas com o etanol ou após a retirada da droga.

## RESULTADOS

A análise de *Scatchard* (**Tabela 1**) de ligação de [<sup>3</sup>H] SCH-23390 e [<sup>3</sup>H] espiroperidol em corpo estriado de ratos, tratados com dose única de etanol (4 g/kg, v.o.), e sacrificados 48 h após a administração da droga, mostrou uma significativa diminuição da densidade máxima (B<sub>max</sub>) de receptores D1 (40%) [t (7)=4,687; p=0,0022] e D2 (21%) [t (11)=2,226; p=0,0479] quando comparados aos valores do controle. Os valores da constante de dissociação (K<sub>d</sub>) foram diminuídos apenas no binding de receptores D1-símile (59,7%) [t (7)=4,764; p= 0,0021], sem nenhuma alteração no K<sub>d</sub> de receptores D2-símile [t (11)=0,1259; p= 0,9020] quando comparados ao grupo controle.

Os resultados do tratamento com etanol (4 g/kg, v.o.) durante 7 dias e 30 min após a última administração da droga estão apresentados na **Tabela 2**. Enquanto nenhuma alteração foi observada nos valores de B<sub>max</sub> de receptores D1-símile (184,6±11,6 fmol/mg de proteína) [t (9)=1,018; p=0,3353], uma diminuição foi observada no B<sub>max</sub> de receptores D2-símile (45,2%) [t (8)=3,223; p=0,0122] quando comparadas ao grupo controle. Entretanto os valores de K<sub>d</sub> foram diminuídos tanto nos dados de *Scatchard* de D1 (46%) [t (9)=4,173; p=0,0024] quanto nos de D2 (34,1%) [t (8)=2,557; p=0,0338] quando comparados aos controles.

As **Tabelas 3 e 4** também mostram os resultados do tratamento com etanol durante um período de 7 dias, porém com um tempo de retirada maior (48 h) e com outras três doses de etanol 0,5; 2 ou 4 g/kg, v.o, na densidade de receptores dopaminérgicos. Uma significativa [F(3,16)=7,335; p=0,0040] diminuição no valor de B<sub>max</sub> de receptores D1-símile nas doses de 2 (145,0±16,6 fmol/mg de proteína) e 4 (127,5±8,44 fmol/mg de proteína) g/kg foi observada quando comparada ao grupo tratado com dose menor de etanol 0,5 g/kg (213,0±21,7 fmol/mg de proteína). Efeito similar foi observado com a dose mais alta de etanol (4 g/kg,v.o.), em relação ao controle (181,3±7,46 fmol/mg de proteína) (**Tabela 3**). Por outro lado, nenhuma alteração significativa foi observada nos valores de K<sub>d</sub>, em relação ao controle (3,7±0,50 nM) [F(3,16)=1,820; p=0,1932].

Quanto aos dados do *Scatchard* de D2-símile (**Tabela 4**), foi observada uma diminuição no Bmax nas doses mais altas de etanol 2 ( $176,2 \pm 27,2$  fmol/mg de proteína) e 4 ( $163,3 \pm 29,9$  fmol/mg de proteína) g/kg, quando comparado ao controle ( $286,8 \pm 18,8$  fmol/mg de proteína) e após tratamento com a dose de 0,5 ( $285,1 \pm 7,8$  fmol/mg de proteína) g/kg [ $F(3,18)=7,914$ ;  $p=0,0021$ ]. Nenhuma alteração significativa foi observada nos valores de Kd em relação ao controle ( $2,9 \pm 0,57$  nM) [ $F(3,18)= 1,194$ ;  $p=0,3457$ ], embora uma tendência ao aumento tenha sido evidenciado após administração de etanol nas doses de 2 (32,6%) ou 4 (44,3%) g/kg.

**Tabela 1. Efeitos da administração aguda do etanol sobre os receptores dopaminérgicos (D1 e D2-símiles) em corpo estriado de ratos 48 h após a administração da droga**

Grupo	D1		D2	
	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	181,3±7,4(04)	3,7±0,50(04)	286,8±18,8(08)	2,9±0,57(08)
Etanol 4	107,6±12,6(05)*	1,5±0,09(05)*	227,0±15,0(05)*	3,0±0,26(05)

Os animais foram tratados com dose única de etanol 4g/kg, v.o. ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a administração da droga. Os valores de Bmax são expressos em femtomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM. Os valores em parênteses representam o número de animais no experimento. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

\*p<0,05, controle vs. etanol.

**Tabela 2. Efeitos do tratamento sub-crônico do etanol 30 min após a última administração da droga sobre os receptores dopaminérgicos (D1 e D2-símile) em corpo estriado de ratos**

Grupo	D1		D2	
	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	164,7±16,2(05)	4,9±0,36(05)	253,9±34,7(05)	2,4±0,29(05)
Etanol 4	184,6±11,6(06)	2,6±0,38(06)*	139,1±7,96(05)*	1,6±0,13(05)*

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com água destilada (controle) ou etanol (4g/kg, vo) e sacrificados 30 min após a última administração da droga. Os valores de Bmax são expressos em femtomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM. Os valores em parênteses representam o número de animais no experimento. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t-Student. \*p<0.05, controle vs. etanol.

**Tabela 3. Efeitos da administração sub-crônica de etanol sobre os receptores D1 - símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos 48 h após a última administração da droga**

Grupo	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	181,3±7,46 (04)	3,7±0,50 (04)
Etanol 0,5 g/kg, v.o.	213,0±21,7 (04)	2,2± 0,52(04)
Etanol 2 g/kg, v.o.	145,0±16,6 (04) <b>b</b>	2,7±0,24 (04)
Etanol 4 g/kg, v.o.	127,5±8,44 (05) <b>a,b</b>	2,7±0,41 (05)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com água destilada (controle) ou etanol (0,5; 2 ou 4g/kg, vo), e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os valores de Bmax são expressos em femtomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM. Os valores em parênteses representam o número de animais no experimento Para análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a e b** ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle e etanol 0,5 g/kg, respectivamente.

**Table 4. Efeitos da administração sub-crônica de etanol sobre os receptores D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos 48 h após a última administração da droga**

Grupo	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	286,8 ± 18,8(08)	2,9 ± 0,57(08)
Etanol 0,5 g/kg, v.o.	285,1 ± 7,8(03)	2,8 ± 0,22(03)
Etanol 2 g/kg, v.o	176,2 ± 27,2(04) <b>a,b</b>	3,9 ± 0,61(04)
Etanol 4 g/kg, v.o.	163,3 ± 29,9(04) <b>a,b</b>	4,2 ± 0,47(04)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com água destilada (controle) ou etanol (0,5; 2 ou 4g/kg, vo), e sacrificados 48h após a última administração da droga. Os valores de Bmax são expressos em femtomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM. Os valores em parênteses representam o número de animais no experimento Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a** e **b** ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle e etanol 0,5 g/kg, respectivamente.

## Resultados dos Protocolos 1 e 2

A densidade máxima (Bmax) e a constante de dissociação (Kd) de receptores dopaminérgicos D1 e D2-símile foram determinadas na presença de etanol e/ou ketamina, haloperidol e naltrexona em dois protocolos experimentais. No protocolo 1 os antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide foram administrados após exposição prévia ao etanol e no protocolo 2 o etanol e esses antagonistas foram administrados associados após o sétimo dia de tratamento com etanol (conforme descrito em Materiais e Métodos). Os resultados do protocolo 1 e 2 estão descrito abaixo:

### -Protocolo 1:

A **Tabela 5** mostra os resultados da administração de ketamina após a retirada de etanol (Et+ketamina-1), bem como a administração de etanol (4 g/kg,v.o.) sozinhos durante um período de sete dias. No grupo da retirada, os animais foram tratados com etanol (4 g/kg, v.o.) até o 7<sup>o</sup> dia, a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com ketamina (25 mg/kg, i.p.) até o 14<sup>o</sup> dia, sendo os animais sacrificados após 48 h. A diminuição do Bmax de receptores D1 [F(2,28)=5,047; p=0,0200] e D2-símile [F(2,19)=3,547; p=0,0516] causada pela administração de etanol sozinho (25,9%; 40,2%, respectivamente) quando comparado ao controle, foi bloqueada pela administração de ketamina (191,5±21,6; 250,5±36,6 fmol/mg de proteína, respectivamente), enquanto os valores de Bmax voltaram para os níveis dos controles (172,1±9,5; 272,9±20,7 fmol/mg de proteína, respectivamente). Deve-se notar que os resultados de D2-símile apresentaram apenas uma tendência a diminuição de Bmax após o uso de etanol.

Enquanto a diminuição causada pelo etanol (2,7±0,41 nM) no valor de Kd de receptores D1-símile foi intensificada pela ketamina (0,9±0,16 nM), quando comparado ao controle (4,0±0,29 nM) [F(2,16)=25,116; p<0,0001], nos dados de *Scatchard* de [<sup>3</sup>H]-espiroperidol a ketamina produziu um efeito inverso (1,5±0,22 nM) àquele do

grupo tratado com etanol ( $4,2 \pm 0,47$  nM) e não foi diferente estatisticamente do controle ( $2,6 \pm 0,34$  nM) [ $F(2,18)=8,820$ ;  $p=0,0026$ ] (**Tabela 5**).

Os dados obtidos com a administração de haloperidol, após a retirada de etanol (Et+haloperidol-1), nos valores de  $B_{max}$  e  $K_d$  de receptores D1 e D2 estão apresentados na **Tabela 6**. Os valores de  $B_{max}$  de receptores D1-símile foram aumentados no grupo Et+haloperidol-1 ( $266,1 \pm 31,1$  fmol/mg de proteína) quando comparados ao grupo controle ( $172,1 \pm 9,5$  fmol/mg de proteína) e etanol ( $127,5 \pm 8,4$  fmol/mg de proteína) [ $F(2,18)=14,877$ ;  $p=0,0002$ ]. A diminuição causada pelo etanol nos níveis do  $K_d$  de receptores D1-símile também foi potencializada na presença de haloperidol ( $0,9 \pm 0,06$  nM) [ $F(2,16)=27,410$ ;  $p<0,0001$ ]. Por outro lado, a densidade máxima de receptores D2-símile voltou aos valores do controle ( $272,9 \pm 20,7$  fmol/mg de proteína), no grupo onde o etanol foi retirado, e o tratamento continuou apenas com haloperidol ( $265,6 \pm 33,4$  fmol/mg de proteína) [ $F(2,19)=3,919$ ;  $p=0,0399$ ]. O etanol sozinho ( $163,3 \pm 29,9$  fmol/mg de proteína) diminuiu esses valores em relação ao controle. A administração de Et+haloperidol-1 impediu o aumento dos valores de  $K_d$ , observado com etanol sozinho, ficando os valores semelhantes aqueles dos animais controles ( $2,6 \pm 0,34$  nM) [ $F(2,18)=5,735$ ;  $p=0,0132$ ].

Efeitos similares ao grupo Et+haloperidol-1 nos valores de  $B_{max}$  e  $K_d$  de receptores D1 e D2, foram observados nos animais que receberam naltrexona após a retirada de etanol (Et+naltrexona-1), quando comparados ao controle e etanol (**Tabela 7**). Nesta condição, os valores de  $B_{max}$  de receptores D1 ( $286,9 \pm 20,4$  fmol/mg de proteína) [ $F(2,19)=32,266$ ;  $p<0,0001$ ] e D2 ( $269,1 \pm 21,0$  fmol/mg de proteína) [ $F(2,19)=7,785$ ;  $p=0,0225$ ] foram aumentados em relação ao grupo tratado com etanol (D1:  $127,5 \pm 8,4$ ; D2:  $163,3 \pm 29,9$  fmol/mg de proteína), sendo esse aumento de D1-símile também significativo em relação ao grupo controle ( $172,1 \pm 9,5$  fmol/mg de proteína). Enquanto os valores de  $K_d$  voltaram aos níveis do controle no caso do *binding* de [ $^3H$ ]-Espiroperidol ( $2,6 \pm 0,34$  nM) [ $F(2,18)=5,373$ ;  $p=0,0164$ ], no *binding* de [ $^3H$ ]-SCH 23390 [ $F(2,17)=16,545$ ;  $p=0,0002$ ], uma intensificação do efeito do etanol foi observada após a administração de naltrexona ( $2,0 \pm 0,37$  nM).

#### **-Protocolo 2:**

A **Tabela 8** mostra os resultados da administração associada de etanol e ketamina (Et+ketamina-2), bem como a administração de etanol (4 g/kg,v.o.) sozinho durante um período de 14 dias. Enquanto nenhum efeito foi observado na densidade máxima de receptores D1 [ $F(2,18)=3,388$ ;  $p=0,0593$ ] e D2 [ $F(2,20)=0,2095$ ;  $p=0,8129$ ], após o tratamento com água destilada (D1:  $172,1\pm 9,5$ ; D2:  $272,9\pm 20,7$  fmol/mg de proteína), etanol (D1:  $214,1\pm 24$ ; D2:  $283,3\pm 16,2$  fmol/mg de proteína) ou a associação de Et+ketamina-2 (D1:  $151,4\pm 11,4$ ; D2:  $295,0\pm 32,6$  fmol/mg de proteína), uma diminuição [ $F(2,17)=10,215$ ;  $p=0,0016$ ] do  $K_d$  de receptores D1-símile foi evidenciada após a associação de Et+ketamina ( $0,9\pm 0,21$  nM), quando comparado ao controle ( $4,0\pm 0,29$  nM) e etanol ( $3,6\pm 0,6$  nM). Contudo nenhuma alteração [ $F(2,19)=1,997$ ;  $p=0,1664$ ] foi observada na constante de dissociação de D2 ( $2,7\pm 0,47$  nM), quando comparado ao controle ( $2,6\pm 0,34$  nM) e etanol ( $1,6\pm 0,07$  nM). Nenhuma alteração foi também evidenciada entre os grupos tratados com etanol e controle.

Efeitos similares foram encontrados após a associação do etanol com o haloperidol (**Tabela 9**), onde nenhuma alteração foi observada no  $B_{max}$  de D1 ( $203,1\pm 12,1$  fmol/mg de proteína) [ $F(2,18)=2,176$ ;  $p=0,1459$ ] e D2 ( $306,0\pm 32,7$  fmol/mg de proteína) [ $F(2,20)=0,4581$ ;  $p=0,6396$ ] quando comparado ao controle (D1:  $172,1\pm 9,5$ ; D2:  $272,9\pm 20,7$  fmol/mg de proteína) e etanol sozinho (D1:  $214,1\pm 24$ ; D2:  $283,3\pm 16,2$  fmol/mg de proteína). Por outro lado, o  $K_d$  de receptores D1-símile foi diminuído [ $F(2,17)=5,755$ ;  $p=0,0140$ ] após a associação de Et+haloperidol-2 ( $1,7\pm 0,08$  nM) quando comparado ao controle ( $4,0\pm 0,29$  nM) e etanol ( $3,6\pm 0,6$  nM). Entretanto, nenhum efeito significativo [ $F(2,19)=2,015$ ;  $p=0,1640$ ] foi observado no  $K_d$  de receptores D2 ( $2,7\pm 0,45$  nM) quando comparado ao controle ( $2,6\pm 0,34$  nM) e etanol ( $1,6\pm 0,07$  nM).

No outro grupo de animais, onde o tratamento do etanol continuou associado com naltrexona, um antagonista opióide, (**Tabela 10**) nenhum efeito significativo foi observado na densidade máxima de receptores D1 ( $151,2 \pm 15,7$  fmol/mg de proteína) [ $F(2,18)=3,226$ ;  $p=0,0665$ ] e D2 ( $195,3\pm 3,2$  fmol/mg de proteína) [ $F(2,19)=3,44$ ;  $p=0,0556$ ], quando comparado ao controle (D1:  $172,1\pm 9,5$ ; D2:  $272,9\pm 20,7$  fmol/mg de proteína) e etanol sozinho (D1:  $214,1\pm 24$ ; D2:  $283,3\pm 16,2$  fmol/mg de proteína),

embora uma tendência à diminuição do Bmax de D2 (28,4%; 31%) tenha sido observada, quando comparado ao controle e etanol, respectivamente. De maneira semelhante, ao grupo Et+ketamina e Et+haloperidol, os valores do Kd de D1 foram diminuídos [F(2,17)=7,561; p=0,0054] na presença de Et+naltrexona (1,3±0,18 nM), quando comparado ao controle (4,0±0,29 nM) e etanol (3,6±0,6 nM), e nenhuma alteração significativa [F(2,19)=1,210; p=0,3226] foi observada nos valores de Kd de receptores D2-símile (2,2±0,72 nM) quando comparado aos grupos controle (2,6±0,34 nM) e etanol (1,6±0,07 nM).

**Tabela 5. Efeitos do etanol (7 dias) e Et+ketamina-1 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos**

Grupo	D1		D2	
	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	172,1±9,5(9)	4,0±0,29(7)	272,9±20,7(11)	2,6±0,34(10)
Etanol 7d	127,5±8,4(5) <b>a</b>	2,7±0,41(5) <b>a</b>	163,3±29,9(4)	4,2±0,47(4) <b>a</b>
Et+keta-1	191,5±21,6(5) <b>b</b>	0,9±0,16(5) <b>a,b</b>	250,5±36,6(5)	1,5±0,22(5) <b>b</b>

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, vo) ou água destilada (controle), e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo Et+ketamina-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com ketamina (25 mg/kg, ip) até o 14<sup>o</sup> dia, e 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores de Bmax são expressos em fentomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM. Os valores em parênteses representam o número de animais no experimento. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a e b** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle e etanol, respectivamente.

**Tabela 6- Efeitos do etanol (7 dias) ou Et+haloperidol-1 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos**

Grupo	D1		D2	
	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	172,1±9,5(9)	4,0±0,29(7)	272,9±20,7(11)	2,6±0,34(10)
Etanol 7d	127,5±8,4(5)	2,7±0,41(5) a	163,3±29,9(4) a	4,2±0,47(4) a
Et+halo-1	266,1±31,1(5)a,b	0,9±0,06(5) a,b	265,6±33,4(5)b	2,1±0,27(5) b

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o.) ou água destilada (controle), e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo Et+haloperidol-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com haloperidol (1 mg/kg, ip) até o 14<sup>o</sup> dia, e 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores de Bmax são expressos em fentomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM. Os valores em parênteses representam o número de animais no experimento parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a e b (p<0,05) quando comparados ao controle e etanol, respectivamente.

**Tabela 7- Efeitos do etanol (7 dias) ou Et+naltrexona-1 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos.**

Grupo	D1		D2	
	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	172,1±9,5(9)	4,0±0,29(7)	272,9±20,7(11)	2,6±0,34(10)
Etanol 7d	127,5±8,4(5) <b>a</b>	2,7±0,41(5) <b>a</b>	163,3±29,9(4) <b>a</b>	4,2±0,47(4) <b>a</b>
Et+nalt-1	286,9±20,4(6) <b>a,b</b>	1,2±0,37(6) <b>a,b</b>	269,1±21,0(5) <b>b</b>	2,0±0,42(5) <b>b</b>

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, vo) ou água destilada (controle), e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo Et+naltrexona-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com naltrexona (10 mg/kg, vo) até o 14<sup>o</sup> dia, e 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores de Bmax são expressos em fentomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM. Os valores em parênteses representam o número de animais no experimento. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a** e **b** (p<0,05) quando comparados ao controle e etanol, respectivamente.

**Tabela 8. Efeitos do etanol (14 d) ou Et+ketamina-2 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos**

Grupo	D1		D2	
	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	172,1±9,5(9)	4,0±0,29(7)	272,9±20,7(11)	2,6±0,34(10)
Etanol 14 d	214,1±24,0(6)	3,6±0,60(7)	283,3±16,23(5)	1,6±0,07(5)
Et+keta-2	151,4±11,4(5)	0,9±0,21(4) <b>a,b</b>	295,0±32,6(5)	2,7±0,470(5)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 (água destilada- controle) ou 14 dias (Etanol 4 g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração. Os animais do grupo E+ketamina-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a ketamina (25 mg/kg, ip) foi administrada (Et+keta-2) e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia, e 48 h após a última administração das drogas os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores de Bmax são expressos em femtomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM. Os valores em parênteses representam o número de animais no experimento. Para a análise estatística foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a e b** (p<0,05) quando comparados ao controle ou etanol, respectivamente.

**Tabela 9- Efeitos do etanol (14 d) ou Et+haloperidol-2 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos**

Grupos	D1		D2	
	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	172,1±9,5(9)	4,0±0,29(7)	272,9±20,7(11)	2,6±0,34(10)
Etanol 14 d	214,1±24,0(6)	3,6±0,60(7)	283,3±16,23(5)	1,6±0,07(5)
Et+halo-2	203,1±12,1(4)	1,7±0,08(4) <b>a,b</b>	306,0±32,77(5)	2,7±0,45(5)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 (água destilada-controle) ou 14 dias (Etanol 4 g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração. Os animais do grupo E+haloperidol-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, o haloperidol (1 mg/kg, ip) foi administrado (Et+halo-2) e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia, e 48 h após a última administração das drogas os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores de Bmax são expressos em femtomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM. Os valores em parênteses representam o número de animais no experimento. Para a análise estatística foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a** e **b** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle ou etanol, respectivamente.

**Tabela 10- Efeitos do etanol (14 d) ou Et+naltrexona-2 sobre os receptores D1 e D2-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos**

Grupo	D1		D2	
	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	172,1±9,5(9)	4,0±0,29(7)	272,9±20,7(11)	2,6±0,34(10)
Etanol 14 d	214,1±24,0(6)	3,6±0,60(7)	283,3±16,2(5)	1,6±0,07(5)
Et+nalt-2	151,2±15,7(4)	1,3±0,18(4) <b>a,b</b>	195,3±3,2(4)	2,2±0,72(5)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 (água destilada-controle) ou 14 dias (Etanol 4 g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração. Os animais do grupo E+naltrexona-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a naltrexona (10 mg/kg, vo) foi administrada (Et+nalt-2) e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia, e 48 h após a última administração das drogas os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os valores de Bmax são expressos em femtomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM. Os valores em parênteses representam o número de animais no experimento. Para a análise estatística foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a** e **b** (p<0,05) quando comparados ao controle ou etanol, respectivamente.

## DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado uma *downregulation* de receptores D1 e D2-símile após a administração de dose única de etanol (4 g/kg, v.o.) e com tempo de retirada de 48 h (Tabela 1). Aumentando o tempo de exposição ao etanol (4 g/kg, v.o.) para 7 dias e com semelhante tempo de retirada (48 h), esse efeito persistiu tanto nos receptores D1 (Tabela 3) quanto nos D2-símile (Tabela 4). Contudo, diminuindo o tempo de retirada para 30 min (Tabela 2), após o tratamento de 7 dias, somente os níveis de D2 apresentaram uma *downregulation*.

Quanto à constante de dissociação, a diminuição dos valores de Kd de receptores D1, observada após dose única, continuou após sete dias de tratamento, com retirada de 30 min, e apresentou uma tendência a voltar para os valores do controle com 48 h. Enquanto nenhuma alteração foi observada nos valores de Kd de receptores D2 após dose única de etanol (4 g/kg, v.o.), uma diminuição e uma tendência a aumento foram observados após administração de etanol durante 7 dias e com retirada de 30 min e 48 h, respectivamente.

Outro parâmetro estudado nos ensaios de *binding* foi a variação de doses de etanol (0,5, 2 ou 4 g/kg), mostrado nas tabelas 3 e 4, após administração de etanol durante 7 dias e retirada de 48 h. Assim, pode-se observar que o efeito de *downregulation* observado com etanol 4 g/kg não é comum a todas as doses estudadas, pois nenhuma alteração na densidade máxima de receptores D1 e D2 foi observado com a dose de 0,5 g/kg. A constante de dissociação de D1 e D2 também não foi influenciada por diferentes doses de etanol, embora uma tendência a aumento do Kd de D2 tenha sido observada após administração de alta dose de etanol.

Estudos realizados por Gili-Martin et al. (1997) após examinarem o efeito da administração crônica de etanol (solução 20 %), em receptores D1 de CE também mostraram uma diminuição no Bmax, sem nenhuma alteração no valor de Kd. Entretanto, esses valores de Bmax voltaram para os níveis dos animais controle após a retirada de 24 ou 48 h. Os resultados encontrados na literatura são contraditórios e mostram aumento (Hurska, 1988; Lograno et al., 1993), diminuição (Lucchi et al., 1988), ou nenhuma diferença (Pellegrino & Druse, 1992) no número de receptores D1

após tratamento com etanol. Além disso, Hamdi & Prasad (1993) sugerem que a ingestão crônica de etanol (por 1, 2, 3 e 4 semanas e 10 h de retirada) pode causar mudança bidirecional tempo-dependente nos receptores dopaminérgicos do CE de ratos.

De maneira semelhante, não existe consenso quanto ao efeito do etanol nos receptores D2. Enquanto alguns trabalhos encontraram um aumento (Hurska et al., 1988) outros não encontraram nenhuma diferença (Lucchi et al., 1988) em receptores D2-símile. Um trabalho recente (Souza-Formigoni et al., 1999) observou aumento na densidade de receptores D2 no núcleo caudado-putamem ventrolateral somente em camundongos sensibilizados e nenhuma diferença em outras regiões incluindo NAc, bulbo olfatório e substância negra.

Esses resultados aparentemente contraditórios podem ser devidos a diferentes protocolos experimentais, tais como: dose de etanol, estado nutricional, idade e raças dos animais estudados (Lucchi et al., 1988; Hietala et al., 1990; Nevo & Hamon, 1995). Com relação aos receptores dopaminérgicos, períodos prolongados de tratamento levam a uma resposta específica de *downregulation* (Lucchi et al., 1988; Syvalahti et al., 1988) baseado na perda geral da função neuroreceptora. Segundo Hamdi & Prasad (1993) a *downregulation* também pode ser explicada: a. pelo aumento da síntese e liberação de DA no terminal sináptico, induzido pelo etanol; b. o etanol poderia modificar a estrutura da membrana (Deitrich et al., 1989), resultando em uma diminuição na incorporação da proteína receptora dentro do domínio da membrana e levando a uma *downregulation*; c. o etanol poderia modular a regulação do receptor a nível de transcrição genética diminuindo a função do receptor.

Os resultados de *downregulation*, observados após exposição ao etanol, encontrados neste trabalho concordam com os de Hamdi & Prasad (1993), pois como mostrado no Capítulo 2 os níveis de DA foram elevados após a administração de etanol.

Segundo Rilke et al. (1995), o efeito da auto-administração crônica de etanol também parece depender de envolvimento ambiental. Assim, esses autores mostraram

que receptores D2 são *downregulated* após tratamento crônico em ratos agrupados, mas não em animais isolados socialmente.

O sistema dopaminérgico é conhecido por modular (Nevo & Hamon, 1995) ou ser modulado (Wang et al., 2000) por outros neurotransmissores. Assim a interação entre antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide na presença do etanol ou após a retirada foi estudada a nível de receptores D1 e D2-símile no corpo estriado de ratos.

No presente estudo, uma reversão do efeito de *downregulation*, causado pela administração de etanol sozinho durante 7 dias, foi observada após a administração de ketamina seguindo a retirada de etanol tanto nos receptores D1 quanto em receptores D2. Por outro lado, os valores de Kd, na presença de ketamina, apresentaram uma diminuição indicativa de aumento da afinidade nas análises de *Scatchard* tanto em relação ao controle quanto ao grupo tratado com etanol (Tabela 5). Quando a ketamina foi associada com o etanol (Tabela 8), nenhuma alteração foi observada na densidade de D1 e D2-símile entre os grupos estudados, ficando os valores semelhante aos dos animais tratados com etanol por 14 dias. Os valores de Kd continuaram diminuídos nas análises de *Scatchard* no caso de receptores D1 e voltaram aos níveis do controle no caso de D2.

A interação entre os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico é bem conhecida e constitui um tema bastante estudado (Friedemann & Gerhardt, 1989; Wang et al., 2000). Entretanto, os resultados de interação desses sistemas na presença do etanol apresentam-se contraditórios e inconclusivos. Estudos mostraram que a associação desses sistemas está relacionada com o processo de reforço e com a síndrome de retirada do álcool que é caracterizada por convulsões, tremores e sinais de hiperexcitabilidade do SNC (Yamamoto et al., 1999; Davidson et al., 1995).

Pode-se hipotetizar que, no tratamento de 7 dias, o etanol estimule a liberação de DA e essa dopamina bloqueia o receptor, causando o efeito de *downregulation*. Segundo Friedemann & Gerhardt (1989) a estimulação de receptores NMDA induz liberação de DA e NE no corpo estriado e córtex cerebelar. A ketamina, antagonizando o receptor NMDA, bloqueia a liberação de DA e reverte o efeito de *downregulation*.

Estudos mostram que o etanol atenua a neurotransmissão glutamatérgica no NAc (Nie et al., 1994), previne a liberação de glutamato no CE de ratos induzida por receptores NMDA (Carboni et al., 1993) e protege da excitotoxicidade mediada por receptores NMDA em cultura de neurônios de ratos (Crews et al., 1998). Entretanto, o etanol não interfere na liberação de DA induzida por glutamato (Wang et al., 2000). Assim, a ausência de alteração após a associação de Et+ketamina-2 pode ser devida a um equilíbrio entre síntese e inibição de DA ou a um mecanismo de depleção de monoaminas com o tempo.

Outro fator que deve ser levado em conta nessa complexa interação é que a própria ketamina (dependendo da dose) pode atuar diretamente no sistema dopaminérgico. Em um trabalho recente, Kapur & Seeman (2001) mostraram que a ketamina pode comportar-se como um agonista parcial ou antagonista no próprio receptor D2, demonstrando assim um efeito não glutamatérgico (Kegeles et al., 2000).

Os nossos resultados mostraram que enquanto, a administração de Et+haloperidol-1 bloqueou o efeito de *downregulation*, provocado por etanol (7 dias) em receptores D2, uma *upregulation* de receptores D1 foi observado neste grupo (Et+haloperidol), quando comparado aos grupos controle e etanol. Por outro lado, os valores de Kd relativos a D1 e D2 foram diminuídos ou não foram alterados após administração de Et+haloperidol-1, respectivamente, quando comparados aos controles (Tabela 6).

No grupo da associação (Et+haloperidol-2), onde o haloperidol foi administrado (a partir do 7<sup>o</sup> dia) 1 hora antes do etanol e o tratamento continuou até o 14<sup>o</sup> dia, nenhuma alteração foi observada na densidade de receptores D1 e D2-símile em nenhum grupo estudado. De maneira semelhante foi demonstrado com a associação de etanol mais ketamina, uma diminuição nos valores de Kd de receptores D1 e ausência de alteração no D2 após a associação de Et+haloperidol, quando comparado ao grupo controle.

Existem fortes evidências de que a transmissão dopaminérgica esteja envolvida com o processo de reforço de drogas de abuso, e que esse processo esteja ligado à

interação de dopamina com os seus receptores. Injeções sistêmicas de agonistas e antagonistas dopaminérgicos têm mostrado uma diminuição no consumo e preferência por etanol (Russell et al., 1996; George et al., 1995; Silvestre et al., 1996), indicando assim o envolvimento de receptores dopaminérgicos na dependência ao etanol.

Em um estudo realizado por Cohen et al (1998) em camundongos, tanto drogas agonistas quanto antagonistas dopaminérgicas (D1, D2 e D3), reduziram a auto-administração de etanol. Segundo esses autores, esses resultados antagonísticos podem ser explicados por diferentes funções dos receptores D1, D2 e D3, localização na área tegmentar ventral, bem como no terminal sináptico (Bouthenet et al., 1991). Assim, agonistas dopaminérgicos diminuem a ingestão de etanol pela diminuição da transmissão dopaminérgica via estimulação pré-sináptica, por outro lado antagonistas dopaminérgicos, como o haloperidol, diminuem a resposta ao álcool pelo bloqueio da transmissão dopaminérgica via receptores pós-sinápticos (Cohen et al., 1997; Cohen et al., 1998).

Analisando os resultados encontrados neste trabalho, observa-se que a *upregulation* de receptor D1 parece decorrer da prévia exposição ao etanol, tendo em vista que o haloperidol tem baixa afinidade por receptores D1. Contudo, um resultado não esperado foi observado com a densidade de D2, desde que vários estudos mostraram que o uso crônico de haloperidol aumenta o Bmax de D2 em corpo estriado (Ogren et al., 1997; Kallstrom et al., 1999). Segundo Besret (2000), o tempo de sacrifício do animal após o término do tratamento é um fator importante para a visualização da *upregulation*, desde que a presença de resíduos de haloperidol no tecido cerebral compete com o radioligante e mascara esse efeito. Essa pode ser uma possível explicação para a ausência de *upregulation* em receptores D2, tendo em vista que os animais foram sacrificados 48 h após a última administração do haloperidol. Quanto aos valores de Kd, a associação parece ter um efeito preferencial a nível de receptor D1, aumentando assim a afinidade das drogas pelo receptor. Em um trabalho realizado por Wolffgramm et al (1990), nenhuma alteração foi observada nos valores de Kd após a associação de etanol mais haloperidol.

Por outro lado, a administração simultânea de haloperidol + etanol (Et+haloperidol-2) não apresentou efeito de *upregulation* (observado no grupo

Et+haloperidol-1) e não alterou novamente receptores D2. Entretanto os níveis de Kd de receptores D1 foram diminuídos pela associação.

Embora muitos trabalhos mostrem os efeitos do haloperidol isolado em estudos de *binding* ou associados com etanol em estudos comportamentais, poucos trabalhos investigaram essa associação na qual se refere a densidade de receptores dopaminérgicos. Um trabalho de Fuchs et al. (1987) mostrou que a administração simultânea com haloperidol e etanol previne o aumento na densidade de receptores D2 observado apenas com o haloperidol, concordando parcialmente com os resultados deste trabalho.

Enquanto a administração de etanol (7 dias) induziu uma diminuição da densidade de receptores D1-símile, um efeito inverso foi observado no grupo onde o tratamento continuou somente com naltrexona (Et+naltrexona-1). Neste grupo, os valores de D2 não foram diferentes dos animais controle e aumentaram em relação ao grupo tratado com etanol. Os valores de Kd foram diminuídos no caso de receptores D1, e os de D2 retornaram aos valores do controle. Por outro lado, a administração associada de naltrexona mais etanol (Et+naltrexona-2) não alterou a densidade de receptores D1, porém causou uma tendência a *downregulation* em receptores D2 e diminuiu o Kd de receptores-D1.

Vários trabalhos (Matsuzawa et al., 1999; Widdowson et al., 1992) têm demonstrado que o etanol pode aumentar os níveis de DA no NAc, e conseqüentemente induzir o efeito de reforço, através de um mecanismo indireto, aumentando a liberação de peptídios opióides endógenos nessa região. Evidências desse efeito foram demonstradas por estudos (Hubbell et al., 1987; Reid et al., 1984) onde a morfina, um agonista opióide, aumenta a ingestão de álcool, e antagonistas opióides bloqueiam esse efeito. Estudo realizado por Longoni et al. (1981) encontrou que agonistas opióide  $\delta$  induzem um aumento na atividade locomotora, acompanhado por um aumento na concentração extracelular de DA no NAc e que esse efeito foi bloqueado por antagonistas D1 mas não por antagonista D2. Segundo Matsuzawa et al. (1999), o efeito de reforço, causado pelo aumento de peptídios opióides endógenos, está relacionado com os receptores D1 e D2.

Baseados nesses resultados, foi proposto que através de um bloqueio causado pela naltrexona (após a retirada do etanol, ou seja na sua ausência) em receptores opióides (ou na própria modulação de receptores D1) ocorre uma diminuição de DA na fenda sináptica, com consequente *upregulation* de receptores D1. Embora a naltrexona seja um antagonista inespecífico em receptores opióides, esses receptores opióides parecem interagir com receptores dopaminérgicos de maneira específica. Assim, enquanto o receptor  $\delta$  interage com receptores D1 (Longoni et al., Suzuki et al., 1993), o receptor  $\mu$  interage com ambos D1 e D2 (Matsuzawa et al, 1999; Leone et al., 1987). Segundo Nevo & Hamon (1995), os receptores opióides são os mais relacionados com o alcoolismo.

Entretanto, durante a administração associada de naltrexona com etanol (ou seja na presença do etanol) a naltrexona apenas impediu o aumento dessa liberação induzida pelo etanol (Benjamin et al., 1993). A associação também diminuiu os valores de Kd no caso de receptores D1.

## CONCLUSÕES

- ✓ O fenômeno de *downregulation* em receptores D1 e D2-símiles após a administração aguda e sub-crônica de etanol, em altas doses, pode ser uma consequência do aumento de dopamina na fenda sináptica.
- ✓ A diminuição do Kd de receptores D1 e D2-símile, observada somente no tratamento agudo e após 48 h de retirada, sugere um quadro de habituação dos sítios de ligação de receptores dopaminérgicos ao etanol.
- ✓ O etanol sozinho parece interferir de maneira indiscriminada nos dois tipos de receptores, confirmando assim que o quadro de *downregulation* parece ser decorrente da facilitação causada pelo etanol na interação da DA com seus receptores, ao invés de um efeito direto do etanol nesses receptores.
- ✓ A ketamina parece não apresentar um efeito direto nos receptores D1 e D2-símile nos dois protocolos utilizados, sugerindo que nas condições do presente estudo o efeito da droga seja a nível de receptor NMDA. Contudo quando a ketamina foi administrada no grupos com exposição prévia ou associado ao etanol, ela apresentou uma significativa diminuição do Kd de receptores D1, sugerindo também que essas drogas, ketamina e etanol, podem alterar o estado de afinidade desse receptor.
- ✓ A *upregulation*, observada em receptores D1 após tratamento com Et+haloperidol-1, parece ser uma consequência do efeito prévio do etanol, desde que o haloperidol possui baixa afinidade para receptores D1. Os valores de Kd de receptores D1-símile foram diminuídos nos dois protocolos experimentais sugerindo também que essa combinação pode interferir com o estado de afinidade desses receptores.
- ✓ A *upregulation* de receptores D1-símile, observada com naltrexona após a exposição prévia ao etanol, pode resultar em um mecanismo compensatório ao efeito da naltrexona em diminuir a neurotransmissão dopaminérgica. Na presença do etanol, pode-se sugerir que esses receptores não foram alterados em

conseqüência de um possível equilíbrio entre os efeitos opostos na neurotransmissão dopaminérgica, causada pelo etanol e naltrexona.

- ✓ Os valores de  $K_d$  de receptores D1-símile foram diminuídos nos dois protocolos experimentais, sugerindo também que a naltrexona e etanol podem interferir com o estado de afinidade desses receptores.
  
- ✓ De uma maneira geral, essas drogas antagonistas glutamatérgica, dopaminérgica e opióide após exposição prévia ou associada ao etanol parecem interferir principalmente com receptores dopaminérgicos do tipo D1-símile. Isso pode ser devido a localização do receptor, tendo em vista que os receptores D1 estão situados mais a nível pós-sináptico e os receptores D2 em terminações pré-sinápticas. Podemos também, sugerir que nessas condições drogas que apresentam alta afinidade pelo receptor ainda estejam ligadas, bloqueando assim a interação do radioligante com o receptor.

## CAPÍTULO IV

**Determinação dos níveis de Aminoácidos em corpo estriado de ratos após administração de etanol sozinho e/ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide.**

## INTRODUÇÃO

Embora seja aceito que o etanol age de modo não seletivo, causando alterações de lipídios nas membranas celulares, trabalhos recentes mostram (Nevo & Hamon, 1995; Dahchour & Witte, 2000) que o etanol afeta o SNC por interferir com vários sistemas de neurotransmissores. Entre estes estão incluídos os aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) que ativam células pós-sinápticas, e o aminoácido inibitório GABA que diminui a atividade de células pós-sinápticas, bem como o aminoácido sulfonado taurina que funciona como um neurotransmissor e neuromodulador (Huxtable, 1989). Segundo Dahchour & Witte, 2000, o entendimento das ações farmacológicas do etanol nos aminoácidos neurotransmissores é essencial para ajudar no desenvolvimento de intervenções terapêuticas apropriadas, visando melhorar as múltiplas desordens neuroquímicas induzidas pelo etanol.

Dentre os aminoácidos, um que recebe destaque, principalmente pelo seu envolvimento nos sintomas da síndrome de retirada do álcool, é o glutamato. O sistema glutamatérgico está relacionado com a neurofisiologia e a fisiopatologia do alcoolismo. Entretanto, o etanol apresenta efeitos opostos na transmissão glutamatérgica que são tempo dependentes (Dahchour & Witte, 2000). Assim, o efeito agudo do etanol altera a transmissão glutamatérgica por inibir a resposta via receptor NMDA (Hoffman, 1995). Por outro lado, a inibição prolongada de receptores NMDA, pelo etanol, resulta no desenvolvimento de supersensibilidade, devido à *upregulation* desses receptores (Trujillo & Akil, 1995). Consequentemente, a remoção abrupta de etanol, após uso prolongado, causa um aumento marcante na ativação de neurônios pós-sinápticos que pode levar a um quadro de excitotoxicidade. Efeitos neurobiológicos do alcoolismo, como intoxicação, convulsões após retirada, tremores, síndrome de Wernicke-Korsakoff e síndrome fetal podem ser entendidas como uma consequência do efeito do etanol no sistema glutamatérgico (Tsai et al., 1995).

Estudos bioquímicos têm demonstrado que o etanol, inibindo a função do receptor NMDA, interfere com a liberação de outros neurotransmissores através de neurônios pós-sinápticos (Gonzales & Jaworski, 1997). Assim, trabalhos utilizando tecido cerebral isolado mostraram que o álcool reduz a liberação induzida por NMDA

em neurônios dopaminérgicos, noradrenérgicos e colinérgicos (Göthert & Fink 1989; Woodward & Gonzales 1990). Esses resultados demonstram a interação entre esses sistemas de neurotransmissores.

## **OBJETIVOS**

O objetivo principal do estudo foi verificar os níveis de Aminoácidos (ASP, GLU, GLN e TIR) em corpo estriado de ratos após administração de etanol sozinho e/ou associado com drogas antagonistas dos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide.

## RESULTADOS

Os níveis de aminoácidos, após administração diária de etanol durante 7 ou 14 dias, estão apresentados na **Figura 1**. Exceto por um aumento de GLU ( $47,2 \pm 7,2$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) [ $F(2,13)=4,135$ ;  $p=0,0458$ ], nenhuma outra alteração significativa foi observada nos níveis dos aminoácidos estudados após a administração de etanol durante 7 dias, quando comparado aos grupos controle (ASP:  $60,6 \pm 11,1$ ; GLU:  $23,1 \pm 3,0$ ; GLN:  $20,8 \pm 2,6$ ; TIR:  $23,4 \pm 2,2$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido). Por outro lado, a administração mais prolongada de etanol (14 d) aumenta os níveis de ASP ( $82,5 \pm 10,5$ ;  $60,6 \pm 11,1$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido), GLU ( $38,7 \pm 7,0$ ;  $23,1 \pm 3,0$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido), GLN ( $31,0 \pm 4,2$ ;  $20,8 \pm 2,6$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) e TIR ( $35,1 \pm 4,3$ ;  $23,4 \pm 2,2$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) quando comparados ao grupo controle. Entretanto, somente os níveis de TIR [ $F(2,12)=5,991$ ;  $p=0,0195$ ] apresentam diferença estatística, não somente com relação aos controles, mas também com relação ao grupo tratado com etanol durante 7 dias. Os resultados em parênteses representam média  $\pm$  EPM de animais tratados e controles, respectivamente.

### Resultados dos Protocolos 1 e 2

As concentrações dos aminoácidos aspartato-ASP, glutamato-GLU, glutamina-GLN e tirosina-TIR foram determinadas na presença de etanol e/ou ketamina, haloperidol ou naltrexona em dois protocolos. No protocolo 1 os antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide foram administrados após exposição prévia ao etanol e no protocolo 2 o etanol e esses antagonistas foram administradas associadas após o sétimo dia de tratamento, com o etanol (conforme descrito em Materiais e Métodos). Os resultados do protocolo 1 e 2 estão descritos abaixo:

#### -Protocolo 1:

A **Figura 2** mostra os resultados da administração de ketamina após a retirada de etanol (Et+ketamina-1), bem como a administração de ketamina (25 mg/kg, i.p.) ou etanol (4 g/kg, v.o.) sozinhos durante um período de sete dias. Os níveis de ASP foram aumentados após a administração de ketamina sozinha ( $104,2 \pm 15,6$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido), quando comparado aos grupos controle ( $60,6 \pm 11,1$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) e etanol

(72,9±9,3 μmol/g de tecido). Esse efeito da ketamina foi bloqueado no grupo Et+ketamina-1 (62,2±5,6 μmol/g de tecido) [F(3,17)=3,426; p=0,0468]. O etanol aumentou os níveis de GLU (47,2±7,2 μmol/g de tecido) quando comparado ao grupo controle (23,1±3,0 μmol/g de tecido) e não foi diferente do grupo tratado com ketamina (40,2±7,2 μmol/g de tecido). Contudo, quando a ketamina foi administrada após a retirada do etanol (Et+ketamina-1) (25,5±4,5 μmol/g de tecido), não foi observado nenhuma alteração nas concentrações deste aminoácido, quando comparado aos controles ou à ketamina [F(3,19)=4,042; p=0,0257]. Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de GLN [F(3,19)=0,5235; p=0,6723] e TIR [F(3,18)=2,570; p=0,0931] após a administração de etanol (GLN:31,0±4,2; TIR:35,1±4,3 μmol/g de tecido), ketamina (GLN:25,2±3,1; TIR:17,8±2,2 μmol/g de tecido) ou Et+ketamina-1 (GLN:21,5±1,9; TIR 13,4±2,8 μmol/g de tecido), quando comparado ao controle (GLN:20,8±2,6; TIR:23,4±2,2 μmol/g de tecido). Contudo, uma tendência à diminuição dos níveis de TIR foi observada após administração de Et+ketamina-1, quando comparada ao controle (**Figura 2**).

Os dados da **Figura 3** mostram que a administração de haloperidol, após a retirada de etanol (Et+haloperidol-1) (26,4±3,1 μmol/g de tecido), diminuiu [F(3,19)=6,681; p=0,0039] os níveis de ASP quando comparado ao controle (60,6±11,1 μmol/g de tecido), etanol (72,9±9,3 μmol/g de tecido) e haloperidol (65,2±8,9 μmol/g de tecido). Contudo, nenhuma alteração foi observada entre os grupos controle, etanol ou haloperidol. O aumento causado pelo etanol nos níveis estriatais de glutamato (47,2±7,2 μmol/g de tecido), quando comparado aos grupos controle (23,1±3,0 μmol/g de tecido) e haloperidol (32±3,9 μmol/g de tecido), foi bloqueado após a administração da associação de Et+haloperidol-1 (17,0±1,5 μmol/g de tecido) [F(3,18)=9,592; p=0,0009]. A administração de Et+haloperidol-1 também causou uma diminuição (46,6%) dos níveis de GLU quando comparada ao grupo tratado somente com haloperidol e não foi diferente em relação ao grupo controle. De modo semelhante ao observado com o grupo da ketamina (sozinha ou após a retirada), os níveis de GLN também não foram alterados na presença do haloperidol sozinho (24,3±1,8 μmol/g de tecido) ou após a retirada do etanol (24,9±5,1 μmol/g de tecido), quando comparado ao controle (20,8±2,6 μmol/g de tecido) [F(3,20)=0,5137; p=0,6784]. Por outro lado, a

administração de Et+haloperidol-1 ( $10,8 \pm 0,94 \mu\text{mol/g}$  de tecido) diminuiu [ $F(3,19)=5,902$ ;  $p=0,006$ ] os níveis de TIR em relação aos demais grupos estudados: controle ( $23,4 \pm 2,2 \mu\text{mol/g}$  de tecido), etanol ( $19,3 \pm 2,4 \mu\text{mol/g}$  de tecido) e haloperidol ( $19,9 \pm 3,6 \mu\text{mol/g}$  de tecido). Pode-se salientar que nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos controle, etanol e haloperidol.

Os resultados da administração de naltrexona sozinha ou após a retirada de etanol estão mostrados na **Figura 4**. Os grupos tratados com naltrexona ( $41,2 \pm 6,4 \mu\text{mol/g}$  de tecido) ou Et+naltrexona-1 ( $34,4 \pm 2,9 \mu\text{mol/g}$  de tecido) apresentaram uma diminuição nos níveis de ASP, quando comparados aos grupos controle ( $60,6 \pm 11,1 \mu\text{mol/g}$  de tecido) e etanol ( $72,9 \pm 9,3 \mu\text{mol/g}$  de tecido). Entretanto, diferença estatística somente foi evidenciada em relação ao grupo tratado com etanol [ $F(3,17)=4,535$ ;  $p=0,0202$ ]. Por outro lado, os níveis de GLU foram aumentados tanto no grupo do etanol ( $47,2 \pm 7,2 \mu\text{mol/g}$  de tecido) quanto no grupo da naltrexona ( $41,2 \pm 6,4 \mu\text{mol/g}$  de tecido), quando comparado ao controle ( $23,1 \pm 3,0 \mu\text{mol/g}$  de tecido). Esse aumento foi inibido na presença de Et+naltrexona-1 ( $34,4 \pm 2,9 \mu\text{mol/g}$  de tecido), onde os valores retornaram para os níveis dos controles [ $F(3,21)=15,860$ ;  $p=0,0001$ ]. Embora nenhuma alteração significativa tenha sido observada nos níveis da GLN [ $F(3,22)=2,349$ ;  $p=0,1049$ ], uma tendência a aumento foi evidenciada após a administração de naltrexona ( $28,1 \pm 1,6 \mu\text{mol/g}$  de tecido), quando comparado ao grupo controle ( $20,8 \pm 2,6 \mu\text{mol/g}$  de tecido). Os níveis de TIR, foram diminuídos [ $F(3,21)=13,359$ ;  $p=0,0001$ ] após o tratamento com naltrexona sozinha ( $15,4 \pm 0,8 \mu\text{mol/g}$  de tecido), quando comparado ao controle ( $23,4 \pm 2,2 \mu\text{mol/g}$  de tecido). Entretanto, quando a naltrexona foi administrada após a retirada do etanol ( $19,3 \pm 2,4 \mu\text{mol/g}$  de tecido) essa diminuição, observada apenas com naltrexona, foi potencializada e diferente dos valores dos animais controle, etanol e naltrexona.

### **-Protocolo 2:**

A **Figura 5** mostra os resultados da administração associada de etanol + ketamina (Et+ketamina-2) e de ketamina ou etanol sozinhos. No grupo da associação, os animais foram tratados somente com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a ketamina foi administrada e o tratamento continuou até o 14<sup>o</sup>

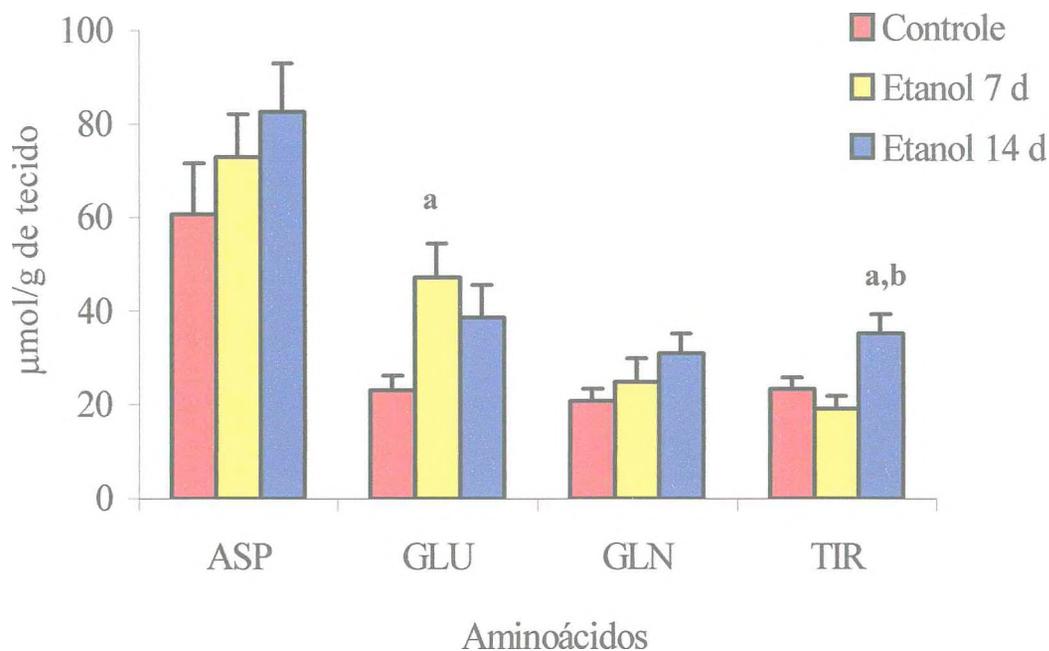
dia, sendo os animais sacrificados após 48 h. A associação de Et+ketamina-2 ( $77,2 \pm 10,5$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) bloqueou o aumento dos níveis de ASP observados após a administração de ketamina isolada ( $104,2 \pm 15,6$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) e seus valores ficaram em torno daqueles dos animais do grupo controle ( $60,6 \pm 11,1$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) e tratado com etanol etanol ( $82,5 \pm 10,5$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) [ $F(3,18)=2,174$ ;  $p=0,1336$ ]. Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de ASP entre os grupos controle e etanol.

De maneira semelhante, nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de GLU [ $F(3,19)=2,172$ ;  $p=0,1312$ ] e GLN [ $F(3,20)=1,379$ ;  $p=0,2831$ ] após o tratamento com etanol e/ou ketamina, quando comparado ao grupo controle (GLU:  $23,1 \pm 3,0$ ; GLN:  $20,8 \pm 2,6$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido). Entretanto, uma tendência a aumento de GLU foi observado após a administração dessas drogas, sozinhas (GLU:  $40,2 \pm 7,23$ ; GLN:  $25,2 \pm 3,1$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) ou associadas (GLU:  $45,2 \pm 7,5$ ; GLN:  $29,1 \pm 4,9$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido), quando comparado aos valores dos animais controles. Quanto aos níveis de TIR, uma diminuição [ $F(3,18)=14,004$ ;  $p=0,0001$ ] foi observada após a associação de Et+ketamina-2, quando comparado ao controle (53,5%) e etanol (69%). Embora sem diferença estatística, a associação destas drogas parece intensificar a diminuição nos níveis de TIR causado por ketamina sozinha (**Figura 5**).

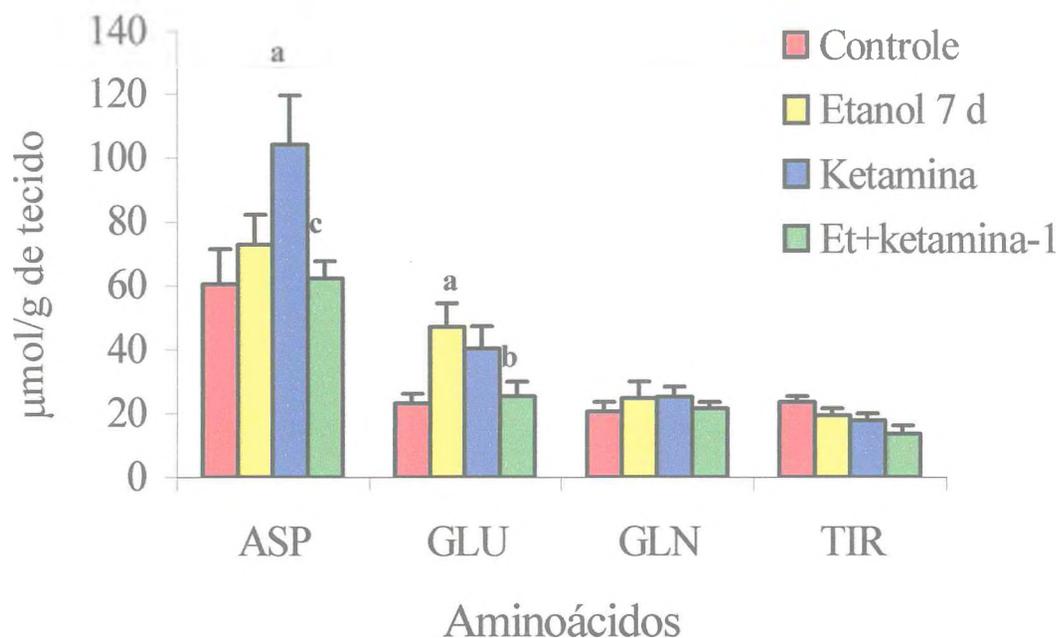
Os resultados da administração de etanol e/ou haloperidol estão mostrados na **Figura 6**. A associação de Et+haloperidol-2 ( $37,6 \pm 6,8$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) causou uma diminuição dos níveis de ASP, quando comparada aos controle (38%), etanol (54,4%) ou haloperidol (42,4%). Contudo, uma diferença estatística somente foi evidenciada entre os animais tratados com etanol e com a associação Et+haloperidol-2 [ $F(3,20)=4,168$ ;  $p=0,0220$ ]. De modo semelhante ao observado com a associação de Et+ketamina-2, o tratamento de Et+haloperidol-2 também não mostrou alteração nos níveis de GLU [ $F(3,20)=1,404$ ;  $p=0,2760$ ] e GLN [ $F(3,20)=2,426$ ;  $p=0,1011$ ] em corpo estriado de ratos. Por outro lado, efeito inverso foi observado entre os grupos tratados com etanol ou Et+haloperidol-2 nos níveis de TIR. Enquanto a administração de etanol aumentou em 50% os níveis deste aminoácido em relação àqueles do grupo controle, o tratamento com etanol associado ao haloperidol diminuiu ( $19,9 \pm 3,6$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido) os níveis de TIR em relação ao grupo tratado apenas com etanol ( $35,1 \pm 4,3$   $\mu\text{mol/g}$  de

tecido). Nenhuma diferença significativa entretanto foi observada entre os grupos controle, haloperidol e Et+haloperidol [ $F(3,18)=8,764$ ;  $p=0,0013$ ].

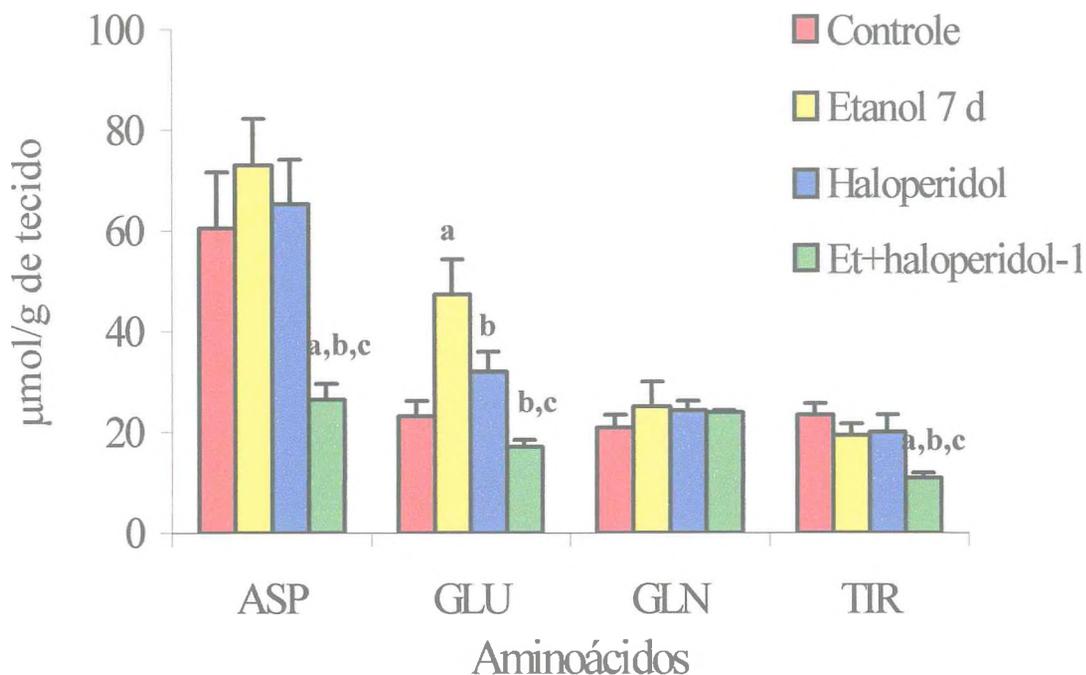
Quanto à associação de etanol e naltrexona (Et+naltrexona-2), uma diminuição dos níveis de ASP (**Figura 7**) foi observado nos grupos tratados com naltrexona sozinha ( $41,2 \pm 6,4 \mu\text{mol/g}$  de tecido) ou associada com etanol ( $32,1 \pm 4,1 \mu\text{mol/g}$  de tecido), em relação aos grupos controle ( $60,6 \pm 11,1 \mu\text{mol/g}$  de tecido) e etanol sozinho ( $82,5 \pm 10,5 \mu\text{mol/g}$  de tecido) [ $F(3,17)=5,831$ ;  $p=0,0084$ ]. Novamente, nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de GLU [ $F(3,19)=2,630$ ;  $p=0,0857$ ] e GLN [ $F(3,21)=1,906$ ;  $p=0,1648$ ] após o tratamento com etanol e/ou naltrexona. Semelhantemente ao observado com a associação de Et+haloperidol, a associação de Et+naltrexona ( $19,1 \pm 2,6 \mu\text{mol/g}$  de tecido) também impediu o aumento dos níveis de TIR observado após o tratamento com etanol sozinho ( $35,1 \pm 4,3 \mu\text{mol/g}$  de tecido) [ $F(3,19)=10,155$ ;  $p=0,0005$ ].



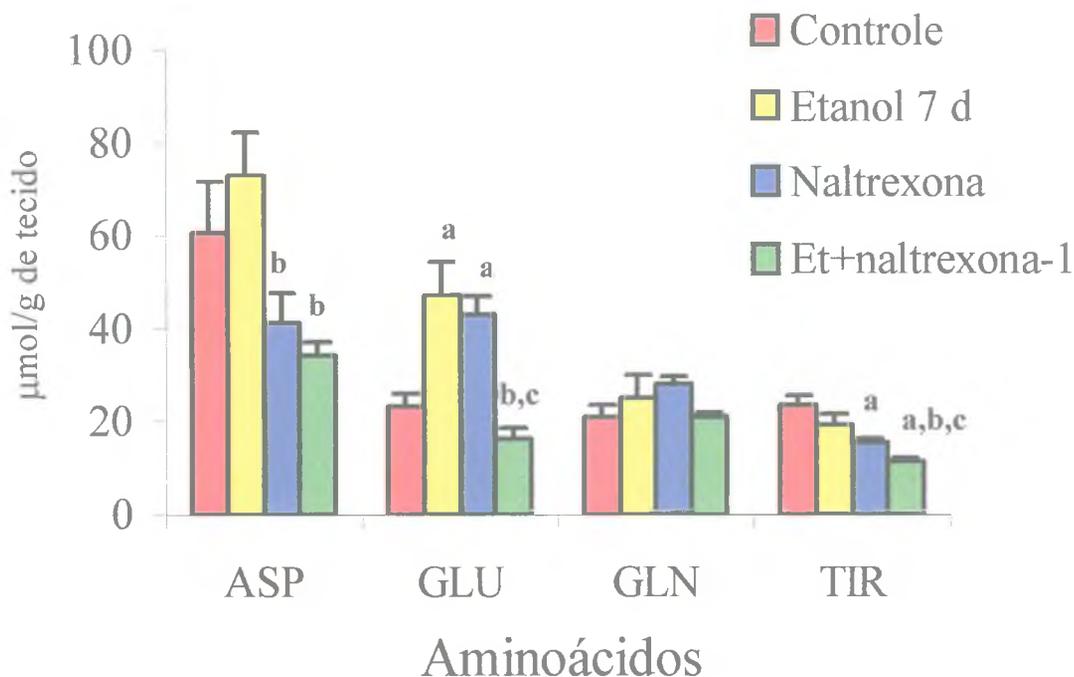
**Figura 1- Efeitos do etanol sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos.** Os animais foram tratados diariamente durante 7 ou 14 dias com etanol (4 g/kg, v.o) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os dados em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n=5-10$ ). Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a** e **b** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle e etanol 7 dias. Asp-aspartato; Glu- glutamato; Gln- glutamina; Tir-tirosina.



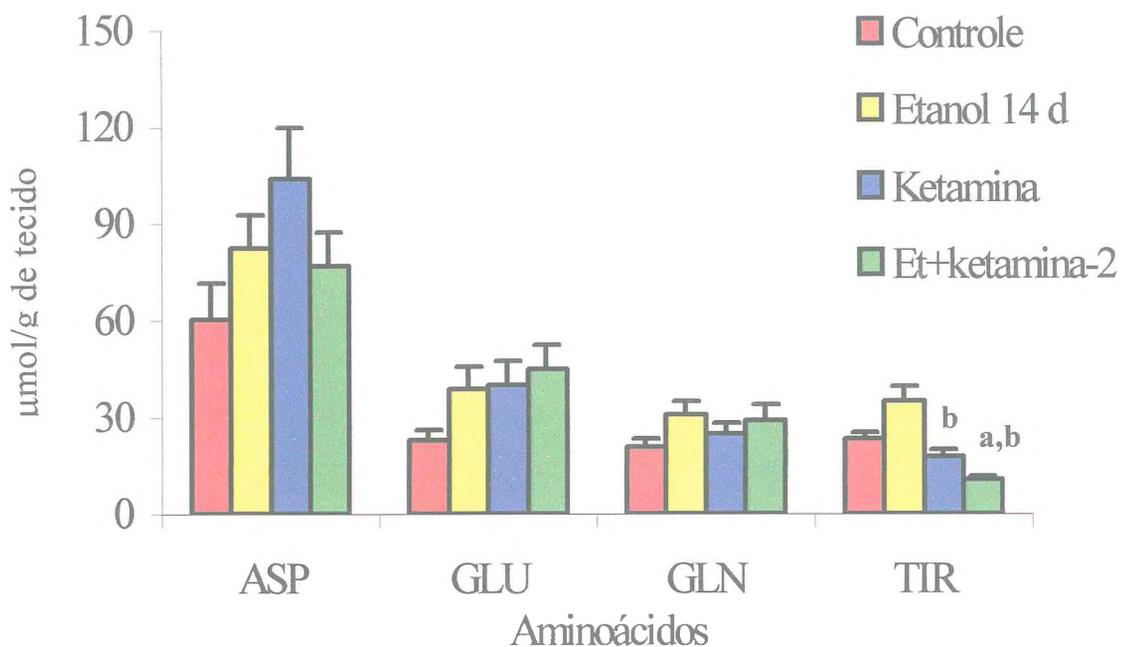
**Figura 02-** Efeitos do etanol, ketamina ou Et+ketamina-1 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos. Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o), ketamina (25 mg/kg, i.p.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo Et+ketamina-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com ketamina até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os dados em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n= 5-10$ ). Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, b e c ( $p<0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 7 dias ou ketamina, respectivamente. Asp-aspartato; Glu- glutamato; Gln- glutamina; Tir-tirosina.



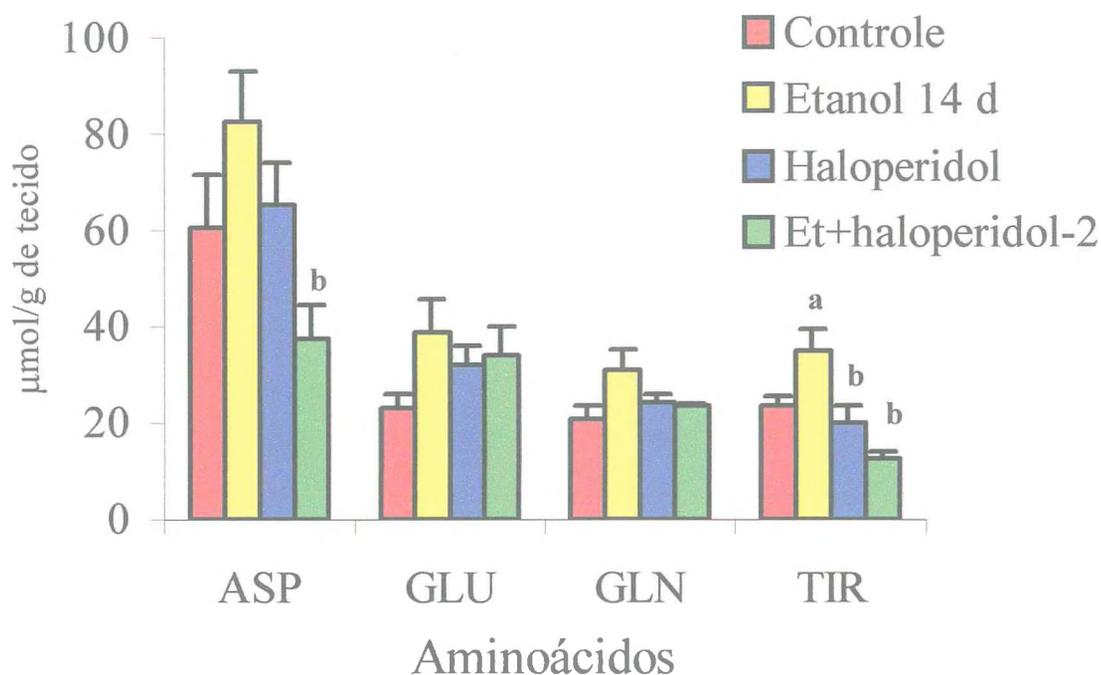
**Figura 03-** Efeitos do etanol, haloperidol ou Et+haloperidol-1 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos. Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o), haloperidol (1 mg/kg, i.p.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo Et+haloperidol-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com haloperidol até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os dados em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n= 5-10$ ). Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** ( $p<0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 7 dias ou haloperidol, respectivamente. Asp-aspartato; Glu- glutamato; Glu- glutamina; Tir-tirosina.



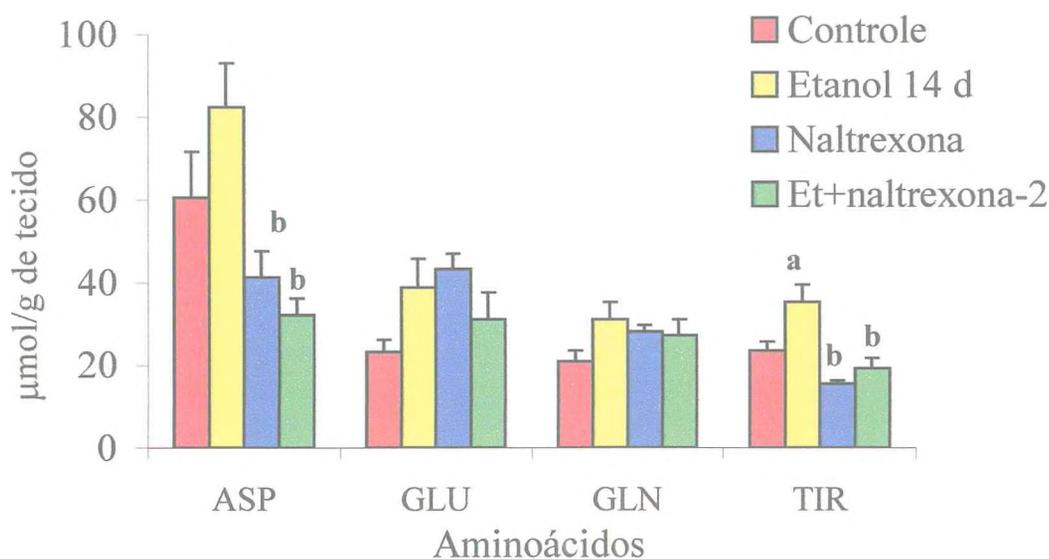
**Figura 04-** Efeitos do etanol, naltrexona ou Et+naltrexona-1 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos. Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o), naltrexona (10 mg/kg, v.o) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais da associação Et+naltrexona-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com naltrexona até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os dados em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n= 5-10$ ). Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, b e c ( $p<0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 7 dias ou naltrexona, respectivamente. Asp-aspartato; Glu- glutamato; Gln- glutamina; Tir-tirosina.



**Figura 05- Efeitos do etanol (14 d), ketamina ou Et+ketamina-2 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos.** Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo controle (água destilada) e ketamina foram tratados por 7 dias e na associação Et+ketamina-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol a ketamina foi administrada e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os dados em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n= 5-10$ ). Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a** e **b** ( $p<0,05$ ) quando comparados ao controle e etanol 14 d, respectivamente. Asp-aspartato; Glu- glutamato; Gln- glutamina; Tir-tirosina.



**Figura 06-** Efeitos do etanol (14 d), haloperidol ou Et+haloperidol-2 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos. Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo controle (água destilada) e haloperidol (1 mg/kg, i.p.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+haloperidol-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol o haloperidol foi administrado e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os dados em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido são apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 5-10). Para análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle e etanol 14 d, respectivamente. Asp-aspartato; Glu- glutamato; Gln- glutamina; Tir-tirosina.



**Figura 07- Efeitos do etanol (14 d), naltrexona ou Et+naltrexona-2 sobre os níveis de aminoácidos livres em corpo estriado de ratos.** Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo controle (água destilada) e naltrexona (10 mg/kg, v.o.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+naltrexona-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol a naltrexona foi administrada e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, os animais foram sacrificados e o corpo estriado dissecado. Os dados em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido são apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 5-10). Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a e b ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle e etanol 14 d, respectivamente. Asp-aspartato; Glu- glutamato; Gln- glutamina; Tir-tirosina.

## DISCUSSÃO

Segundo a literatura (Dahchour & Witte, 2000), o etanol altera as concentrações de aminoácidos no cérebro, principalmente o glutamato, de maneira tempo dependente. Assim, no presente trabalho os níveis de ASP, GLU, GLN e TIR foram determinados após a administração de etanol (4 g/kg) durante 7 ou 14 dias e com tempo de retirada de 48 h em CE de ratos. Durante a administração sub-crônica de etanol por 7 dias, os níveis de GLU foram aumentados e retornaram para os valores dos animais controle após 14 d, embora ainda apresentassem uma tendência ao aumento. Esses resultados estão parcialmente de acordo com estudos prévios (Morari et al., 1996; Young & Bradford, 1991), onde o tratamento repetido com etanol aumenta os níveis de GLU em consequência da *upregulation* de receptores NMDA.

Segundo Rossetti et al. (1999), o receptor NMDA apresenta um mecanismo de *feedback* positivo na liberação de GLU. Assim, como o efeito prolongado do etanol é causar uma *upregulation* nesses receptores, um aumento de glutamato acontece como consequência dessa *upregulation*. Dados de Simson et al. (1993) mostraram que etanol, aplicado localmente, inibe a atividade neuronal ligada a receptores NMDA no colículo inferior e hipocampo, mas não no septo lateral. Desse modo, eles sugerem que pode existir dois tipos de receptores NMDA, um sensível e outro insensível ao etanol.

Vários mecanismos (Fadda & Rossetti, 1998; Schuman & Madison 1994) são propostos para explicar como os receptores NMDA aumentam a liberação de glutamato. Entretanto, uma proposta bem discutida (Rossetti et al., 1999; Bustos et al., 1992) é de que esses receptores sejam pré-sinápticos do tipo NMDA R1 (Siegel et al., 1994) com a função de facilitar a liberação de GLU.

Segundo Dahchour & Witte (1999) o aumento máximo de glutamato pela técnica de microdiálise, após tratamento com etanol, dura em média 12 h no núcleo acumbente de ratos. Similarmente, em estudo utilizando essa técnica de microdiálise De Witte et al. (2000) observaram que os níveis extracelulares de glutamato foram elevados 4 h após a retirada do etanol crônico e permaneceram elevados até 32 h depois. Assim, o tempo de realização do experimento é outro fator importante para os efeitos observados nesse e em outros trabalhos.

Por outro lado, após 14 d de administração de etanol um significativo aumento de TIR foi observado em relação ao grupo controle ou tratado com etanol por 7 dias. A tirosina é um AA presente na dieta, importante no processo de neurotransmissão, pois funciona como um precursor para síntese de DA e NE (Rang et al., 2001). Alguns autores relacionam assim o aumento desse AA com o aumento nas sínteses de DA e NE e com o consumo de etanol (Leyton et al., 2000). Entretanto, essa relação não parece ser tão clara, pois conforme resultado mostrado na Figura 3 do Capítulo 2, o tratamento com etanol (4 g/kg, v.o.), durante 7 dias e com retirada de 48 h, causou um significativo aumento nos níveis de DA, enquanto nessas mesmas condições a TIR não foi alterada. Contudo, como o presente trabalho foi realizado com homogenato cerebral, a tirosina encontrada aqui, bem como os outros AA estudados neste trabalho, representa a tirosina total no tecido e não apenas a tirosina intraneuronal.

Uma tendência ao aumento também foi observada nos níveis de GLN e ASP após o tratamento crônico com etanol (14 d). A GLN, proveniente de células gliais, é um AA importante para a síntese do glutamato (Nicholls 1994). Conforme a hipótese acima relativa à tirosina, também é aceito a existência de uma relação direta entre GLN e GLU, contudo a síntese de GLU também pode ocorrer por outra via, através do  $\alpha$ -cetoglutarato originário da mitocôndria. Em um trabalho realizado por Ledig et al. (1982), essa correlação também não foi mostrada, pois esses pesquisadores observaram um aumento de ASP e GLU e uma diminuição de GLN após tratamento crônico com etanol. O aspartato também é um AA excitatório que parece agir pela interação com receptores ionotrópicos, NMDA (Rang et al., 2001). Segundo Murphy et al. (1985), o etanol também aumenta os níveis de ASP em tecido estriatal de ratos.

Como discutido em capítulos anteriores, o sistema glutamatérgico parece interferir ou sofrer interferência de outros sistemas de neurotransmissores (Potschka et al., 1999). Portanto, a relação entre esses AA e drogas antagonistas dos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide também foi estudada neste trabalho.

Um significativo aumento de ASP foi observado após a administração de ketamina sozinha, contudo esse efeito foi revertido com exposição prévia ao etanol

(Et+ketamina-1) e apresentou uma tendência a voltar para os valores do controle no grupo tratado com a associação (Et+ketamina-2). Esses resultados sugerem que o aumento de ASP produzido pela ketamina foi bloqueado tanto pela exposição prévia ao etanol, quanto pela administração associada com o etanol.

Enquanto nenhuma alteração foi observada nos níveis de GLN após o tratamento com a ketamina e/ou etanol, a administração de ketamina apresentou um efeito inverso nos grupos submetidos à exposição prévia do etanol (Figura 2) ou no grupo da associação de etanol mais ketamina (Figura 5). Assim, uma diminuição (Et+ketamina-1) e um aumento (Et+ketamina-2) de GLU foi observado quando comparados ao grupo tratado com etanol sozinho.

Analisando esses resultados, foi observado que os níveis de GLN não sofreram interferência pela administração de ketamina e/ou etanol, sugerindo que essas drogas não interferem com uma das vias de síntese de GLU. Segundo Rossetti et al. (1999), a liberação de glutamato extracelular ativa os receptores NMDA e não NMDA a nível de fenda sináptica. Contudo, esses autores referem que através da técnica de microdiálise, utilizada por eles para dosar os níveis de glutamato extracelular, não foi possível identificar a origem do GLU (neuronal ou de células gliais).

A ketamina é uma droga antagonista, não competitiva, de receptores NMDA que durante o uso crônico pode também causar um efeito de *upregulation* nesses receptores (Rang et al., 2001). Através da análise dos resultados, pode-se supor que a ketamina administrada, a partir do oitavo dia, após um tratamento prévio por sete dias com etanol (protocolo 1), encontra os receptores NMDA já sensibilizados e assim apresenta apenas um efeito de antagonista, diminuindo assim a função desses receptores e consequentemente a liberação de ASP e GLU. Por outro lado, quando o tratamento continuou associado com o etanol parece ocorrer um efeito similar entre os grupos estudados, no qual uma tendência a elevação desses aminoácidos excitatórios, principalmente GLU foi observado.

Um outro resultado obtido nesse estudo foi a diminuição de TIR após a associação de etanol mais ketamina (Et+ketamina-2) em relação aos controles e ao

grupo tratado com etanol. Os níveis de ASP não foram alterados na presença de haloperidol sozinho. Todavia, uma diminuição expressiva desse aminoácido foi observada nos grupos Et+haloperidol-1 e Et+haloperidol-2. Uma diminuição de GLU somente foi observada no grupo com exposição prévia ao etanol (Et+haloperidol-1), quando comparado aos grupos etanol e haloperidol sozinho. Por outro lado, nenhuma alteração foi observada nos níveis de GLN, após a administração de etanol e/ou haloperidol.

Dalia et al. (1998) sugerem a existência de uma relação unidirecional entre DA e GLU no NAc de ratos. Segundo esses pesquisadores, a DA regula a liberação extracelular de glutamato através de seus receptores dopaminérgicos. Embora o mecanismo para esse efeito não seja claro, os pesquisadores acreditam que a ativação de receptores dopaminérgicos estimulem diretamente a liberação de GLU nas terminações nervosas. Contudo, estudos divergentes têm sido encontrados na literatura (Yamamoto & Davy, 1992) onde os receptores dopaminérgicos bloqueiam a liberação de glutamato em corpo estriado.

Através dos resultados apresentados no presente trabalho, pode-se sugerir que o haloperidol somente interfere nos níveis de ASP quando estes já foram alterados pelo etanol. Por outro lado, o haloperidol através de sua interação com o sistema dopaminérgico, pode bloquear o aumento de GLU somente no grupo com exposição prévia ao etanol. De maneira surpreendente, quando o haloperidol está associado ao etanol nenhuma alteração ocorre na liberação de GLU, sugerindo que exista uma competição entre o aumento da densidade de receptores NMDA (*upregulation*), causado pelo etanol, e o bloqueio de DA produzido pelo haloperidol. Contudo, como o haloperidol é um antagonista não seletivo de receptores DA e também apresenta atividade pré e pós-sináptica (Westerink et al., 2001; Leysen et al., 1994) não é surpresa observar efeitos divergentes com essa droga na literatura.

Segundo O'Neill & Shaw (1999), o antagonista de receptor NMDA, MK-810, causou uma hiperatividade em camundongos e esse efeito foi bloqueado pela administração do haloperidol, sugerindo assim uma relação estreita entre esses sistemas.

Quanto aos níveis de TIR, no presente trabalho uma diminuição foi observada após a administração de Et+haloperidol-1. No grupo da associação (Et+haloperidol-2), um efeito inverso foi observado ao do etanol. Esses resultados sugerem que o haloperidol sozinho não interfere com a síntese de DA. Porém, a associação com o etanol ou uma exposição prévia ao etanol parece interferir com esse AA após a retirada do etanol.

Os animais tratados com naltrexona sozinha, Et+naltrexona-1 e ET+naltrexona-2 apresentaram uma diminuição nos níveis de ASP, em relação aos animais do grupo controle e etanol, embora a significância estatística somente tenha sido observado em relação ao grupo do etanol, talvez por conta do pequeno número de animais e da dispersão observada dentro do grupo. Efeito inverso foi observado nos níveis de GLU após o tratamento com naltrexona, onde o efeito foi bloqueado pela exposição prévia com etanol (Et+naltrexona-1), e não foi alterado durante a associação (Et+naltrexona-2). A naltrexona também não interferiu de maneira significativa nos níveis de GLN.

Dourmap et al. (1997) mostraram que o corpo estriado é uma estrutura dentro do núcleo da base que possui uma importante inervação dos sistemas opióide e glutamatérgico. Maneuf et al. (1995) demonstraram que agonistas de receptores  $\kappa$  reduzem a liberação de glutamato causada por despolarização e que o corpo estriado possui um número expressivo desse receptor (Hill & Brotchie 1995). Assim, o antagonismo da naltrexona nesse receptor pode elevar os níveis de GLU. Entretanto, a complexidade de automodulação desses sistemas dificulta um entendimento claro do mecanismo exato de ação. Desse modo, hipotetizou-se que a naltrexona, bloqueando a inibição de DA através do receptor  $\kappa$  (Di Chiara & Imperato, 1988), pode aumentar de maneira indireta a liberação de GLU. Segundo Dalia et al. (1998), a DA modula a liberação de GLU via receptor NMDA. Então, pode-se sugerir que o aumento observado, no presente trabalho nos níveis de GLU após o tratamento com naltrexona, seja em decorrência do bloqueio do receptor  $\kappa$ , com consequente aumento do sistema dopaminérgico. Essa interpretação é fortalecida pela ausência de alteração na GLN, mostrando assim que não existe alteração em uma das vias de síntese de GLU.

Outra observação importante é de que o mecanismo de interação opióide-DA-GLU não acontece de maneira semelhante para o outro AA excitatório, pois na presença de naltrexona foi observado uma tendência a diminuição dos níveis de ASP e esses níveis continuaram baixos após a exposição prévia ao etanol (Et+naltrexona-1) ou durante a associação (Et+naltrexona-2).

De maneira inesperada, nós observamos que a exposição prévia ao etanol foi capaz de bloquear o aumento nos níveis de GLU visto quando o etanol e a naltrexona foram administrados isoladamente. Entretanto, quando administrados associados, os níveis de GLU apresentaram uma tendência a voltar para os valores dos animais controles. Contudo, um fator importante que pode ter interferido nestes resultados foi o tempo de retirada da droga. Assim, como comentado anteriormente, os níveis de GLU tenderam a aumentar após a administração do etanol entre 4 e 32 h; após esse período voltaram a valores basais (De Witte et al., 2000). Esses achados também sugerem que a exposição prévia ao etanol é um fator importante para determinar alterações futuras no comportamento do indivíduo.

Quanto à TIR, a naltrexona diminuiu os níveis desse AA, sozinha ou após exposição prévia ao etanol. Por outro lado, quando associada ao etanol (Et±naltrexona-2), os valores ficaram em torno daqueles do grupo controle e conseqüentemente bloquearam o aumento produzido pelo etanol sozinho. Embora não exista uma relação exata entre o aumento da síntese de DA e o aumento de DA na fenda sináptica, pode-se sugerir que a diminuição de TIR tenha acontecido em consequência do bloqueio do receptor  $\kappa$  pela naltrexona. Esse bloqueio leva a um aumento de DA na fenda sináptica o que pode causar como consequência um efeito automodulatório na enzima tirosina hidroxilase (Rang et al., 2001), diminuindo assim a síntese de DA e conseqüentemente a utilização desse da TIR.

## CONCLUSÃO

- ✓ Os níveis de glutamato foram aumentados após o tratamento com o etanol, indicando que o mesmo modula a liberação de glutamato provavelmente por induzir uma *upregulation* nos receptores NMDA.
- ✓ O aumento dos níveis de aspartato, causado pela ketamina, foi bloqueado pela administração prévia de etanol ou quando a ketamina foi associada ao etanol, sugerindo que o etanol através do bloqueio de receptores NMDA diminui a liberação de ASP no corpo estriado de ratos.
- ✓ A ketamina apresenta efeitos diferentes, quando administrada em grupos previamente tratados com etanol ou durante a associação com o etanol. Isso parece ser resultado do antagonismo nos receptores NMDA, e da *upregulation* compensatória produzida nesses receptores pela ketamina.
- ✓ A ketamina não interfere com os níveis de GLN, sugerindo que esta droga não interfere com uma das vias de síntese de GLU.
- ✓ Na presença de etanol, a ketamina diminuiu os níveis de tirosina, sugerindo uma relação com o sistema dopaminérgico, talvez pela depleção desse aminoácido em decorrência do aumento da síntese de DA, induzida pelo glutamato.
- ✓ O haloperidol, administrado após a retirada de etanol ou durante a associação com o etanol, diminuiu os níveis de aspartato, sugerindo que nesses dois protocolos tanto o haloperidol quanto o etanol causam modulação negativa nesse AA excitatório.
- ✓ O haloperidol, administrado após a retirada de etanol, bloqueou o aumento de GLU causado pelo etanol, mostrando que o haloperidol pode reverter esse efeito do etanol provavelmente pelo bloqueio do sistema dopaminérgico. A diminuição dos níveis de TIR, observado no grupo Et+haloperidol-1, também pode ser consequência da interação dessas com o sistema dopaminérgico.

- ✓ A naltrexona sozinha diminuiu e aumentou os níveis de ASP e GLU, respectivamente, mostrando assim que pode modular de maneira diferente esses dois AA excitatórios.
  
- ✓ Na presença do etanol ou após a exposição prévia ao etanol, a naltrexona também diminuiu os níveis de ASP, sugerindo que esse efeito é predominantemente desse antagonista opióide.
  
- ✓ A naltrexona, administrada após a retirada de etanol, bloqueou o aumento de GLU causado pelo etanol, mostrando que a naltrexona pode reverter esse efeito de maneira indireta, provavelmente por interferir com o sistema dopaminérgico. A diminuição dos níveis de TIR, observada nesse grupo Et+naltrexona-1, também pode ser consequência dessa interação.

## **CAPÍTULO V**

**Determinação dos níveis séricos de glicose, apolipoproteínas, lipoproteínas e enzimas de função hepática em ratos após administração de etanol sozinho e/ou associado com antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide.**

## INTRODUÇÃO

O etanol é uma droga conhecida por causar alterações em enzimas hepáticas, lipoproteínas e apolipoproteínas plasmáticas (Koppes et al., 2000). Alguns estudos epidemiológicos tentam simultaneamente examinar a relação entre o consumo de álcool, variações bioquímicas e subsequente risco de doença cardiovascular (Rimm et al., 1999).

A duração e a dose de etanol são fatores que influenciam o risco de injúria no fígado. As atividades das enzimas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) são consideradas como marcadores para a função hepática. O etanol eleva os níveis dessas enzimas à medida que causa danos hepatocelulares (Enomoto et al., 1999).

Embora existam trabalhos que não tenham encontrado nenhuma correlação entre ingestão de álcool e incidência de doenças coronarianas (Klatsky et al., 1990), muitos estudos mostram que o consumo de álcool pode causar um efeito protetor quanto ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, devido à sua capacidade de aumentar os níveis de HDL e diminuir os níveis de LDL (Rimm et al., 1999; Kiechl et al., 1998). Tem sido proposto que os efeitos anti-aterogênicos dos níveis de HDL somente ocorrem quando há um consumo moderado ou elevado de álcool (Koppes et al., 2000).

Segundo Branchi et al. (1997), tanto os níveis de APO A1 quanto os de APO A2, apolipoproteínas presentes na molécula do HDL, aumentaram em indivíduos que fizeram uso de álcool. Contudo, outros trabalhos (Rimm et al., 1999) mostraram que somente os níveis de APO A1 ficaram aumentados após o consumo do etanol. Os níveis elevados de APO A1 parecem estar melhor correlacionados com a proteção contra as doenças coronarianas, pois a APO A1 é a fração anti-aterogênica do HDL (Puchois et al., 1990). Entretanto, alguns autores assumem que o aumento nas concentrações de ambos marcadores não são independentes e refletem o mesmo fenômeno biológico (Rimm et al., 1999).

O etanol é uma droga conhecida por interagir com outros fármacos e essas interações podem resultar em alterações nos níveis de lipoproteínas, apolipoproteínas e enzimas hepáticas. Alguns trabalhos sugerem, por exemplo, que o sistema opióide central apresenta um mecanismo não conhecido que altera os níveis de colesterol plasmático e que a naltrexona parece interferir com esse efeito (Budzynski et al., 2000). Assim, pode-se observar que drogas utilizadas para o tratamento do alcoolismo podem também induzir uma alteração nos níveis de lipoproteínas, apolipoproteínas e enzimas de função hepática e, conseqüentemente, podem influenciar a função de órgãos periféricos, tais como o fígado e coração.

## **OBJETIVOS**

O objetivo do estudo foi verificar os níveis séricos de glicose, apolipoproteínas, lipoproteínas e enzimas de função hepática em ratos, após administração de etanol sozinho e/ou associado com drogas antagonistas dos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide.

## RESULTADOS

Os níveis de glicose, apolipoproteínas, lipoproteínas e enzimas de função hepática (ALT e AST) foram verificados na presença de etanol e/ou ketamina, haloperidol e naltrexona em dois protocolos. No protocolo 1 os antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide foram administrados após exposição prévia ao etanol e no protocolo 2 o etanol e esses antagonistas foram administradas associadas após o sétimo dia de tratamento com etanol (conforme descrito em materiais e métodos). Os resultados do protocolo 1 e 2 estão descritos abaixo:

### -Protocolo 1:

A **Tabela 1** mostra os resultados da administração de ketamina após a retirada de etanol (Et+ketamina-1), bem como a administração de ketamina (25 mg/kg, i.p.) ou etanol (4 g/kg, v.o.) sozinhos, durante um período de sete dias. Pode-se observar que, no grupo da retirada os animais foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou somente com ketamina até o 14<sup>o</sup> dia, sendo os animais sacrificados após 48 h. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de glicose, ALT e AST transaminase, quando comparado aos controles (129,2±7,1; 48,6±2,5; 83,6±7,0 U/L, respectivamente). Entretanto, um aumento nos valores de glicose [F(3,21)=3,632; p=0,0329] foi observado após o tratamento com Et+ketamina-1 (138,9±3,8 mg/dl) apenas quando comparada ao grupo do etanol (113,1±5,6 mg/dl).

Quanto à dosagem de apolipoproteínas sanguínea, nenhuma alteração foi observada nos níveis de APO A1 [F(3,19)=2,571; p=0,0904], COLE-T [F(3,21)=2,772; p=0,0714] e HDL [F(3,21)=0,7318; p=0,5464] após o tratamento com etanol e/ou ketamina, quando comparados aos valores dos animais controles (0,98±0,14; 49,0±3,9; 19,3±1,8, mg/dl, respectivamente) (**Tabela 2**). Por outro lado, os níveis de APO B foram diminuídos [F(3,19)=15,103; p<0,0001] após o tratamento com etanol (1,3±0,06 mg/dl) ou ketamina (2,8±0,2 mg/dl) sozinhos quando comparados ao controle (6,6±1,0 mg/dl). Esses valores voltaram para os níveis dos animais controles após o tratamento com Et+ketamina-1 (5,5±0,6 mg/dl). Quanto à dosagem de TGI, um aumento não significativo [F(3,20)=4,043; p= 0,0244] foi observado após a administração de etanol (51,8±2,3 mg/dl) e ketamina (56,0±8,8 mg/dl), sozinhos. Entretanto, o tratamento com

ketamina, no grupo da retirada do etanol (Et+ketamina-1), parece ter intensificado esse efeito, aumentando (84,3%) assim os níveis de TGI quando comparado ao grupo controle ( $36,9 \pm 5,1$  mg/dl).

A **Tabela 3** mostra que a administração de haloperidol sozinho ou após a retirada de etanol (ET+haloperidol-1) não alterou os níveis de glicose, ALT e AST de ratos, quando comparados ao grupo controle ( $129,2 \pm 7,1$ ;  $48,6 \pm 2,5$ ;  $83,6 \pm 7,0$ , U/L respectivamente), exceto por um aumento encontrado nos níveis da ALT (39,1%) e AST (37,3%) nos animais tratados com haloperidol sozinho. Contudo, esse aumento somente foi significativo [ $F(3,19)=26,952$ ;  $p=0,0001$ ] nos níveis de AST quando comparado ao controle.

Os níveis de APO A1 (**Tabela 4**) foram aumentados nos animais tratados com haloperidol sozinho ( $2,6 \pm 0,24$  mg/dl), tanto em relação ao grupo controle ( $0,98 \pm 0,14$  mg/dl), quando ao grupo tratado com etanol ( $1,1 \pm 0,04$  mg/dl). Contudo, esses valores foram diminuídos no grupo Et+haloperidol-1 ( $1,8 \pm 0,13$  mg/dl), quando comparados ao grupo tratado somente com haloperidol, e permaneceram aumentados em relação aos grupos controle e etanol [ $F(3,19)=21,996$ ;  $p<0,0001$ ]. Já os níveis de APO B foram diminuídos após a administração de etanol ( $1,3 \pm 0,06$  mg/dl) ou haloperidol ( $2,8 \pm 0,58$  mg/dl), quando comparados ao controle ( $6,6 \pm 1,0$  mg/dl), e voltaram para os níveis do controle após a administração de Et+haloperidol-1 ( $6,6 \pm 0,81$  mg/dl) [ $F(3,19)=13,729$ ;  $p=0,0001$ ].

Por outro lado, os níveis de TGI foram aumentados [ $F(3,22)=22,340$ ;  $p<0,0001$ ] no grupo tratado com Et+haloperidol-1 ( $128,3 \pm 12,6$  mg/dl), quando comparados ao controle ( $36,9 \pm 5,1$  mg/dl), etanol ( $51,8 \pm 2,3$  mg/dl) e haloperidol ( $52,6 \pm 4,6$  mg/dl) (**Tabela 4**). Enquanto o haloperidol sozinho ou administrado após a retirada de etanol (Et+haloperidol-1) não alterou os níveis de HDL, em relação ao controle ( $19,3 \pm 1,8$  mg/dl) [ $F(3,20)=0,9316$ ;  $p=0,4469$ ], uma diminuição de COLE-T foi encontrada após a administração de haloperidol ( $34,7 \pm 2,6$  mg/dl), tendo esses valores retornando aos níveis do controle ( $49,0 \pm 3,9$  mg/dl) no grupo tratado com Et+haloperidol-1 ( $48,2 \pm 4,7$  mg/dl) [ $F(3,2)=4,277$ ;  $p=0,0202$ ].

A naltrexona também foi administrada em ratos sozinha ou após a retirada do etanol (Et+naltrexona-1) (**Tabela-5**). Na presença deste antagonista opióide, nenhuma alteração foi observada nos níveis de glicose, ALT [F(3,21)=19,272; p<0,0001] e AST [F(3,21)=19,134; p<0,0001] quando comparado aos grupos controle (129,2±7,1; 48,6±2,5; 83,6±7,0 U/L, respectivamente), ou etanol (113,1±5,6; 52,2±5,1; 103,8±8,3 U/L, respectivamente). Entretanto, quando administrada após a retirada do etanol, um aumento significativo de glicose (144,7±4,9 mg/dl) (comparado ao grupo etanol), ALT (71,8±4,8 U/L) (comparado aos grupos controle, etanol e naltrexona) e AST (112,0±6,4 U/L) (comparado ao grupo controle) foram observados.

Enquanto nenhuma alteração significativa foi observada, após a administração de naltrexona ou Et+naltrexona-1 (**Tabela 6**), nos níveis de APO A1 [F(3,21)=1,826; p= 0,1786] e HDL [F(3,22)=1,757; p=0,1896] em relação aos grupos controle (0,98±0,14; 19,3±1,8 mg/dl, respectivamente) e etanol (1,1±0,04; 22,0±1,1 mg/dl, respectivamente), resultado semelhante aos grupos da ketamina e haloperidol foram encontrados nos níveis de APO B. A naltrexona diminuiu (2,8±0,40 mg/dl) os níveis de APO B, quando comparada ao controle (6,6±1,0 mg/dl), e sua administração após a retirada do etanol (Et+naltrexona-1) aumentou esses níveis deixando-os em torno dos valores dos controles (6,6±1,0 mg/dl) [F(3,20)=20,660; p< 0,0001].

Efeito inverso foi observado na dosagem de TGI [F(3,20)=6,710; p=0,0034] e COLE-T [F(3,22)=12,153; p=0,0001], após a administração de naltrexona, onde um aumento (76,4±4,9 mg/dl) e diminuição (30,7±1,8 mg/dl), respectivamente foram observados, quando comparado aos níveis do controle (TGI: 36,9±5,1; COLE-T: 49,0±3,9 mg/dl) e etanol (TGI:51,8±2,3; COLE-T: 52,9±3,1 mg/dl). Por outro lado, no grupo do Et+naltrexona, foi observada uma diminuição (55±10,8 mg/dl) dos níveis de TGI quando comparado ao grupo tratado apenas com naltrexona, esses valores retornaram para os níveis dos controles. Quanto aos níveis de COLE-T (**Tabela-6**), o grupo tratado com Et+naltrexona-1 apresentou um aumento (40,3±1,7 mg/dl) em relação ao grupo tratado apenas com naltrexona (30,7±1,8 mg/dl), porém estes valores continuaram abaixo dos observados com os grupos controle (49,0±3,9 mg/dl) e etanol (52,9±3,1 mg/dl).

## **-Protocolo 2:**

A **Tabela 7** mostra os resultados da associação de etanol + ketamina (Et+ketamina-2), ketamina ou etanol sozinhos. Deve-se salientar que, no grupo da associação, os animais foram tratados somente com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a ketamina foi administrada e o tratamento continuou até o 14<sup>o</sup> dia, sendo os animais sacrificados após 48 h da retirada do etanol. Enquanto nenhuma alteração foi observada nos níveis de glicose [ $F(3,21)=0,3152$ ;  $p=0,8142$ ] quando comparada aos valores dos animais controle ( $129,2 \pm 7,1$  mg/dl), um aumento dos níveis de ALT foi observado após a administração de etanol ( $74,5 \pm 6,5$  U/L), ketamina ( $60,0 \pm 5,4$  U/L) e Et+ketamina-2 ( $64,1 \pm 6,2$  U/L) quando comparado aos valores dos controles ( $48,6 \pm 2,5$  U/L). Contudo, diferença estatística [ $F(3,21)=3,533$ ;  $p=0,0359$ ] somente foi evidenciada entre os grupos tratados com etanol e controle. A administração de etanol sozinho ( $116,1 \pm 7,3$  U/L), ou associado com ketamina ( $121,8 \pm 10,2$  U/L), também elevou os níveis de AST, tanto em relação ao controle ( $83,6 \pm 7,0$  U/L) quanto ao grupo tratado com ketamina ( $84,0 \pm 4,3$  U/L) [ $F(3,21)=6,709$ ;  $p=0,0031$ ].

Enquanto os níveis de APO A1 foram diminuídos na presença de ketamina ( $0,62 \pm 0,03$  mg/dl), a associação de Et+ketamina-2 ( $1,9 \pm 0,12$  mg/dl) causou um efeito inverso e aumentou os níveis desta apolipoproteína, quando comparado aos grupos controle ( $0,98 \pm 0,14$  mg/dl), etanol ( $1,0 \pm 0,06$  mg/dl) e ketamina [ $F(3,20)=27,865$ ;  $p<0,0001$ ] (**Tabela 8**). Por outro lado, quando o etanol foi administrado sozinho nenhum efeito foi observado. Já os níveis de APO B foram diminuídos tanto no grupo tratado com etanol ( $2,3 \pm 0,3$  mg/dl), quanto no tratado com ketamina ( $2,8 \pm 0,2$  mg/dl), quando comparado ao controle ( $6,6 \pm 1,0$  mg/dl). Contudo, efeito inverso foi encontrado com a associação destas duas drogas ( $20,4 \pm 1,3$  mg/dl) em relação ao controle, etanol e ketamina [ $F(3,25)=61,233$ ;  $p<0,0001$ ].

Quanto aos níveis de TGI, um aumento foi observado após o tratamento isolado de etanol ( $65,9 \pm 5,6$  mg/dl) ou ketamina ( $56,0 \pm 8,8$  mg/dl), quando comparado ao controle ( $36,9 \pm 5,1$  mg/dl). Contudo, quando estas drogas foram associadas uma diminuição ( $33,7 \pm 1,9$  mg/dl) dos níveis de TGI foi observada e esses valores voltaram para os níveis dos animais controle [ $F(3,20)=7,484$ ;  $p=0,0021$ ]. Quanto à dosagem de COLE-T e HDL, uma elevação destas lipoproteínas foi encontrada após a

administração de etanol ( $72,9 \pm 1,6$ ;  $26,2 \pm 0,7$  mg/dl, respectivamente), em relação ao grupo controle ( $49,0 \pm 3,9$ ;  $19,3 \pm 1,8$  mg/dl, respectivamente). Entretanto, quando o etanol foi administrado mais a ketamina (Et+ketamina-2) os níveis de COLE-T ( $40,5 \pm 1,8$  mg/dl) [F(3,21)=28,057;  $p < 0,0001$ ] e HDL ( $18,4 \pm 1,3$  mg/dl) [F(3,21)=6,602;  $p = 0,0033$ ] retornaram para os valores dos controle e não foram diferentes do grupo tratado com ketamina ( $42,0 \pm 2,5$ ;  $18,4 \pm 1,1$  mg/dl, respectivamente).

No grupo experimental onde o haloperidol foi associado com etanol (Et+haloperidol-1), nenhuma alteração [F(3,21)=0,1685;  $p = 0,9163$ ] foi observada nos níveis de glicose ( $131,3 \pm 3,2$  mg/dl), quando comparados ao controle ( $129,2 \pm 7,1$  mg/dl), etanol ( $127,6 \pm 4,0$  mg/dl) ou haloperidol ( $126,0 \pm 3,2$  mg/dl). Contudo, os níveis de ALT e AST foram aumentados nos grupos do etanol (53,3%, 38,9%, respectivamente), haloperidol (39%, 37,3%, respectivamente) e Et+haloperidol (58,4%; 58,2%, respectivamente), quando comparados ao controle (**Tabela-9**).

Os níveis de APO A1 foram aumentados [F(3,20)=19,437;  $p < 0,0001$ ] após a administração de haloperidol isolado ( $2,6 \pm 0,24$  mg/dl), contudo quando associado com etanol ( $1,2 \pm 0,16$  mg/dl) esses valores retornaram para os valores do controle ( $0,98 \pm 0,14$  mg/dl) e do etanol ( $1,0 \pm 0,06$  mg/dl). Quanto a APO B, tanto o etanol ( $2,3 \pm 0,31$  mg/dl) quanto o haloperidol ( $2,8 \pm 0,58$  mg/dl) diminuíram os níveis desta apolipoproteína quando comparados ao controle ( $6,6 \pm 1,0$  mg/dl). Contudo, os níveis de APO B voltaram para os níveis do controle após a associação de Et+haloperidol-2 ( $6,4 \pm 0,47$  mg/dl) [F(3,20)=12,544;  $p = 0,0001$ ]. Os níveis de TGI foram aumentados na presença de etanol ( $65,9 \pm 5,6$  mg/dl) ou haloperidol ( $52,6 \pm 4,6$  mg/dl) quando comparados ao controle ( $36,9 \pm 5,1$  mg/dl) [F(3,20)=12,622;  $p = 0,0001$ ]. Entretanto, a associação de Et+haloperidol ( $87,3 \pm 7,6$  mg/dl) intensificou o aumento dos níveis sanguíneos de TGI, quando comparado a controle, etanol ou haloperidol (**Tabela-10**).

Os níveis de COLE-T também foram aumentados após a associação de ET+haloperidol-2 ( $65,2 \pm 5,0$  mg/dl) quando comparados ao grupo controle ( $49,0 \pm 3,9$  mg/dl) e haloperidol ( $34,7 \pm 2,6$  mg/dl) [F(3,21)= 19,159;  $p < 0,0001$ ]. Contudo, não foram diferentes aos valores do grupo tratado somente com etanol ( $72,9 \pm 1,6$  mg/dl). Por outro lado, os valores de HDL não foram alterados após a associação de Et+haloperidol-2 ( $20,8 \pm 0,8$  mg/dl) quando comparados aos grupos controle ( $19,3 \pm 1,8$

mg/dl) e haloperidol ( $18,4 \pm 2,8$  mg/dl) [ $F(3,21)=3,705$ ;  $p=0,0309$ ]. Contudo, a associação (Et+haloperidol-2) bloqueou o aumento de HDL apresentado apenas com etanol ( $26,2 \pm 0,7$  mg/dl) (**Tabela-10**).

A associação de etanol+naltrexona (Et+naltrexona-2) apresentou efeito semelhante nos níveis de glicose, aos observados com a associação de etanol com ketamina ou haloperidol, onde nenhuma alteração foi observada em relação aos grupos controle ( $129,2 \pm 7,1$  mg/dl), etanol ( $127,6 \pm 4,0$  mg/dl) e naltrexona ( $131,6 \pm 5,5$  mg/dl) [ $F(4,28)=117,94$ ;  $p<0,0001$ ]. O aumento nos níveis de ALT causado pelo etanol ( $74,5 \pm 6,5$  U/L) foi revertido pela associação de Et+Naltrexona-2 ( $51,8 \pm 2,9$  U/L), onde os valores ficaram em torno dos animais controles ( $48,6 \pm 2,5$  U/L) e tratados com naltrexona ( $58,5 \pm 2,9$  U/L) [ $F(3,22)=6,462$ ;  $p=0,0030$ ]. Contudo, a associação não alterou os níveis de AST ( $108,1 \pm 4,5$  U/L) quando comparados ao etanol ( $116,1 \pm 7,3$  U/L) e continuou elevada em relação aos grupos controle ( $83,6 \pm 7,0$  U/L) e naltrexona ( $92,0 \pm 3,5$  U/L) [ $F(3,22)=6,472$ ;  $p=0,0033$ ] (**Tabela 11**).

Quanto às apolipoproteínas (**Tabela 12**), nenhuma alteração significativa foi observada nas concentrações de APO A1 [ $F(3,21)=2,036$ ;  $p=0,1449$ ] em relação ao controle ( $0,98 \pm 0,14$  mg/dl) e uma diminuição de APO B [ $F(3,21)=4,864$ ;  $p=0,0119$ ] foi verificada tanto no grupo etanol ( $2,3 \pm 0,31$  mg/dl) ou naltrexona ( $2,8 \pm 0,40$  mg/dl) quanto na associação Et+naltrexona-2 ( $3,4 \pm 1,18$  mg/dl). Os níveis de TGI que foram aumentados na presença de etanol ( $65,9 \pm 5,6$  mg/dl) ou naltrexona ( $76,4 \pm 4,9$  mg/dl), retornaram aos níveis nos animais controle ( $36,9 \pm 5,1$  mg/dl) após a associação de Et+naltrexona-2 ( $36,1 \pm 3,9$  mg/dl) [ $F(3,21)=18,046$ ;  $p<0,0001$ ]. Quanto aos níveis de COLE-T, a associação de Et+naltrexona-2 ( $35,6 \pm 1,5$  mg/dl) manteve os valores em torno do grupo tratado somente com naltrexona ( $30,7 \pm 1,8$  mg/dl) e diminuídos em relação aos grupos controle ( $49,0 \pm 3,9$  mg/dl) e etanol ( $72,9 \pm 1,6$  mg/dl) [ $F(3,22)=52,663$ ;  $p=0,0001$ ]. Por outro lado, esta associação ( $20,7 \pm 1,6$  mg/dl) reverteu o aumento observado apenas com etanol ( $26,2 \pm 0,7$  mg/dl) nos níveis de HDL e os seus valores ficaram em torno daqueles dos animais controle ( $19,3 \pm 1,8$  mg/dl) e tratados com naltrexona ( $18,4 \pm 0,72$  mg/dl) [ $F(3,22)=5,788$ ;  $p=0,0055$ ].

**Tabela 1- Efeitos do etanol (7 d), ketamina ou Et+ketamina-1 sobre os níveis séricos de glicose e enzimas de função hepática em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>Glicose (mg/dl)</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>AST (U/L)</b>
Controle	129,2±7,1(6)	48,6±2,5(5)	83,6±7,0(5)
Etanol 7 d	113,1±5,6(5)	52,2±5,1(5)	103,8±8,3(5)
Ketamina	124,6±4,7(5)	60,0±5,4(5)	84,0±4,3(5)
Et+Keta-1	138,9±3,8(6) <b>b</b>	52,5±2,5(6)	91,5±6,5(6)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o), ketamina (25 mg/kg, i.p.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo Et+ketamina-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com ketamina até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl ou U/L são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **b** (p<0,05) quando comparados ao etanol 7 dias.

**Tabela 2- Efeitos do etanol (7 d), ketamina ou Et+ketamina-1 sobre os níveis séricos de apolipoproteínas e lipoproteínas em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>APO A1</b> (mg/dl)	<b>APO B</b> (mg/dl)	<b>TGI</b> (mg/dl)	<b>COLE-T</b> (mg/dl)	<b>HDL</b> (mg/dl)
Controle	0,98±0,14(5)	6,6±1,0(5)	36,9±5,1(5)	49,0±3,9(6)	19,3±1,8(5)
Etanol 7 d	1,1±0,04(5)	1,3±0,06(5)a	51,8±2,3(5)	52,9±3,1(5)	22,1±1,1(5)
Ketamina	0,62±0,03(5)	2,8±0,2(5) a	56,0±8,8(5)	42,0±2,5(5)	18,4±1,1(6)
Et+keta-1	0,98±0,20(5)	5,5±0,6(5)b,c	68,0±7,2(6)a	55,8±3,8(6)	19,5±2,2(6)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o), ketamina (25 mg/kg, i.p.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo Et+ketamina-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, a partir do 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com ketamina até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a, b e c** (p<0,05) quando comparados ao controle, etanol 7 dias ou ketamina, respectivamente.

**Tabela 3- Efeitos do etanol (7 d), haloperidol ou Et+haloperidol-1 sobre os níveis séricos de glicose e enzimas de função hepática em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>Glicose (mg/dl)</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>AST (U/L)</b>
Controle	129,2±7,1(6)	48,6±2,5(5)	83,6±7,0(5)
Etanol 7 d	113,1±5,6(5)	52,2±5,1(5)	103,8±8,3(5)
Haloperidol	126,0±6,6(5)	67,6±6,7(5)	114,8±5,0(5) <sup>a</sup>
Et+Halo-1	122,8±4,7(5)	51,2±9,1(5)	105,6±3,6(5)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o.), haloperidol (1 mg/kg, i.p.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais da associação Et+halo-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com haloperidol até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl ou U/L são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a** (p<0,05) quando comparados ao controle.

**Tabela 4- Efeitos do etanol (7 d), haloperidol ou Et+haloperidol-1 sobre os níveis séricos de apolipoproteínas e lipoproteínas em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>APO A1</b> (mg/dl)	<b>APO B</b> (mg/dl)	<b>TGI</b> (mg/dl)	<b>COLE-T</b> (mg/dl)	<b>HDL</b> (mg/dl)
Controle	0,98±0,14(5)	6,6±1,0(5)	36,9±5,1(5)	49,0±3,9(6)	19,3±1,8(5)
Etanol 7d	1,1±0,04(5)	1,3±0,06(5) <b>a</b>	51,8± 2,3(5)	52,9± 3,1(5)	22,0±1,1(5)
Halo	2,6±0,24(5) <b>a,b</b>	2,8±0,58(5) <b>a</b>	52,6±4,6(5)	34,7±2,6(5) <b>a,b</b>	18,4±2,8(5)
Et+halo-1	1,8±0,13(5) <b>a,b,c</b>	6,6±0,81(5) <b>b,c</b>	128,3±12,6(8) <b>a,b,c</b>	48,2±4,7(5) <b>c</b>	16,9±2,5(5)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o), haloperidol (1 mg/kg, i.p.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo Et+halo-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com haloperidol até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** (p<0,05) quando comparados ao controle, etanol 7 dias ou haloperidol, respectivamente.

**Tabela 5- Efeitos do etanol (7 d), naltrexona ou Et+naltrexona-1 sobre os níveis séricos de glicose e enzimas de função hepática em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>Glicose (mg/dl)</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>AST (U/L)</b>
Controle	129,2±7,1 (6)	48,6±2,5(5)	83,6±7,0 (5)
Etanol 7 d	113,1±5,6(5)	52,2±5,1(5)	103,8±8,3(5)
Naltrexona	131,6±5,5(6)	58,5±2,9(6)	92±3,5(6)
Et+nalt-1	144,7±4,9(6) <b>b</b>	71,8±4,8(6) <b>a,b,c</b>	112±6,4(6) <b>a</b>

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o), naltrexona (10 mg/kg, v.o.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo Et+naltrexone-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com naltrexona até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl ou U/L são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 7 dias ou naltrexona, respectivamente.

**Tabela 6- Efeitos do etanol (7 d), naltrexona ou Et+naltrexona-1 sobre os níveis séricos de apolipoproteínas e lipoproteínas em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>APO A1</b> (mg/dl)	<b>APO B</b> (mg/dl)	<b>TGI</b> (mg/dl)	<b>COLE-T</b> (mg/dl)	<b>HDL</b> (mg/dl)
Controle	0,98±0,14(5)	6,6±1,0(5)	36,9±5,1(5)	49,0±3,9(6)	19,3±1,8(5)
Etanol 7 d	1,1±0,04(5)	1,3±0,06(5) <b>a</b>	51,85±2,3(5)	52,9±3,1(5)	22,1±1,1(5)
Naltrexona	1,5 ±0,37(6)	2,8±0,40(6) <b>a</b>	76,4±4,9(6) <b>a,b</b>	30,7±1,8(6) <b>a,b</b>	18,4±0,72(6)
Et+Nalt-1	1,6±0,14(6)	6,6±0,4(5) <b>b,c</b>	55,0±10,8(5) <b>c</b>	40,3±1,7(6) <b>a,b,c</b>	17,4±1,7(6)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com etanol (4g/kg, v.o), naltrexona (10 mg/kg, v.o.) ou água destilada (controle) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais do grupo Et+naltrexona-1 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia, no 8<sup>o</sup> dia, o tratamento continuou apenas com naltrexona até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** (p<0,05) quando comparados ao controle, etanol 7 dias ou naltrexona, respectivamente.

**Tabela 7- Efeitos do etanol (14 d), ketamina ou associação de Et+ketamina-2 sobre os níveis séricos de glicose e enzimas de função hepática em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>Glicose (mg/dl)</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>AST (U/L)</b>
Controle	129,2±7,1(6)	48,6±2,5(5)	83,6±7,0(5)
Etanol 14 d	127,6±4,0 (5)	74,5±6,5(6) <b>a</b>	116,1±7,3(6) <b>a</b>
Ketamina	124,6±4,7(5)	60,0±5,4(5)	84,0±4,3(5) <b>b</b>
Et+Keta-2	122,7±4,4(6)	64,1±6,2(6)	121,8±10,2(6) <b>a,c</b>

Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais dos grupos controle (água destilada) e ketamina (25 mg/kg, i.p.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+Keta-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol a ketamina foi administrada e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl ou U/L são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 14 d ou ketamina, respectivamente.

**Tabela 08- Efeitos do etanol (14 d), ketamina ou associação de Et+ketamina-2 sobre os níveis plasmáticos de apolipoproteínas e lipoproteínas em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>APO A1 (mg/dl)</b>	<b>APO B (mg/dl)</b>	<b>TGI (mg/dl)</b>	<b>COLE-T (mg/dl)</b>	<b>HDL (mg/dl)</b>
Controle	0,98±0,14 (5)	6,6±1,0(5)	36,9±5,1(5)	49,0±3,9(6)	19,3±1,8(5)
Etanol 14 d	1,0±0,06(5)	2,3±0,31(5) <b>a</b>	65,9±5,67(5) <b>a</b>	72,9±1,6(5) <b>a</b>	26,2±0,7(5) <b>a</b>
Ketamina	0,62±0,03(5) <b>a,b</b>	2,8±0,2 (5) <b>a</b>	56,0±8,84(5) <b>a</b>	42±2,5(5) <b>b</b>	18,4±1,1(6) <b>b</b>
Et+Keta-2	1,9±0,12(6) <b>a,b,c</b>	20,4±1,3(11) <b>a,b,c</b>	33,7±1,9(6) <b>b,c</b>	40,5±1,8(6) <b>b</b>	18,4±1,3(6) <b>b</b>

Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais dos grupos controle (água destilada) e ketamina (25 mg/kg, i.p.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+Keta-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a ketamina foi administrada e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 14 d ou ketamina, respectivamente.

**Tabela 9- Efeito do etanol (14 d), haloperidol ou associação de Et+haloperidol-2 sobre os níveis séricos de glicose e enzimas de função hepática em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>Glicose (mg/dl)</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>AST (U/L)</b>
Controle	129,2±7,1(6)	48,6±2,5(5)	83,6±7,0(5)
Etanol 14 d	127,6±4,0(5)	74,5±6,5(6) <b>a</b>	116,1±7,3(6) <b>a</b>
Haloperidol	126,0±6,6(5)	67,6±6,7(5) <b>a</b>	114,8±5,0(5) <b>a</b>
Et+Halo-2	131,3±3,2(6)	77,0±4,4(6) <b>a</b>	132,3±0,5(6) <b>a</b>

Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais dos grupos controle (água destilada) e haloperidol (1 mg/kg, i.p.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+halo-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, o haloperidol foi administrada e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl ou U/L são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 14 d ou haloperidol, respectivamente.

**Tabela 10- Efeito do etanol (14 d), haloperidol ou associação de Et+haloperidol-2 sobre os níveis plasmáticos de apolipoproteínas e lipoproteínas em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>APO A1 (mg/dl)</b>	<b>APO B (mg/dl)</b>	<b>TGI (mg/dl)</b>	<b>COLE-T (mg/dl)</b>	<b>HDL (mg/dl)</b>
Controle	0,98±0,14(5)	6,64±1,0 (5)	36,9±5,1 (5)	49,0±3,9 (6)	19,3±1,8 (5)
Etanol 14 d	1,0±0,06(5)	2,3± 0,31(5) <b>a</b>	65,9±5,6(5) <b>a</b>	72,9±1,6(5) <b>a</b>	26,2±0,7(5) <b>a</b>
Haloperidol	2,6±0,24(5) <b>a,b</b>	2,8±0,58(5) <b>a</b>	52,6±4,6(5)	34,7±2,6(5) <b>a,b</b>	18,4±2,8(5) <b>b</b>
Et+Halo-2	1,2±0,16(6) <b>c</b>	6,4±0,47(6) <b>b,c</b>	87,3±7,6(6) <b>a,b,c</b>	65,2±5,0(6) <b>a,c</b>	20,8±0,8(6) <b>b</b>

Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais dos grupos controle (água destilada) e haloperidol (1 mg/kg, i.p.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+Halo-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, o haloperidol foi administrada e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 14 d ou haloperidol, respectivamente.

**Tabela 11- Efeito do etanol (14 d), naltrexona ou associação de Et+naltrexona-2 sobre os níveis plasmáticos de glicose e enzimas de função hepática em ratos**

<b>Grupo</b>	<b>Glicose (mg/dl)</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>AST (U/L)</b>
Controle	129,2±7,1(6)	48,6±2,5(5)	83,6±7,0(5)
Etanol 14 d	127,6±4,0(5)	74,5±6,5 (6) <b>a</b>	116,1±7,3(6) <b>a</b>
Naltrexona	131,6±5,5(6)	58,5±2,9(6) <b>b</b>	92±3,5(6) <b>b</b>
Et+Nalt-2	127,3±6,0(6)	51,8±2,9(6) <b>b</b>	108,1±4,5(6) <b>a</b>

Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais dos grupos controle (água destilada) e naltrexona (10 mg/kg, v.o.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+Nalt-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a naltrexona foi administrada e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl ou U/L são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 14 d ou naltrexona respectivamente.

**Tabela 12- Efeitos do etanol (14 d), naltrexona ou associação de Et+naltrexona-2 sobre os níveis plasmáticos de apolipoproteínas e lipoproteínas em ratos.**

<b>Grupo</b>	<b>APO A1 (mg/dl)</b>	<b>APO B (mg/dl)</b>	<b>TGI (mg/dl)</b>	<b>COLE-T (mg/dl)</b>	<b>HDL (mg/dl)</b>
Controle	0,9±0,14 (5)	6,6±1,0 (5)	36,9±5,1 (5)	49±3,9 (6)	19,3±1,8 (5)
Etanol 14 d	1,0±0,06(5)	2,3±0,3(5) <b>a</b>	65,9±5,67(5) <b>a</b>	72,9±1,6(5) <b>a</b>	26,2±0,7(5) <b>a</b>
Naltrexona	1,5±0,37(6)	2,8±0,4(6) <b>a</b>	76,4±4,9(6) <b>a</b>	30,7±1,8(6) <b>a,b</b>	18,4±0,7(6) <b>b</b>
Et+Nalt-2	0,8±0,16(6)	3,4±1,1(6) <b>a</b>	36,1±3,9(6) <b>b,c</b>	35,6±1,5(6) <b>a,b</b>	20,7±1,6(6) <b>b</b>

Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias com etanol (4g/kg, v.o.) e sacrificados 48 h após a última administração da droga. Os animais dos grupos controle (água destilada) e naltrexona (10 mg/kg, v.o.) foram tratados por 7 dias e na associação Et+Nalt-2 foram tratados com etanol até o 7<sup>o</sup> dia. No 8<sup>o</sup> dia, 1 h antes da administração do etanol, a naltrexona foi administrada e essa associação continuou até o 14<sup>o</sup> dia e, 48 h após a última administração das drogas, o sangue dos animais foi coletado do plexo orbital para análise bioquímica. Os dados em mg/dl são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. **a**, **b** e **c** ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, etanol 14 d ou naltrexona, respectivamente.

## DISCUSSÃO

Analisando os resultados do presente trabalho, podemos observar que o tratamento durante 7 dias com etanol ou ketamina não causou alterações significativas nos níveis sanguíneos de glicose, ALT e AST (Figura 1). Entretanto, aumentando o tempo de tratamento do etanol para 14 dias, foi observado um aumento nos níveis de ALT e AST, sugerindo que o etanol causou uma alteração da função hepática nesses animais. Por outro lado, a administração de ketamina, após a exposição prévia de etanol (Et+ketamina-1), não produziu nenhum efeito nessas enzimas hepáticas. Entretanto, quando essa droga foi associada ao etanol, os níveis de ALT e AST continuaram elevados, mostrando assim que a ketamina não interferiu com esse efeito do etanol (14 d).

O etanol é conhecido por causar lesões hepáticas, que podem ser visualizadas através de alterações enzimáticas hepatocelulares, através da determinação das atividades de AST e ALT (Enomoto et al., 1999). Essas enzimas são marcadores clássicos, pois refletem danos hepatocelulares, sendo que a AST (TGO) se localiza tanto no citosol como na mitocôndria, sua elevação indica lesão mais grave e mais profunda; a ALT (TGP) se localiza somente no citosol, sua elevação indica lesão mais extensa e menos profunda. A relação AST/ALT frequentemente é menor que 1 em pacientes com dano hepatocelular agudo; de outro modo, a relação é alta em doença hepáticas causadas pelo álcool (Cotran et al., 2000).

Quanto à ketamina, não há muitos trabalhos publicados relacionados com lesão hepática em doses subanalgésicas (menor que 50 mg/kg), evidenciada laboratorialmente por alterações das enzimas hepáticas, AST e ALT. Os resultados deste trabalho corroboram os dados obtidos por D'Alleine & Mann (1982) que encontraram elevação dos níveis de ALT até cinco dias com o uso da ketamina, mas com valores dentro da normalidade. A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos inferir que a ketamina sozinha, na dose utilizada (25 mg/kg), não causou danos hepatocelulares e, quando associada ao etanol, não alterou o dano hepatocelular gerado pelo etanol, pois os níveis das transaminases hepáticas obtidos na associação mostraram-se elevados, sugerindo um efeito predominante do etanol.

Vários trabalhos mostram que o uso crônico do etanol parece ter um efeito protetor em doenças coronarianas, decorrente de sua ação que aumenta os níveis de apolipoproteínas APO A1 e colesterol HDL (Kiechl et al., 1998) e diminui os valores de colesterol LDL e APO B (Hein et al., 1996). Neste trabalho, os resultados mostraram que o tratamento com etanol, por 7 dias, não alterou de maneira significativa os níveis de APO A1, TGI, COLE-T e HDL, enquanto uma diminuição de APO B, uma apolipoproteína do LDL (Kveder et al., 1997), foi observada. Por outro lado, os animais tratados com etanol durante 14 dias, apresentaram um aumento significativo nos valores de TGI, COLE-T e HDL, diminuição de APO B e uma ausência de efeito nos níveis de APO A1.

Esses resultados sugerem que o etanol após o tratamento de 14 dias não apresentou um efeito claro de proteção às doenças coronarianas. Embora os níveis de HDL tenham sido elevados com uma diminuição de APO B, efeitos conhecidos como protetores (Kiechl et al., 1998); os níveis de TGI e COLE-T mostraram-se elevados, efeitos deletérios descritos classicamente como aterogênicos (Gotto, 1998). Koppes et al. (2000) encontraram, em um grupo de indivíduos alcoólatras, uma relação positiva entre álcool e níveis elevados de HDL, contudo somente naqueles que ingeriram quantidades moderadas ou elevadas de álcool e o fizeram durante muitos anos. A APO A1 é uma proteína que circula no plasma primariamente como componente de ligação do HDL, sendo essa ligação importante no processo de transporte reverso de colesterol. A deficiência da APO A1 está associada com arteriosclerose prematura. Fan & Watanabe (2000) consideram mais relevante determinar os níveis de APO A1 do que o próprio HDL. A APO A1 é uma variável independente para a doença arterial coronariana (Mahley & Innerarity, 1999)

A ketamina sozinha diminuiu os níveis de APO A1 e APO B e aumentou os níveis de TGI. Contudo, quando a ketamina foi administrada no grupo com exposição anterior ao etanol os níveis de APO A1 e APO B voltaram para os valores dos animais controle e os TGI continuaram elevados. Entretanto, quando essas duas drogas foram administradas associadas, uma potente elevação de APO B foi observada. Assim, esses resultados sugerem que a ketamina apresenta efeitos diferentes quando administrada sozinha (diminuição), em associação (aumento) ou após exposição prévia ao etanol

(ausência de alteração). Embora a observação tenha sido realizada por 14 dias, os níveis de APO B foram bastante elevados, sendo a APO B a apolipoproteína do LDL e participa de muitas funções do LDL, essa observação é relevante no que se refere aos riscos de se associar ketamina e etanol. Pode-se especular que o pequeno aumento nos níveis de APO A1, durante a associação Et+ketamina-2, pode ser uma tentativa de se equilibrar os níveis de lipídios na circulação.

A administração de haloperidol sozinho aumentou os níveis de ALT e AST, contudo a exposição prévia ao etanol impediu o aumento de ALT o qual retornou para os valores dos animais controle. Uma tendência ao aumento ainda foi evidenciado nos níveis de AST no grupo Et+Haloperidol-1. Segundo trabalho realizado por Yoshida et al (1993), a administração de altas doses de haloperidol eleva essas enzimas de função hepática em crianças, após quadro de intoxicação acidental.

Após a administração associada de Et+haloperidol-2, os níveis dessas enzimas continuaram altas, em torno dos valores apresentados pelo grupo do etanol (14 d). Esses resultados sugerem que em animais previamente tratados com etanol esses níveis não ficam diferentes dos animais controle, porém quando administrados associados se elevam, o que pode ser ruim para a terapêutica associada. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de glicose.

A ingestão de alguns fármacos, entre os quais o etanol está incluso, induz o metabolismo hepático de outras drogas, como resultado de uma proliferação do retículo endoplasmático liso de células hepáticas (Katzung, 1998). Assim, a ingestão prolongada de etanol, sem dano hepático, intensifica a biotransformação de outras drogas, por causa do seu mecanismo de indução enzimática, via sistema microsomal hepático – citocromo P-450 (Bloom, 1996). O haloperidol causou uma elevação de AST e ALT quando administrado sozinho, mas quando o etanol foi previamente administrado pode ter ocorrido esse mecanismo, fazendo com que a dose de haloperidol não tenha sido suficiente para produzir o mesmo efeito na elevação das transaminases hepáticas quando comparado ao haloperidol sozinho.

A administração crônica em altas doses de etanol leva a lesões hepáticas (Katzung, 1998). Drogas metabolizadas pelo fígado, após administração prolongada de etanol, deterioram mais ainda o fígado. Desse modo, pode-se sugerir que a associação de etanol com haloperidol-2 produziu níveis de AST e ALT maiores que as duas substâncias administradas sozinhas.

O haloperidol administrado isoladamente apresentou um aumento e diminuição nos níveis de APO A1 e APO B, respectivamente. Esses resultados sugerem que a APO A1 está retirando o colesterol da circulação e levando-o para ser metabolizado no fígado, fato esse confirmado pela diminuição nos níveis de COLE-T na circulação. Por outro lado, quando o haloperidol foi administrado após uma exposição prévia ao etanol, os níveis de APO B e colesterol voltaram para os níveis dos controles e os níveis de APO A1 diminuíram em relação ao grupo tratado somente com haloperidol, porém continuaram elevados em relação ao controle e etanol. De um modo geral, os resultados com o grupo de associação (Et+haloperidol-2) comportaram-se de modo semelhante. Pode-se, também, hipotetizar que, em consequência da indução enzimática, menos haloperidol esteve disponível para produzir seus efeitos benéficos com tais lipoproteínas. Não há relatos na literatura de haloperidol com apolipoproteínas, pois associação de apolipoproteínas e drogas usadas na terapêutica do alcoolismo é recente e, além do mais, o haloperidol é uma droga antiga que vem sendo substituída por drogas recentes nos diversos transtornos psiquiátricos. Saku et al. (1989) concluem em seu trabalho que tanto a clorpromazina como haloperidol não têm ação preventiva na aterosclerose induzida pelo colesterol em coelhos tratados durante 6 e 12 semanas.

No que se refere aos níveis de TGI, neste trabalho, os resultados mostraram uma tendência a elevação dos níveis de TGI tanto no grupo tratado com haloperidol, quanto no grupo do tratamento apenas com etanol. No grupo do haloperidol pré-tratado com etanol, os níveis de TGI foram bastante elevados; enquanto no grupo da associação, Et+haloperidol esses níveis continuaram elevados, embora que em menores valores. Gaulin et al.(1999) encontraram elevação dos TGI séricos em pacientes com clozapina e haloperidol, tendo a clozapina levado a maiores concentrações de TGI séricos que o haloperidol. Van Gent et al. (1991) administraram haloperidol prenatalmente a ratos, encontrando alterações hiperlipêmicas nos filhos na primeira e segunda gerações subsequentes, concluindo que o haloperidol pode induzir alterações permanentes no

metabolismo das lipoproteínas e estes resultados devem ser levados em conta quando o haloperidol for necessário ser administrado em gestantes. Contudo, as alterações produzidas pelos neurolépticos podem ser acompanhadas laboratorialmente, pois as alterações decorrentes do seu uso são transitórias e reverterem aos valores anteriores depois da retirada da droga.

A naltrexona sozinha não apresentou nenhuma alteração nos níveis de glicose e enzimas de função hepática. Os dados deste trabalho concordam com os descritos na literatura (Berg et al., 1996), onde a naltrexona não apresenta hepatotoxicidade em doses recomendadas para o tratamento do alcoolismo (50 mg/dia). Entretanto, foi observada uma elevação de ALT e AST após a retirada do etanol. A naltrexona é bem absorvida após administração oral, mas sofre metabolismo de primeira passagem (Katzung, 1998). Assim sendo, após a administração de etanol por 7 dias e sua retirada, deve-se considerar o processo de indução enzimática, onde a disponibilidade plasmática da naltrexona fica diminuída e, conseqüentemente, as alterações enzimáticas produzidas pelo etanol ficaram evidentes.

Quando a naltrexona foi associada ao etanol, os níveis de AST diminuíram em relação ao etanol sozinho, embora sem significância estatística, e reduziu os níveis ALT. Pode-se sugerir que a naltrexona apresentou um certo efeito protetor, a nível hepático, de lesões decorrentes do uso de etanol. Gual Sole (2001) observou esse efeito protetor da naltrexona, em pacientes com abstinência ao álcool, após tratamento crônico com diminuição dos níveis de enzimas hepáticas, AST e ALT. Contudo, o uso extremamente prolongado e com doses bem mais elevadas para o tratamento do alcoolismo podem causar hepatotoxicidade (Pfohl et al., 1986).

Quanto aos níveis das apolipoproteínas, a naltrexona apresentou uma tendência a aumentar os níveis de APO A1 e diminuiu os níveis de APO B em relação ao grupo controle. Essa tendência a aumento em APO A1 persistiu no grupo Et±naltrexona-1 e desapareceu no Et+naltrexona-2. Já os níveis de APO B somente foram alteradas no grupo da associação, apresentando uma diminuição. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de HDL e um aumento e diminuição de TGI e COLE-T, respectivamente, foram observados após administração de naltrexona. Os níveis de COLE-T

continuaram baixo nos grupo Et+naltrexona-1 e Et+naltrexona-2, e nenhuma alteração foi observada em TGI e HDL em relação ao controle.

Estudos mostram que a naltrexona possui um efeito hipolipêmico (Gual Solé, 2001; Budzynski et al., 2000), cujo mecanismo responsável por esse efeito é desconhecido. Budzynski et al. (2000) avaliaram a influência da naltrexona (50 mg/kg) em indivíduos com dependência ao álcool, durante a fase de retirada, e observaram uma diminuição nos níveis de COLE-T e TGI após 16 semanas da última administração da droga. Esses níveis continuaram diminuídos após 20 semanas e nenhuma alteração direta foi observada nos níveis de HDL. Bryant et al.(1988) observaram elevações nos níveis colesterol induzidas pela morfina, um agonista opióide, e tais efeitos foram revertidos pela naltrexona. Assim sendo, esse efeito hipolipêmico é consistente na literatura, tendo a naltrexona um efeito favorável nos níveis de lipídios plasmáticos.

## CONCLUSÕES

- ✓ Nenhuma alteração importante foi observada nos níveis de glicose após administração de etanol e/ou ketamina, haloperidol ou naltrexona.
- ✓ O etanol aumentou os níveis de AST e ALT de maneira significativa após tratamento de 14 dias. Esse efeito foi observado principalmente com a enzima AST, sugerindo assim que o etanol causou uma lesão mais profunda a nível de mitocôndria nos hepatócitos.
- ✓ O etanol, após 7 dias de tratamento, apenas diminuiu a concentração de APO B. Entretanto, quando o tempo de tratamento foi aumentado para 14 dias, aumentos nas concentrações de TGI, COLE-T e HDL foram observados. Embora tenha sido evidenciado um aumento nos níveis de HDL, esse efeito não pode ser dito cardioprotetor, pois não houve uma alteração de APO-A1, a apolipoproteína do HDL que se liga com o colesterol e é responsável pelo mecanismo de transporte reverso de colesterol.
- ✓ O aumento observado nos níveis de AST, após a administração de Et+ketamina, parece ter sido um efeito próprio do etanol, sem interferência da ketamina, tendo em vista que a ketamina sozinha ou após a exposição prévia ao etanol não apresentou nenhum efeito nessas enzimas hepáticas.
- ✓ A associação de Et+ketamina produziu um elevado aumento nos níveis de APO B, uma apolipoproteína do LDL que participa de muitas funções dessa lipoproteína, essa observação foi relevante no que se refere aos riscos de se associar ketamina e etanol. Sugere-se ainda que o pequeno aumento observado nos níveis de APO A1, durante a associação Et+ketamina-2, pode refletir um mecanismo compensatório para equilibrar os níveis de lipídios na circulação.
- ✓ O haloperidol elevou as concentrações das enzimas hepáticas, enquanto a administração prévia do etanol bloqueou esse efeito. Esse resultado pode ser explicado devido ao um mecanismo de indução enzimática, acelerando o metabolismo do haloperidol. Contudo, quando administrado associado ao etanol,

um grande aumento foi observado a nível de AST, sugerindo que quando foram associadas essas drogas apresentaram um sinergismo.

- ✓ O haloperidol sozinho apresentou um possível efeito cardioprotetor, evidenciado por um aumento em APO A1 e diminuição de APO B e COLE-T. Entretanto, esse efeito diminuiu no grupo com exposição prévia ao etanol, evidenciado por aumento de TGI, e desapareceu durante administração associada com o etanol, mostrado pelo aumento de TGI e COLE-T e ausência de efeito na APO-A1.
- ✓ A naltrexona sozinha não causou nenhuma alteração nos níveis de ALT e AST. Entretanto, elevações de ALT e AST foram evidenciadas após a retirada do etanol, sugerindo que esses aumentos foram uma consequência da indução enzimática causada pelo etanol, onde a disponibilidade plasmática da naltrexona ficou diminuída e, conseqüentemente, as alterações enzimáticas produzidas pelo etanol ficaram evidentes. Por outro lado, na presença do etanol, a naltrexona bloqueou o aumento de ALT e apresentou uma tendência a diminuir os níveis de AST causado pelo etanol.
- ✓ A naltrexona sozinha apresentou um efeito possivelmente cardioprotetor, evidenciado por um aumento em APO A1 e diminuição de APO B e COLE-T. Esse efeito cardioprotetor também foi observado após a exposição prévia ao etanol, demonstrado por aumento de APO A1 e diminuição de COLE-T, e durante administração associada com o etanol, mostrada pela diminuição de APO B, TGI e COLE-T.
- ✓ Em síntese, o etanol causou lesão hepatocelular, evidenciada pela elevação de AST e ALT, sendo esse efeito bloqueado apenas pela naltrexona. Assim, pode-se sugerir que a naltrexona minimiza os efeitos deletérios do etanol no fígado. De modo semelhante, a naltrexona produziu um efeito cardioprotetor, pois elevou os níveis de APO A1 e reduziu os níveis de COLE-T.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Os múltiplos efeitos do etanol no SNC podem ser mediados por alterações na liberação, ligação com receptor, bloqueio ou facilitação da recaptação de um ou mais neurotransmissores. Alguns desses efeitos do etanol podem resultar de uma ação direta nas proteínas de liberação do transmissor ou ação indireta através de mudanças conformacionais das moléculas de lipídios e proteínas que formam a membrana das células.
- ✓ O presente estudo mostrou que a resposta locomotora ao etanol foi dependente da dose e tempo de retirada da droga. Um efeito depressor somente foi observado em altas doses de etanol. Nessas condições, foi evidenciado um aumento de dopamina, noradrenalina e glutamato, bem como uma diminuição de serotonina nos terminais sinápticos, sugerindo que esses neurotransmissores podem interferir com o efeito locomotor diretamente ou através de modulações com neurotransmissores inibitórios, como o GABA.
- ✓ Alterações de monoaminas e seus metabólitos foram observadas na presença de etanol e/ou drogas antagonistas glutamatérgica, dopaminérgica ou opióide, mostrando assim um efeito importante do etanol nesses sistemas, principalmente o dopaminérgico, colocado como o principal neurotransmissor envolvido no processo do reforço.
- ✓ O etanol também afeta a densidade dos receptores D1 e D2-símile. Essa alteração parece ser indireta, devido ao aumento de DA na fenda sináptica causada pelo etanol. Os antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide apresentaram efeitos diferentes, quando administrados após a exposição ao etanol ou associados a essa droga. Esse efeito foi mais evidenciado a nível de receptor D1-símile, com um aumento da afinidade em ambos os protocolos experimentais.
- ✓ As concentrações de AA, principalmente o ASP e GLU, foram aumentadas na presença do etanol. Esse aumento não parece ser dependente da síntese de GLU, desde que a GLN, um AA importante por uma das vias de GLU, não foi alterada. Os antagonistas glutamatérgico, dopaminérgico e opióide quando expostos

previamente ou associados ao etanol também interferiram com os níveis desses AA, mostrando que esse processo é multimediado.

- ✓ A nível bioquímico, o etanol induziu uma alteração de enzimas de função hepática após uso prolongado, onde esse efeito não foi bloqueado por ketamina ou haloperidol. Além do mais, o haloperidol deve ser administrado com cautela, pois de forma semelhante ao etanol elevou essas enzimas. A naltrexona bloqueou o aumento de ALT e diminuiu de maneira não significativa o aumento de AST, podendo ser uma droga útil, pois minimizou os efeitos deletérios do etanol no fígado nos protocolos utilizados
  
- ✓ Em relação às lipoproteínas plasmáticas, dentre todos os antagonistas utilizados neste trabalho, a naltrexona produziu efeito cardioprotetor, pois elevou os níveis de APO A1 e reduziu os níveis de COLE-T, podendo assim ser de grande valia em sua utilização no tratamento do alcoolismo.
  
- ✓ De um modo geral, as ações do etanol são bastante complexas, necessitando de estratégias terapêuticas que contemplem a multiplicidade de neurotransmissores envolvidos. A farmacoterapia para o alcoolismo deve buscar drogas capazes de normalizar ou bloquear a perpetuação dos efeitos deletérios induzidas pelo etanol.

**Quadro 1- Resumo dos efeitos do etanol (0,5, 2 ou 4 g/kg, v.o.) em função do tempo de tratamento (1, 7, 14 ou 30 dias) e de retirada (30 min ou 48 h) sobre os níveis de monoaminas e metabólitos em corpo estriado de ratos**

	DA	DOPAC	HVA	NE	5-HT	5-HIAA
<b>Etanol 0,5 g/kg</b>						
7d/30 min	↑	–	–	–	–	–
7d/48 h	↑	–	–	↑	↓	↓
<b>Etanol 2 g/kg</b>						
7d/48 h	↑	–	–	–	–	–
30d/30 min	↓	–	–	↓	↑	↑
30d/48 h	↓	↓	–	–	↓	↓
<b>Etanol 4 g/kg</b>						
1d/30 min	↑	–	–	–	–	–
1d/48 h	–	–	–	↑	–	–
7d/30 min	↑	↑	–	–	–	↑
7d/48 h	↑	↑	–	↓	–	–
14d/48 h	–	–	–	↑	↓	–
30d/30 min	↓	↓	–	↓	↓	–
30d/48 h	↓	↓	–	–	↓	↓

Símbolos representam: ↑ ou ↓ aumento ou diminuição em relação ao grupo controle quando significativo estatisticamente; – ausência de efeito significativo.

**Quadro 2- Resumo dos efeitos do etanol, ketamina, haloperidol ou naltrexona, sozinhos ou associados em dois protocolos experimentais, sobre os níveis de monoaminas e aminoácidos em corpo estriado de ratos**

	DA	DOPAC	HVA	NE	5-HT	5-HIAA	ASP	GLU	GLN	TIR
<b>Etanol 7d</b>	↑	↑	–	↓	–	–	–	↑	–	–
<b>Etanol 14 d</b>	–	–	–	↑	↓	–	–	–	–	↑ ↑
<b>Ketamina 7 d</b>	↑	–	↓ ↓	↑	↓ ↓	↓ ↓	↑	–	–	–
<b>Haloperidol 7 d</b>	–	↓	↓ ↓	↑	↓	↓	–	↓	–	–
<b>Naltrexona 7 d</b>	–	↓	–	↑	↓ ↓	↓ ↓	↓	↑	–	↓
<b>Protocolo 1</b>										
Et+Ketamina-1	–	–	↓ ↓	↑ ↑	–	–	–	↓	–	–
Et+Haloperidol-1	–	–	↓ ↓	↑	–	–	↓ ↓	↓	–	↓ ↓
Et+Naltrexona-1	–	↓	–	↑	–	–	↓	↓	–	↓ ↓
<b>Protocolo 2</b>										
Et+Ketamina-2	–	↑	–	↑ ↑	–	–	–	–	–	↓ ↓
Et+Haloperidol-2	↑ ↑	↑	–	–	↓	–	↓	–	–	↓
Et+Naltrexona-2	–	–	–	↑ ↑	↓	–	↓	–	–	↓

Símbolos representam: ↑ ou ↓ aumento ou diminuição em relação ao grupo controle; ↑ ou ↓ aumento ou diminuição em relação ao grupo tratado com etanol 4 g/kg; – ausência de efeito significativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B.; MOGHADDAM, B. Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. **J. Neurosci.**, v.18, p.5545-5554, 1998.

ALCOHOL ALERT- Alcohol metabolism, **National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**. N. 35, january 1997. Disponível em: <http://silk.nih.gov/silk/niaaa1/publication/aa35.htm>.

ALCOOLISMO. Disponível em: <<http://www.novaclinica.com.br/drogas>>. Acesso em: 05 de Janeiro de 2001.

ALEXANDER, S.; MATHIE, A.; PETERS, J.A. Dopamine Receptors. **Trends in Pharmacol. Sciences- Nomenclature Supplement**, p. 40-41, 2001.

ALLEN, J.P.; LITTEN, R.Z. Techniques to enhance compliance with disulfiram. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 16, p.1035-1041, 1992.

ALMEIDA, R. Um Cálice de História. Disponível em: <<http://www.softhouse.com.br/nelson/cacha%E7%htm>>. Acesso em: 20 de Março, 2001.

ALTSHULER, H.L.; PHILLIPS, P.; FEINHANDLER, D.A. Alteration of ethanol self-administration by naltrexone. **Life Sci.**, v. 26, p. 679-688, 1980.

ANDERSEN, P.H.; GINGRICH, J.A.; BATES, M.D.; DEARRY, A.; FALARDEAU, P.; SENOGLES, S.E.; CARON, M.G. Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 11, p.231-236, 1990.

BADAWY, A.B.; EWANS, M. Opposite effects of chronic administration and subsequent withdrawal of drugs of dependence on the metabolism and disposition of endogenous and exogenous typtophan in the rat. **Alcohol**, v. 18, p. 369-387, 1983.

BAILEY, C.P.; ANDREWS, N.; MCKNIGHT, A.T.; HUGHES, J.; LITTLE, H.J. Prolonged changes in neurochemistry of dopamine neurons after chronic ethanol consumption. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 66, p. 153-161, 2000.

BAILLEY, D.; SERVANT, D.; BLANDIN, N.; BEUSCART, R.; PARQUET, P.J. Effects of beta-blocking drugs in alcohol withdrawal: a double-blind comparative study with propranolol and diazepam. **Biomed. Pharmacother.**, v. 46, p. 419-429, 1992.

BARAONA, E.; LIEBER, C.S. Effects of alcohol on hepatic transport of proteins. **Annu. Rev. Med.**, v. 33, p. 281-292, 1982.

BAZVAN, A.S.; GETSOVA, V.M.; ORLOVA, N.V. Haloperidol catalepsy consolidation in the rat as a model of neuromodulatory integration. **Neuroscience**, v. 99, p. 139-143, 2000.

- BELL, R.L.; STEWART, R.B.; WOODS, J.E. 2ND; LUMENG, L.; LI, T.K.; MURPHY, J.M.; MCBRIDE, W.J. Responsivity and development of tolerance to the motor impairing effects of moderate doses of ethanol in alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) rat lines. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 25, p. 644-650, 2001.
- BENJAMIN, D.; GRANT, E.R.; POHORECKY, L.A. Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. **Brain Res.**, v. 621, p. 137-140, 1993.
- BERG, B.J.; PETTINATI, H.M.; VOLPICELLI, J.R. A risk-benefit assessment of naltrexone in the treatment of alcohol dependence. **Drug Saf.**, v. 15, p. 274-282, 1996.
- BESRET, L.; PAGE, K.J.; DUNNETT, S.B. The problem of antipsychotic treatment for functional imaging in Huntington's disease: receptor binding, gene expression and locomotor activity after sub-chronic administration and wash-out of haloperidol in the rat. **Brain Research**. v. 853, p. 324-28, 2000.
- BIENKOWSKI, P.; KOSTOWSKI, W.; KOROS, E. The role of drug-paired stimuli in extinction and reinstatement of ethanol-seeking behaviour in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 374, p. 315-319, 1999.
- BLISS, T.V.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, v. 361, p. 31-39, 1993.
- BLOOM, F.E. Neurotransmission and the Central Nervous System. In Hardman J.G. & Limbird, L.E. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9 edition. Ed. McGraw-Hill, p. 267-294, 1996.
- BOONE, E. M.; COOK, M. N. ; HOU, X., JONES, B. C. Sex and strain influence the effect of ethanol on central monoamines. **J. Stud. Alcohol**, v. 58, p. 590-599, 1997.
- BOUTHENET, M.L.; SOUIL, E.; MARTRES, M.P.; SOKOLOFF, P.; GIROS, B.; SCHWARTZ, J.C. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. **Brain Res.**, v. 564, p. 203-219, 1991.
- BRANCHI, A.; ROVELLINI, A.; TOMELLA, C.; SCIARIADA, L.; TORRI, A.; MOLGORA, M. Association of alcohol consumption with HDL subpopulations defined by apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-II content. **Eur J Clin Nutr.**, v. 1997, p. 362-365, 1997.
- BRODIE, M. S.; TRIFUNOVIC, R. D.; SHEFNER, S. A. Serotonin potentiates ethanol-induced excitation of ventral tegmental area neurons in brain slices from three different rat strains. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 273, p. 1139-1146, 1995.
- BRYANT, H.U.; STORY, J.A.; YIM, G.K. Assessment of endogenous opioid mediation in stress-induced hypercholesterolemia in the rat. **Psychosom. Med.**, v. 50, p. 576-585, 1988.
- BUDZYNSKI, J.; RYBAKOWSKI, J.; SWIATKOWSKI, M.; TORLINSKI, L.; KLOPOCKA, M.; KOSMOWSKI, W.; ZIOLKOWSKI, M. Naltrexone exerts a

favourable effect on plasma lipids in abstinent patients with alcohol dependence. **Alcohol Alcohol.**, v. 35, p. 91-97. 2000.

BURKE, D.C. Planning a system of care for head injuries. **Brain Inj.**, v. 1, p. 189-198, 1987.

BUSTOS, G.; ABARCA, J.; FORRAY, M.I.; GYSLING, K.; BRADBERRY, C.W.; ROTH, R.H. Regulation of excitatory amino acid release by N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum: in vivo microdialysis studies. **Brain Res.**, v. 585, p. 105-115, 1992.

CALIL, L.C. **ABC do alcoolismo-Como eu trato nas urgências**. Disponível em: <<http://www.saudevidaonline.com.br>>. Acesso em: 20 de Março. 2001.

CARBONI, S.; ISOLA, R.; GESSA, G.L.; ROSSETTI, Z.L. Ethanol prevents the glutamate release induced by N-methyl-D-aspartate in the rat striatum. **Neurosci. Lett.**, v. 152, p. 133-136, 1993.

CARLSSON, M.; CARLSSON, A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, v. 13, p. 272-276, 1990.

CEBRID- Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. **Epidemiologia do álcool**. Boletim, n. 41, junho 2000. <http://www.epm.br/psico/ed41/14.htm>.

CEPEDA, C.; BUCHWALD, N.A.; LEVINE, M.S. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 9576-9580, 1993.

CHANDLER, L. J.; HARRIS, R. A.; CREWS, F. T. Ethanol tolerance and synaptic plasticity. **TIPS**, v. 19, p. 491-495, 1998.

CHOI, D.W. Excitotoxic cell death. **J. Neurobiol.**, v. 23, p. 1261-1276, 1992.

CIVELLI, O. The neuroreceptors: one key for many locks. **J. Recept. Signal Transduct. Res.**, v. 15, p. 161-172, 1995.

CIVELLI, O.; BUNZOW, J.R.; GRAND, Y.D.K. Molecular diversity of the dopamine receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 33, p. 281-307, 1993

CLÁUDIA-DA-SILVA, T.S. & AMARAL, J.R. Abuso de drogas: Os mecanismos cerebrais do abuso de drogas. **Revista Cérebro e Mente**, v. 3, 1999. Disponível: <<http://www.epub.org.br/cm/n08/doencas/drugs/abuse04.htm>>.

COHEN, C.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. Evidence for the involvement of dopamine receptors in ethanol-induced hyperactivity in mice. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 1099-1108, 1997.

COHEN, C.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. Preferential involvement of D3 versus D2 dopamine receptors in the effects of dopamine receptor ligands on oral ethanol self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v. 140, p. 478-485, 1998.

- COLLINGRIDGE, G.L.; LESTER, R.A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol. Rev.**, v. 41, p. 143-210, 1989.
- CONN, M.P. **Neuroscience in Medicine**. Filadelfia: J.B. Lippincott Company. 1994.
- COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**, 6<sup>th</sup> ed. New York: Oxford University Press. 1991.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional. 6<sup>o</sup> ed. Ed Guanabara Koogan, 2000.
- CREWS, F.T.; MORROW, A.L.; CRISWELL, H.; BREESE, G. Effects of ethanol on ion channels. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 39, p. 283-367, 1996.
- CREWS, F.T.; STECK, J.C.; CHANDLER, L.J.; YU, C.J.; DAY, A. Ethanol, stroke, brain damage, and excitotoxicity. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 59, p. 981-991, 1998.
- CZARNECKA, E.; PIETRZAK, B. The effect of doxepin on the central action of ethanol. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.**, v. 43, p. 471-478, 1991.
- DAHCHOUR, A.; DE WITTE, P. Ethanol and amino acids in the central nervous system: assessment of the pharmacological actions of acamprosate. **Prog. Neurobiol.**, v. 60, p. 343-362, 2000.
- DAÍ, H.; GEBHARDT, K.; CAREY, R.J. Time course effects of MK-801: the relationship between brain neurochemistry and behavior. **Brain Res. Bull.**, v. 36, p. 175-180, 1995.
- DALIA, A.; URETSKY, N.J.; WALLACE, L.J. Dopaminergic agonists administered into the nucleus accumbens: effects on extracellular glutamate and on locomotor activity. **Brain Res.**, v. 788, p. 111-117, 1998.
- D'ALLEINNE, C.P.; MANN, D.D. Evaluation of ketamine/xylazine anesthesia in the guinea pig: toxicological parameters. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 24, p. 410-412, 1982.
- DAVIDSON, M.; SHANLEY, B.; WILCE, P. Increased NMDA-induced excitability during ethanol withdrawal: a behavioural and histological study. **Brain Res.**, v. 674, p. 91-96, 1995.
- DAVIS, W.M.; SMITH, S.G.; WERNER, T.E. Noradrenergic role in the self-administration of ethanol. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 9, p. 369-374, 1978.
- DE CABO, C.; COLADO, M.I.; PUJOL, A.; MARTIN, M.I.; VIVEROS, M.P. Naltrexone administration effects on regional brain monoamines in developing rats. **Brain Res. Bull.**, v. 34, p. 395-406. 1994.
- DE CICCO, L.H.S. Alcoolismo, vício, delírio e morte. Disponível em: <<http://www.saudevidaonline.com.br/alccol.htm>>. Acesso em: 19 de Dezembro 2000.
- DE VRIES, T.J.; TJON TIEN RIL, G.H.; VAN DER LAAN, J.W.; MULDER, A.H.; SCHOFFELMEER, A.N. Chronic exposure to morphine and naltrexone induces

changes in catecholaminergic neurotransmission in rat brain without altering mu-opioid receptor sensitivity. **Life Sci.**, v. 52, p. 1685-1693, 1993.

DE WITTE, P.; DAHCHOUR, A.; QUERTEMONT, E. Acute and chronic alcohol injections increase taurine in the nucleus accumbens. **Alcohol Alcohol Suppl.**, v.2, p. 229-233, 1994.

DEITRICH, R.A.; DUNWIDDIE, T.V.; HARRIS, R.A.; ERWIN, V.G. Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. **Pharmacol. Rev.**, v. 41, p. 489-537, 1989.

DI CHIARA, G. Alcohol and dopamine. **Alcohol world and health research**, v. 21, p. 108-113, 1997.

DI CHIARA, G. In-vivo brain dialysis of neurotransmitters. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 11, p. 116-121, 1990.

DI CHIARA, G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. **Drug Alcohol Depend.**, v. 38, p. 95-137, 1995.

DI CHIARA, G.; ACQUAS, E.; TANDA, G. Ethanol as a neurochemical surrogate of conventional reinforcers: The dopamine-opioid link. **Alcohol**, v. 13, p. 13-17, 1996.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 85, p. 5274-5278, 1988.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Ethanol preferentially stimulates dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 10, p. 115-132, 1985.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 244, p. 1067-1080, 1988.

DIANA, M.; PISTIS, M.; CARBONI, S.; GESSA, G. L.; ROSSETTI, Z. L. Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, p. 7966-7969, 1993.

DODD, P.R.; BECKMANN, A.M.; DAVIDSON, M.S.; WILCE, P.A. Glutamate-mediated transmission, alcohol, and alcoholism. **Neurochemistry Internacional**, v. 37, p. 509-533, 2000.

DOURMAP, N.; CLERO, E.; COSTENTIN, J. Involvement of cholinergic neurons in the release of dopamine elicited by stimulation of mu-opioid receptors in striatum. **Brain Res.**, v. 749, p. 295-300, 1997.

DUDEK, B.C; PHILLIPS, T.J.; HAHN, M.E. Genetic analyses of the biphasic nature of the alcohol dose-response curve. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 15, p. 162-269, 1991.

DUNHAM, N.W. ; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J. Amer. Pharmac. Ass.**, v. 46, p. 208-212, 1957.

EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. **J. Lipid. Res.**, v. 25, p. 1017-1058, 1984.

EISENHOFER, G.; SZABO, G.; HOFFMAN, P. L. Opposite changes in turnover of noradrenaline and dopamine in the CNS of ethanol-dependent mice. **Neuropharmacology**, v. 29, p. 37-45, 1990.

EL-GHUNDI, M.; GEORGE, S.R.; DRAGO, J.; FLETCHER, P.J.; FAN, T.; NGUYEN, T.; LIU, C.; SIBLEY, D.R.; WESTPHAL, H.; O'DOWD, B.F. Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behavior. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 353, p. 149-158, 1998.

ENGBERG, G.; HAJOS, M. Ethanol attenuates the response of locus coeruleus neurons to excitatory amino acid agonists in vivo. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 345, p. 222-226, 1992.

ENOMOTO, N.; YAMASHINA, S.; KONO, H.; SCHEMMER, P.; RIVERA, C.A.; ENOMOTO, A.; NISHIURA, T.; NISHIMURA, T.; BRENNER, D.A.; THURMAN, R.G. Development of a new, simple rat model of early alcohol-induced liver injury based on sensitization of Kupffer cells. **Hepatology**, v. 29, p. 1680-1689, 1999.

FADDA, F.; ROSSETTI, Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Prog. Neurobiol.**, v. 56, p. 385-431, 1998.

FAN J, WATANABE T. Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. **J. Atheroscler. Thromb.**, v. 7, p. 26-32, 2000.

FIEDLER, E.P.; MARKS, M.J.; COLLINS, A.C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. **J. Neurochem.**, v. 49, p. 983-990, 1987.

FIELLIN, D.A.; REID, M.C.; O'CONNOR, P.G. Outpatient management of patients with alcohol problems. **Ann. Intern. Med.**, v. 133, p. 815- 827, 2000.

FRIEDEMANN, M.; GERHARDT, G.A. In vivo electrochemical studies of the effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) on dopamine nerve terminals in the neostriatum of the anesthetized rat. **Proc. West. Pharmacol. Soc.**, v. 32, p. 143-147, 1989.

FUCHS, V.; COPER, H.; ROMMELSPACHER, H. The effect of ethanol and haloperidol on dopamine receptor (D2) density. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 1231-1233, 1987.

GARBUTT, J.C.; WEST, S.L.; CAREY, T.S.; LOHR, K.N.; CREWS, F.T. Pharmacological treatment of alcohol dependence: a review of the evidence. **JAMA**, v. 281, p.1318-1325, 1999.

GATCH, M.B.; LAL, H. Pharmacological treatment of alcoholism. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v. 22, p. 917-944, 1998.

GAULIN, B.D.; MARKOWITZ, J.S.; CALEY, C.F.; NESBITT, L.A.; DUFRESNE, R.L. Clozapine-associated elevation in serum triglycerides. **Am. J. Psychiatry.**, v. 156, p. 1270-2, 1999.

GAW, A.; COWAN, A.R.; O'REILLY, D. St.J.; STEWART, M.J.; SHEPHERD, J. In: **Clinical Biochemistry**, Churchill Livingstone, Inc. New York. 1<sup>st</sup> ed., p. 120-121, 1995.

GEORGE, S.R.; FAN, T.; NG, G.Y.; JUNG, S.Y.; O'DOWD, B.F.; NARANJO, C.A. Low endogenous dopamine function in brain predisposes to high alcohol preference and consumption: reversal by increasing synaptic dopamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 273, p. 373-379, 1995.

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

GEVAERD, M.S.; TAKAHASHI, R.N. Involvement of dopamine receptors on locomotor stimulation and sensitization elicited by the interaction of ethanol and mazindol in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 63, p. 395-399, 1999.

GIL, E.; COLADO, I.; LOPEZ, F.; FERNANDEZ-BRIERA, A.; FERNANDEZ-LOPEZ, A.; CALVO, P. Effects of chronic treatment with ethanol and withdrawal of ethanol on levels of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid in the striatum of the rat. Influence of benzodiazepines, barbiturate and somatostatin. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 1151-1156, 1992.

GILI-MARTIN, E.; FERNANDEZ-BRIERA, A.; CALVO, P. Effects of chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal on [3H]SCH23390 binding to rat striatal membranes. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 101-106, 1997.

GLENNON, R.A.; DUKAT, M. Serotonin receptors and their ligands: a lack of selective agents. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 40, p. 1009-1017, 1995.

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

GONZALES, R.A.; WEISS, F. Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 10663-10671, 1998.

GOTHERT, M.; DUHRSEN, U.; RIECKESMANN, J.M. Ethanol, anaesthetics and other lipophilic drugs preferentially inhibit 5-hydroxytryptamine- and acetylcholine-induced noradrenaline release from sympathetic nerves. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 242, p. 196-209, 1979.

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

GOTTO, A.M. JR. Impact of on coronary artery disease: beyond total cholesterol. Introduction. multiple risk factors. **Am. J. Cardiol.**, v. 82, p. 1-2. 1998.

- GRACE, A.A. Cortical regulation of subcortical dopamine system and its possible relevance to schizophrenia. **J. Neural. Transm.**, v.91, p. 111-134, 1993.
- GRAEFF, F.G. Brain defense system and anxiety. In: BURROWS, G.D.; ROTH, M.; NOYES, Jr, R. (Ed). **Handbook of anxiety**, Amsterdam. Elsevier, v.3p. 307-354, 1990.
- GRANT, K.A.; VALVERIUS, P.; HUDSPITH, M.; TABAKOFF, B. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptors complex. **European Journal of Pharmacology**, v. 176, p. 289-296, 1990.
- GRIFFITHS, R. Cysteine sulphinate (CSA) as an excitatory amino acid transmitter candidate in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, v. 35 ,p. 313-323, 1990.
- GUAL SOLE, A. Naltrexone in the treatment of alcoholism. Clinical evolution, safety and efficacy in a sample of 198 patients. **Med. Clin.**, v. 116, p. 526-532, 2001.
- HAMDI, A.; PRASAD, C. Bidirectional changes in striatal D1-dopamine receptor density during chronic ethanol intake. **Life Sci.**, v. 52, p. 251-257, 1993.
- HARRINGTON, M.A.; ZHONG, P.; GARLOW, S.J.; CIARANELLO, R.D. Molecular biology of serotonin receptors. **J. Clin. Psychiatry.** , v. 53, p. 8-27, 1992.
- HARTUNG, G.H.; FOREYT, J.P.; MITCHELL, R.E.; MITCHELL, J.G.; REEVES, R.S.; GOTTO, A.M. JR. Effect of alcohol intake on high-density lipoprotein cholesterol levels in runners and inactive men. **JAMA**, v. 249,p. 747-750, 1983.
- HEIN, H.O.; SUADICANI, P.; GYNTELBERG, F. Alcohol consumption, serum low density lipoprotein cholesterol concentration, and risk of ischaemic heart disease: six year follow up in the Copenhagen male study. **B.M.J.** v. 321, p. 736-741, 1996.
- HIETALA, J.; SALONEN, I.; LAPPALAINEN, J.; SYVALAHTI, E. Ethanol administration does not alter dopamine D1 and D2 receptor characteristics in rat brain. **Neurosci. Lett.**, v. 108, p. 289-294, 1990.
- HILL, M.P.; BROTCHE, J.M. Modulation of glutamate release by a kappa-opioid receptor agonist in rodent and primate striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 281, p. 1-2, 1995.
- HOBBS, W.R.; RALL, T.W., VERDOORN, T.A. Hypnotics and Sedatives; Ethanol. In Hardman J.G. & Limbird, L.E. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9 edition. Ed. McGraw-Hill, p. 361-398, 1996.
- HOFF, H.F.; GALBATZ, J.W. Isolation, purification and characterization of a lipoprotein containing apo B from the human aorta. **Atherosclerosis**, v. 42, p. 273-297, 1982.
- HOFF, H.F.; GERRITY, R.G.; NATIO, H.K.; DUSEK, D.M. Qualification of apolipoprotein B in aortas of hypercholesterolemic swine. **Lab. Invest.**, v. 48, p. 492-504, 1983.

HOFFMAN, P.L.; GRANT, K.A.; SNELL, L.D.; REINLIB, L.; IORIO, K.; TABAKOFF, B. NMDA receptors : role in ethanol withdrawal seizures. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 654, p. 52-60, 1992.

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

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

HOFFMAN, P.L. Glutamate receptors in alcohol withdrawal-induced neurotoxicity. **Metab. Brain Dis.**, v. 10, p. 73-79, 1993.

HOLLANDER, W. Unified concept of the role of acid mucopolysaccharides and connective tissue proteins in the accumulation of lipids, lipoproteins and calcium in atherosclerotic plaque. **Ex. Mol. Pathol.**, v. 25, p. 106-120, 1976.

HOUDI, A.A.; BARDO, M.T.; VAN LOON, G.R. Opioid mediation of cocaine-induced hyperactivity and reinforcement. **Brain Res.**, v. 497, p. 195-198, 1989.

HRUSKA, R.E. Effect of ethanol administration of striatal D1 and D2 dopamine receptors. **J. Neurochem.**, v. 50, p. 1929-1933, 1988.

HUBBELL, C.L.; CZIRR, S.A.; REID, L.D. Persistence and specificity of small doses of morphine on intake of alcoholic beverages. **Alcohol**, v. 4, p. 149-156, 1987.

HUNT, W.A.; LANDS, W.E. A role for behavioral sensitization in uncontrolled ethanol intake. **Alcohol**, v. 9, p. 327-328, 1992.

HUTTUNEN, P. Microdialysis of extracellular noradrenaline in the hippocampus of the rat after long-term alcohol intake. **Brain Research**, v. 560, p. 225-228, 1991.

HUXTABLE, R.J. Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. **Prog. Neurobiol.**, v. 32, p. 471-533, 1989.

IMPERATO, A.; DICHIARA, G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 239, p. 212-228, 1986.

INOUE, H. Effects of naltrexone on the accumulation of L-3, 4-dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan and on the firing rate induced by acute ethanol administration. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 406, p. 375-380, 2000.

JACKSON, R.; BEAGLEHOLE, R. The relationship between alcohol and coronary heart disease: is there a protective effect. **Curr. Opinion Lipidol.**, v. 4, p. 21-26, 1993.

JACOB, M.S.; ZILM, D.H.; MACLEOD, S.M.; SELLERS, E.M. Propranolol-associated confused states during alcohol withdrawal. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 3, p. 185-187, 1983.

JORGENSEN, H. A.; ANDREASSEN, O. A.; HOLE, K. The relationship between motor effects in rats following acute and chronic haloperidol treatment. **Psychopharmacology**, v. 116, p. 89-92, 1994.

KALLSTROM, L.; WIESEL, F.A.; JOHNSON, A.E. Neurochemical changes in the entopeduncular nucleus and increased oral behavior in rats treated subchronically with clozapine or haloperidol. **Synapse**, v. 34, p. 192-207, 1999.

KALLURI, H.S.; MEHTA, A.K.; TICKU, M.K. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 58, p. 221-224, 1998.

KAPUR, S.; SEEMAN, P. Ketamine has equal affinity for NMDA receptors and the high-affinity state of the dopamine D2 receptor. **Biol. Psychiatry.**, v. 49, p. 954-957, 2001.

KATZUNG, B.G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 7 edition. Ed. Appleton & Lange, p. 372-385, 1998.

KEBABIAN, J.W. & CALNE, D.B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v. 277, p. 93-96, 1979.

KEGELES, L.S.; ABI-DARGHAM, A.; ZEA-PONCE, Y.; RODENHISER-HILL, J.; MANN, J.J.; VAN HEERTUM, R.L.; COOPER, T.B.; CARLSSON, A.; LARUELLE, M. Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. **Biol. Psychiatry.**, v. 48, p. 627-640, 2000.

KEMPF, E.; KEMPF, J.; EBEL, A. Alcohol withdrawal-induced changes in brain biogenic amines in mice: influence of the genotype. **Neurochem. Res.**, v. 15, p. 69-75, 1990.

KENNET, J.; MCGUIRE, L.; WILLIS, S.L.; SCHAIE, K.W. Memorability functions in verbal memory: a longitudinal approach. **Exp. Aging Res.**, v. 26, p. 121-137, 2000.

KESSLER, R.M.; ANSARI, M.S.; DE PAULIS, T.; SCHMIDT, D.E.; CLANTON, J.A.; SMITH, H.E.; MANNING, R.G.; GILLESPIE, D.; EBERT, M.H. High affinity dopamine D2 receptor radioligands. 1. Regional rat brain distribution of iodinated benzamides. **J. Nucl. Med.**, v. 32, p. 1593-15600, 1991.

KIECHL, S.; WILLEIT, J.; RUNGGER, G.; EGGER, G.; OBERHOLLENZER, F.; BONORA, E. Alcohol consumption and atherosclerosis: what is the relation? Prospective results from the Bruneck Study. **Stroke**, v. 29, p. 900-9007, 1998.

KIIANMAA, K.; HOFFMAN, P.L.; TABAKOFF, B. Antagonism of the behavioral effects of ethanol by naltrexone in BALB/c, C57BL/6, and DBA/2 mice. **Psychopharmacology**, v. 79, p. 291-294, 1983.

KIM, M.O.; LEE, Y.K.; CHOI, W.S.; KIM, J.H.; HWANG, S.K.; LEE, B.J.; KANG, S.G.; KIM, K.; BAIK, S.H. Prolonged ethanol intake increases D2 dopamine receptor expression in the rat brain. **Mol. Cells.**, v. 31, p. 682-687, 1997.

KITAI, S.T.; SURMEIER, D.J. Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. **Adv. Neurol.**, v. 60, p.40-52, 1993.

KLATSKY, A.L.; ARMSTRONG, M.A.; FRIEDMAN, G.D. Risk of cardiovascular mortality in alcohol drinkers, ex-drinkers and nondrinkers. **Am. J. Cardiol.**, v. 66, p. 1237-1242, 1990.

KOOB, G. F.; WALL, T. L.; SCHAFER, J. Rapid induction of tolerance to the antipunishment effects of ethanol. **Alcohol**, v. 4, p. 481-484, 1987.

KOOB, G.F.; MALDONADO, R.; STINUS, L. Neural substrates of opiate withdrawal. **Trends Neurosci.**, v. 15, p.186-191, 1992.

KOOB, G.F.; RASSNICK, S.; HEINRICHS, S.; WEISS, F. Alcohol, the reward system and dependence. **EXS**, v. 71, p. 103-114, 1994.

KOPPEL, L.L.; KEMPER, H.C.; POST, G.B.; SNEL, J.; TWISK, J.W. Development and stability of alcohol consumption from adolescence into adulthood: the Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study. **Eur. Addict Res.**, v. 6, p. 183-188, 2000.

KUPFERMANN, I.; KANDEL, E.R.; IVERSEN, S. Motivational and addictive states. In. KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of Neural Science**, 4<sup>o</sup> edition. Ed. McGraw-Hill, p. 998-1013, 2000.

KVEDER, M.; PIFAT, G.; PECAR, S.; SCHARA, M.; RAMOS, P.; ESTERBAUER, H. The interaction of lower alcohols with apoB in spin labeled human plasma low density lipoproteins (LDL). **Chem. Phys. Lipids**, v. 87, p. 125-135, 1997.

LARINI, L.; SALGADO, P.E.T. Compostos voláteis. In Larini, L. **Toxicologia**, p.73-119. 2 edição, ed. Manole. São Paulo. 1997.

LE MARQUAND, D.; PIHL, R. O.; BENKELFAT, C. Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: Clinical evidence. **Biol. Psychiatry**, v. 36, p. 326-337, 1994.

LE MARQUAND, D.; PIHL, R.O.; BENKELF, A.T.C. Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. **Biol. Psychiatry**, v. 36, p. 395-421, 1994.

LEDIG, M.; M'PARIA, J.R.; MANDEL, P. Free amino acids in the brain of ethanol treated rats. **Subst. Alcohol Actions Misuse**, v. 3, p. 25-30, 1982.

LEFF, S.E.; HAMBLIN, M.W.; CREESE, I. Interactions of dopamine agonists with brain D1 receptors labeled by 3H-antagonists. Evidence for the presence of high and low affinity agonist-binding states. **Mol. Pharmacol.**, v. 27, p. 171-183, 1985.

LEITE, P. **Acidentes automobilísticos são oportunidade para tratamento do alcoolismo.** Disponível em: <<http://www.www.graciasdoctor.com.brasil/sections/mental/alcoholism>>. Acesso em: 28 de março de 2001.

LEO, M.A.; KIM, C.I.; LOWE, N., LIEBER, C.S. Interaction of ethanol with  $\beta$ -carotene: Delayed blood clearance and enhanced hepatotoxicity. **Hepatology**, v. 15, p. 883-891, 1992.

LEONE, P.; DI CHIARA. Blockade of D1 receptors by SCH 23390 antagonizes morphine- and amphetamine-induced place preference conditioning. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 135, p. 251-254, 1987.

LESLIE, S.W.; WEAVER, M.S. Sensitivity of NMDA receptors to acute and in utero ethanol exposure. In: Alling, C.; Diamond, I.; Leslie, S.W.; Sun, G.Y.; Wood, W.G. eds. **Alcohol – Cell Membranes and Signal Transduction in Brain**. New York: Plenum Press, p. 97-106, 1993.

LESSOV, C.N.; PHILLIPS, T.J. Duration of sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol in mice. **Psychopharmacology**, v. 135, p. 374-382, 1998.

LEYSEN, J.E.; JANSSEN, P.M.; MEGENS, A.A.; SCHOTTE, A. Risperidone: a novel antipsychotic with balanced serotonin-dopamine antagonism, receptor occupancy profile, and pharmacologic activity. **J. Clin. Psychiatry**, v. 55, p. 5-12, 1994.

LEYTON, M.; YOUNG, S.N.; BLIER, P.; BAKER, G.B.; PIHL, R.O.; BENKELFAT, C. Acute tyrosine depletion and alcohol ingestion in healthy women. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 24, p. 459-464, 2000.

LIEBER, C.S. Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. **Ann. Med.**, v. 26, p. 325-230, 1994.

LIEBER, C.S. Hepatic, metabolic, and nutritional disorders of alcoholism: from pathogenesis to therapy. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 37, p.551-584, 2000.

LIEBER, C.S. Liver diseases by alcohol and hepatitis C: early detection and new insights in pathogenesis lead to improved treatment. **Am. J. Addict.**, v.10,p.:29-50, 2001.

LIEBER, C.S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. **Clin. Chim. Acta.**, v. 257, p. 59-84, 1997.

LILJEQUIST, S.; BERGGREN, U.; ENGEL, J. The effect of catecholamine receptor antagonists on ethanol-induced locomotor stimulation. **J. Neural. Transm.**, v. 50, p. 57-67, 1981.

LINNOILA, M.; MEFFORD, I.; NUTT, D.; ADINOFF, B. NIH conference. Alcohol withdrawal and noradrenergic function. **Ann. Intern. Med.**, v. 107, p. 875-889, 1987.

LOGRANO, D.E.; MATTEO, F.; TRABUCCHI, M.; GOVONI, S.; CAGIANO, R.; LACOMBA, C.; CUOMO, V. Effects of chronic ethanol intake at a low dose on the rat brain dopaminergic system. **Alcohol**, v. 10, p. 45-49, 1993.

LONGONI, R. Notes for ethological studies in the field of psychiatry. **Minerva Psychiatry**, v. 22, p. 57-61, 1981.

- LOVINGER, D.M. 5-HT<sub>3</sub> receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. **Neurochem. Int.**, v. 35, p. 125-130, 1999.
- LOVINGER, D.M. Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 356, p. 267-282, 1997.
- LOVINGER, D.M.; WHITE, G.; WEIGHT, F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. **Science**, v. 243, p. 1721-1724, 1989.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with follin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUCCHI, L.; MORESCO, R.M.; GOVONI, S.; TRABUCCHI, M. Effect of chronic ethanol treatment on dopamine receptor subtypes in rat striatum. **Brain Res.**, v. 449, p. 347-351, 1988.
- LUKAS, S.E.; MENDELSON, J.H. Electroencephalographic activity and plasma ACTH during ethanol-induced euphoria. **Biol. Psychiatry**, v. 23, p. 141-148, 1988.
- LYNESS, W.H.; SMITH, F.L. Influence of dopaminergic and serotonergic neurons on intravenous ethanol self-administration in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 42, p. 187-192, 1992.
- MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia Funcional**. 2<sup>a</sup> ed. Editora Atheneu, São Paulo 2000.
- MAHLEY, R.W. Atherogenic hyperlipoproteinemia: the cellular and molecular biology of plasma lipoproteins altered by dietary and fat cholesterol. **Med. Clin. North. Am.**, v. 66, p. 375-402, 1982.
- MAHLEY, R.W. Atherogenic lipoproteins and coronary artery disease: concepts derived from recent advances in cellular and molecular biology. **Circulation**, v. 72, p. 943-948, 1985.
- MAHLEY, R.W.; INNERARITY, T.L. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 737, p. 197-222, 1983.
- MAHLEY, R.W.; INNERARITY, T.L.; RALL, S.C.; WEISGRABER, K.H. **J. Lipid. Res.**, v. 25, p. 1277-1294, 1984.
- MANEUF, Y.P.; MITCHELL, I.J.; CROSSMAN, A.R.; WOODRUFF, G.N.; BROTHIE, J.M. Functional implications of kappa opioid receptor-mediated modulation of glutamate transmission in the output regions of the basal ganglia in rodent and primate models of Parkinson's disease. **Brain Res.**, v. 683, p. 102-108, 1995.
- MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. **Basic Medical Biochemistry- A Clinical Approach**. Ed. Williams & Wilkins, Pennsylvania-USA, p.602, 1996.
- MATHEWS, R.T.; GERMAN, D.C. Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopaminergic neurons by morphine. **Neuroscience**, v. 11, p. 617-626, 1984.

MATSUZAWA, S.; SUZUKI, T.; MISAWA, M.; NAGASE, H. Roles of 5-HT<sub>3</sub> and opioid receptors in the ethanol-induced place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Life Sci.*, v. 64, p. 241-249, 1999.

MAYO-SMITH M.E. for the American Society of Addiction Medicine Working Group for Practice Guideline on Pharmacology Management of Alcohol Withdrawal. Pharmacological management of alcohol withdrawal: a meta-analysis and evidence-based practice guideline. *JAMA*. v. 278, p. 144-151, 1997.

MCBRIDE, W. J.; BODART, B.; LUMENG, L.; LI, T. K. Association between low contents of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens and high alcohol preference. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 19, p. 1420-1422, 1995.

MELTZER, H.Y.; MATSUBARA, S.; LEE, J.C. The ratios of serotonin<sub>2</sub> and dopamine<sub>2</sub> affinities differentiate atypical and typical antipsychotic drugs. *Psychopharmacol. Bull.*, v. 25, p. 390-392, 1989.

MILLER, D.W.; ABERCROMBIE, E.D. Effects of MK-801 on spontaneous and amphetamine-stimulated dopamine release in striatum measured with in vivo microdialysis in awake rats. *Brain Res. Bull.*, v. 40, p. 57-62, 1996.

MIQUEL, M.; CORREA, M.; SANCHIS-SEGURA, C.; ARAGON, C.M. The ethanol-induced open-field activity in rodents treated with isethionic acid, a central metabolite of taurine. *Life Sci.*, v. 64, p. 1613-1621, 1999.

MIROVSKY, Y.; YU, Y. L.; WAGNER, G. C. SEKOWSKI, A.; GOLDBERG, M.; FISHER, H. Novel synergistic treatment of ethanol withdrawal seizures in rats with dopamine and serotonin agonists. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 19, p. 160-163, 1995.

MITHANI, S.; MARTIN-IVERSON, M.T.; PHILLIPS, A.G.; FIBIGER, H.C. The effects of haloperidol on amphetamine- and methylphenidate-induced conditioned place preferences and locomotor activity. *Psychopharmacology*, v. 90, p. 247-252, 1986.

MOGHADDAM, B.; ADAMS, B.W. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science*, v. 281, p. 1349-1352, 1998.

MOGHADDAM, B.; BOLINAO, M.L. Biphasic effect of ethanol on extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus and the nucleus accumbens. *Neurosci Lett.*, v. 178, p. 99-102, 1994.

MORARI, M.; O'CONNOR, W.T.; UNGERSTEDT, U.; BIANCHI, C.; FUXE, K. Functional neuroanatomy of the nigrostriatal and striatonigral pathways as studied with dual probe microdialysis in the awake rat--II. Evidence for striatal N-methyl-D-aspartate receptor regulation of striatonigral GABAergic transmission and motor function. *Neuroscience*, v. 72, p. 98-97, 1996.

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

MOTTA, V.T. *Bioquímica Clínica- Métodos e Interpretações*. 2<sup>o</sup> ed. Ed. Médica Missau. Porto Alegre, 1989.

MURPHY, J.M.; CUNNINGHAM, S.D.; MCBRIDE, W.J. Effects of 250 mg% ethanol on monoamine and amino acid release from rat striatal slices. **Brain Res. Bull.**, v. 14, p. 439-442, 1985.

NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science**, v. 258, p. 597-603, 1992.

NARANJO, C. A.; SELLERS, E. M. Serotonin uptake inhibitors attenuate ethanol intake in problem drinkers. **Recent Dev. Alcohol**, v. 7, p. 255-266, 1989.

NEVO, I.; HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. **Neurochem. Int.**, v. 26, p. 337-342, 1995.

NG, G.Y.; GEORGE, S.R. Dopamine receptor agonist reduces ethanol self-administration in the ethanol-preferring C57BL/6J inbred mouse. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 169, p. 365-374, 1994.

NICHOLLS, D. Amino acids as neurotransmitters. In: Nicholls, D., ed. **Proteins, Transmitters and Synapses**. Cambridge: Blackwell Science, p. 155-185. 1994.

NIE, Z.; MADAMBA, S.G.; SIGGINS, G.R. Ethanol inhibits glutamatergic neurotransmission in nucleus accumbens neurons by multiple mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 271, p. 1566-1573, 1994.

NISHIMURA, M.; SATO, K. Ketamine stereoselectively inhibits rat dopamine transporter. **Neurosci. Lett.**, v. 274, p. 131-134, 1999.

O'BRIEN, C. P.; ECKARDT, M. J.; LINNOILA, V. M. I. Pharmacotherapy of alcoholism. In F. E. Bloom & D. J. Kupfer (Eds.), **Psychopharmacology: The fourth generation of progress** New York: Raven Press. p.1745-1755, 1995.

O'BRIEN, C. P. Dependência e uso abusivo de drogas. In Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W.; Gilman, A.G. **Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da terapêutica**. 9 edição. Ed McGraw Hill, p. 405-420, 1996.

OGREN, S.O.; FERRE, S.; SCHWARCZ, R.; FUXE, K. Prolonged treatment with haloperidol and clozapine in the rat: differential effects on spontaneous and theophylline-induced motor activity. **Neurosci. Lett.**, v. 232, p. 21-24, 1997.

OLIVEIRA, I.R.; PEREIRA, E.L. Farmacologia do álcool etílico. Tratamento farmacológico do alcoolismo. In: Silva, P. **Farmacologia**, 4<sup>o</sup> ed., Ed. Guanabara Koogan, p. 60, 1994.

O'NEILL, M.F.; SHAW, G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D1 agonist C-APB in mice. **Psychopharmacology**, v. 145, p. 237-250, 1999.

PELLEGRINO, S.M.; DRUSE, M.J. The effects of chronic ethanol consumption on the mesolimbic and nigrostriatal dopamine systems. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 16, p. 275-280, 1992.

PFOHL, D.N.; ALLEN, J.I.; ATKINSON, R.L.; KNOPMAN, D.S.; MALCOLM, R.J.;

MITCHELL, J.E.; MORLEY, J.E. Naltrexone hydrochloride (Trexan): a review of serum transaminase elevations at high dosage. **NIDA Res. Monogr.**, v. 67, p. 66-72, 1986.

PHILLIPS, T.J.; HUSON, M.; GWIAZDON, C.; BURKHART-KASCH, S.; SHEN, E.H. Effects of acute and repeated ethanol exposures on the locomotor activity of BXD recombinant inbred mice. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 19, p. 269-279, 1995.

PHILLIPS, T.J.; SHEN, E.H. Neurochemical bases of locomotion and ethanol stimulant effects. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 39, p. 243-282, 1996.

PISTIS, M.; MUNTONI, A.L.; GESSA, G. DIANA, M. Effects of acute, chronic ethanol and withdrawal on dorsal raphe neurons: electrophysiological studies. **Neuroscience**, v. 79, p. 171-176, 1997.

PLANETA, C.S.; DELUCIA, R.; AIZENSTEIN, M.L.; The behavioral sensitization induced by fencamfamine is not related to plasma drug levels. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 667-670, 1995.

POTSCHKA, H.; FEDROWITZ, M.; LOSCHER, W. Effects of the NMDA receptor antagonist D-CPPene on extracellular levels of dopamine and dopamine and serotonin metabolites in striatum of kindled and non-kindled rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 374, p. 175-187, 1999.

PREEDY, V.R.; RICHARDSON, P.J. Alcoholic cardiomyopathy: clinical and experimental pathological changes. **Herz**, v. 21, p. 241-247, 1996.

PUCHOIS, P.; GHALIM, N.; ZYLBERBERG, G.; FIEVET, P.; DEMARQUILLY, C.; FRUCHART, J.C. Effects of alcohol intake on human apolipoprotein A-I containing lipoprotein subfractions. **Arch Intern Med.**, v. 150, p. 1638-1672, 1990.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4 ed. Ed. Guanabara Koogan, p.515-528, 2001.

RAO, T.S.; CLER, J.A.; MICK, S.J.; IYENGAR, S.; WOOD, P.L. Polyamines modulate events mediated by the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex through an ifenprodil-insensitive pathway: in vivo measurements of cyclic GMP in the cerebellum. **Neuropharmacology**, v. 30, p. 567-573, 1991.

REID, L.D.; HUNTER, G.A. Morphine and naloxone modulate intake of ethanol. **Alcohol**, v. 1, p. 33-37, 1984.

RIAZ, A.; FAINGOLD, C.L. Seizures during ethanol withdrawal are blocked by focal microinjection of excitant amino acid antagonists into the inferior colliculus and pontine reticular formation. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 18, p. 1456-1462, 1994.

RICHARDSON, P.J.; WODAK, A.D.; ATKINSON, L.; SAUNDERS, J.B.; JEWITT, D.E. Relation between alcohol intake, myocardial enzyme activity, and myocardial function in dilated cardiomyopathy. Evidence for the concept of alcohol induced heart muscle disease. **Br. Heart J.**, v. 56, p. 165-170, 1986.

RILKE, O.; MAY, T.; OEHLER, J.; WOLFFGRAMM, J. Influences of housing conditions and ethanol intake on binding characteristics of D2, 5-HT1A, and benzodiazepine receptors of rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 52, p. 23-28, 1995.

RIMM, E.B.; WILLIAMS, P; FOSHER, K.; CRIQUI, M.; STAMPFER, M.J. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. **British Medical Journal**, v. 319, p. 1523-1528, 1999.

RISINGER, F.O.; CUNNINGHAM, C.L. Ethanol produces rapid biphasic hedonic effects. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 654, p. 506-508, 1992.

RITCHIE, J.M. *Álcohol Alifáticos*. In Gilman, A.G.; Goodman, L.S.; Rall, T.W.; Murad, F. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 7 edição. Ed Guanabara Koogan, p. 244-253, 1987.

ROBERT, A.J.; LESSOV, C.N.; PHILLIPS, T.J. Critical role for glucocorticoid receptors in stress- and ethanol- induced locomotor sensitization. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 275, p. 790-797, 1995.

ROSSETTI, Z.L.; CARBONI, S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 283, p. 177-183, 1995.

ROSSETTI, Z.L.; CARBONI, S.; FADDA, F. Glutamate-induced increase of extracellular glutamate through N-methyl-D-aspartate receptors in ethanol withdrawal. **Neuroscience**, v. 93, p. 1135-1140, 1999.

ROSSETTI, Z.L.; LONGU, G.; MERCURO, G.; HMAIDAN, Y.; GESSA, G.L. Biphasic effect of ethanol on noradrenaline release in the frontal cortex of awake rats. **Alcohol Alcohol**, v. 27, p. 477-480, 1992.

RUBIN, E.; URBANO-MARQUEZ, A. Alcoholic cardiomyopathy. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 18, p. 111-114, 1994.

RUPNIAK, N.M.J.; HALL, M.D. KELLY, E. Mesolimbic dopamine function are not altered during continuous chronic treatment of rats with typical or atypical neuroleptic drugs. **J. Neural Transm.**, v. 62, p. 249-266, 1985.

RUSSELL, R.N.; MCBRIDE, W.J.; LUMENG, L.; LI, T.K.; MURPHY, J.M. Apomorphine and 7-OH DPAT reduce ethanol intake of P and HAD rats. **Alcohol**, v. 13, p. 515-519, 1996.

SAKU, K.; SASAKI, J.; ARAKAWA, K. Lack of effect of chlorpromazine and haloperidol on serum lipid levels and on atherogenesis in cholesterol fed rabbits. **Artery**, v.16, p.151-158, 1989.

SANDERS-BUSH, E.; CANTON, H. Serotonin receptors. Signal transduction pathways. In. BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J. (Ed.). **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. New York: Raven Press, 1995. p. 431-441.

SAUTEL, F.; GRIFFON, N.; LEVESQUE, D.; PILON, C.; SCHWARTZ, J.C.; SOKOLOFF, P. A functional test identifies dopamine agonists selective for D3 versus D2 receptors. **Neuroreport.**, v. 26, p. 329-332, 1995.

SCHALLERT, T. & JONES, T.A. "Exuberant" neuronal growth after brain damage in adult rats: The essential role of behavioral experience. **Journal of Neural Transplantation & Plasticity**, v. 4, p. 193-198, 1993.

SCHUCKIT, M.A. Reactions to alcohol in sons of alcoholics and controls. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 12, p. 465-470, 1988.

SCHULZ, K.P.; MCKAY, K.E.; NEWCORN, J.H.; SHARMA, V.; GABRIEL, S.; HALPERIN, J.M. Serotonin function and risk for alcoholism in boys with attention-deficit hyperactivity disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 18, p. 10-17, 1998.

SCHUMAN, E.M.; MADISON, D.V. Communication of synaptic potentiation between synapses of the hippocampus. **Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.**, v. 29, p. 507-520, 1994.

SEEMAN, P.; VAN TOL, H.H. Dopamine receptor pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 15, p. 264-270, 1994.

SELIM, M.; BRADBERRY, C.W. Effect of ethanol on extracellular 5-HT and glutamate in the nucleus accumbens and prefrontal cortex: comparison between the Lewis and Fischer 344 rat strains. **Brain Res.**, v. 716, p. 157-164, 1996.

SEPULVEDA, C.; BUSTOS, G.; GYSLING, K.; SEGUEL, M.; LABARCA, R. Effects of in vitro ethanol and chronic ethanol consumption on the release of excitatory amino acids in the rat hippocampus. **Brain Res.**, v. 674, p. 104-106, 1995.

SERSHEN, H.; HASHIM, A.; LAJTHA, A. Ibogaine and cocaine abuse: pharmacological interactions at dopamine and serotonin receptors. **Brain Res. Bull.**, v. 42, p. 161-168, 1997.

SERSHEN, H.; HASHIM, A.; LAJTHA, A. Serotonin-mediated striatal dopamine release involves the dopamine uptake site and the serotonin receptor. **Brain Res. Bull.**, v. 53, p. 353-357, 2000.

SHAW, G.K.; MAJUMDAR, S.K.; WALLER, S.; MACGARVIE, J.; DUNN, G. Tiapride in the long-term management of alcoholics of anxious or depressive temperament. **Br. J. Psychiatry**, v. 150, p. 164-168, 1987.

SHAW, G.K.; WALLER, S.; MAJUMDAR, S.K.; ALBERTS, J.L.; LATHAM, C.J.; DUNN, G. Tiapride in the prevention of relapse in recently detoxified alcoholics. **Br. J. Psychiatry**, v. 165, p. 515-523, 1994.

SHIIGI, Y.; CASEY, D.E. Behavioral effects of ketamine, an NMDA glutamatergic antagonist, in non-human primates. **Psychopharmacology**, v. 146, p. 67-72, 1999.

SHIMADA, M.; MURAYAMA, N.; NAGATA, K.; HASHIMOTO, H.; ISHIKAWA, H.; YAMAZOE, Y. A specific loss of growth hormone abolished sex-dependent expression of hepatic cytochrome P450 in dwarf rats: reversal of the profiles by growth hormone-treatment. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 337, p. 34-42, 1997.

SIEGEL, S.J.; BROSE, N.; JANSSEN, W.G.; GASIC, G.P.; JAHN, R.; HEINEMANN, S.F.; MORRISON, J.H. Regional, cellular, and ultrastructural distribution of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in monkey hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 18, p. 564-568, 1994.

SILVESTRE, J.S.; O'NEILL, M.F.; FERNANDEZ, A.G.; PALACIOS, J.M. Effects of a range of dopamine receptor agonists and antagonists on ethanol intake in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 318, p. 257-264, 1996.

SIMSON, P.E.; CRISWELL, H.E.; BREESE, G.R. Inhibition of NMDA-evoked electrophysiological activity by ethanol in selected brain regions: evidence for ethanol-sensitive and ethanol-insensitive NMDA-evoked responses. **Brain Res.**, v. 607, p. 9-16, 1993.

SOKOLOFF, P.; GIROSM B.; MARTRESM M.P.; BOUTHENET, M.L.; SCHWARTZ, J.C.; WATTS, V.J.; LAWLER, C.P.; GONZALES, A.J.; ZHOU, Q.Y.; CIVELLI, O.; NICHOLS, D.E.; MAILMAN, R.B. Spare receptors and intrinsic activity: studies with D1 dopamine receptor agonists. **Synapse**, v. 21, p. 177-187. 1995.

SOUZA-FORMIGONI, M.L.; DE LUCCA, E.M.; HIPOLIDE, D.C.; ENNS, S.C.; OLIVEIRA, M.G.; NOBREGA, J.N. Sensitization to ethanol's stimulant effect is associated with region-specific increases in brain D2 receptor binding. **Psychopharmacology**, v. 146, p. 262-267, 1999.

SPANAGEL, R.; HERZ, A.; SHIPPENBERG, T.S. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 89, p. 2046-2050, 1992.

SPANAGEL, R.; MONTKOWSKI, A.; ALLINGHAM, K.; STOHR, T.; SHOAIB, M.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v. 122, p. 369-373, 1995.

SRINIVASAN, S.R.; YOST, C.; RADHAKRISHNAMURTHY, B.; DALFERES, E.R. JR.; BERENSON, G.S. Lipoprotein elastin interactions in human aorta fibrous plaque lesions. **Atherosclerosis**, v. 38, p. 137-148, 1981.

STAHL, S.M. Selecting an antidepressant by using mechanism of action to enhance efficacy and avoid side effects. **J. Clin. Psychiatry**, v. 18, p. 23-29, 1998.

SUZUKI, T. Global environment and health – with emphasis on world nutritional status. **Nippon. Giseigaku Zasshi**, v. 48, p. 893-903, 1993.

SWERDLOW, N.R.; GILBERT, D.; KOOB, G. Conditioned drug effects on spatial preference: critical evaluation. In: **Neuromethods-Psychopharmacology** (BOULTON, A.A.; BAKER, G.B.; GREENSHAW, A.J., eds.). Humana, Clinton, N.J., 1987.

SYVALAHTI, E.K.; HIETALA, J.; ROYTTA, M.; GRONROOS, J. Decrease in the number of rat brain dopamine and muscarinic receptors after chronic alcohol intake. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 62, p. 210-216, 1988.

TARAZI, F.I.; KULA, N.S.; BALDESSARINI, R.J. Regional distribution of dopamine D4 receptors in rat forebrain. **Neuroreport.**, v.8, p. 3423-3426, 1997.

TERAI, M.; HIDAKA, K.; NAKAMURA, Y. Comparison of [3H]YM-09151-2 with [3H]spiperone and [3H]raclopride for dopamine d-2 receptor binding to rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 173, p. 177-182, 1989.

TIESTZ, N. W. **Fundamentals of clinical chemistry.** W. B. Sanders CO, Philadelphia. 1970.

TONKS, D. B. Quality control in clinical laboratories, diagnostic reagents. Division, Ontario. 1970.

TORK, I. Anatomy of the serotonergic system. **Ann .N .Y. Acad. Sci.**, v. 600, p. 9- 34, 1990.

TRUDEAU, L.E.; ARAGON, C.M.; AMIT, Z. Involvement of endogenous opioid mechanisms in the interaction between stress and ethanol. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 425-429, 1991.

TRUJILLO, K.A.; AKIL, H. Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. **Drug. Alcohol Depend.**, v. 38, p. 139-154, 1995.

TSAI, G.; GASTFRIEND, D.R.; COYLE, J.T. The glutamatergic basis of human alcoholism. **Am. J. Psychiatry**, v. 152, p. 332-340, 1995.

UNTERWALD, E.M.; TSUKADA, H.; KAKIUCHI, T.; KOSUGI, T.; NISHIYAMA, S.; KREEK, M.J. Use of positron emission tomography to measure the effects of nalmefene on D1 and D2 dopamine receptors in rat brain. **Brain Res.**, v. 775, p. 183-188, 1997.

UZBAY, I.T.; USANMAZ, S.E.; TAPANYIGIT, E.E.; AYNACIOGLU, S.; AKARSU, E.S. Dopaminergic and serotonergic alterations in the rat brain during ethanol withdrawal: association with behavioral signs. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 53, p. 39-47, 1998.

VAILLANT, G.E. **A história natural do alcoolismo revisitada.** 1<sup>a</sup> edição. Editora Artes Médicas Sul. São Paulo. 1999.

VAN GENT, C.M.; SANDBERG, L.B.; BOUCEK, R.J. Haloperidol administration to rats during pregnancy induces permanent alterations in serum lipoprotein patterns of progeny. **J. Clin. Psychopharmacol.** v.11, p.113-115, 1991.

VARKOV, A. I.; MALIKOVA, L. A. Catecholamine content of the rat brain at different stages of experimental alcoholism. **Biull. Eksp. Biol. Med.**, v. 99, p. 316-317, 1985.

VEKOVISCHEVA, O.Y.; HAAPALINNA, A.; NAKKI, R.; SARVIHARJU, M.; HONKANEN, A.; HEIKKILA, J.; KORPI, E.R. Enhanced locomotor stimulation by

NMDA receptor antagonists in alcohol-sensitive ANT rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 67, p. 793-799, 2000.

VICTOR, N. Diagnosis and treatment of alcohol withdrawal states. **Practical gastroenterol.**, v. 7, p.6-15, 1983.

VIVEROS, M.P.; DE CABO, C.; COLADO, M.I.; MARTIN, M.I. Naltrexone administration during the preweanling period affects striatal and hypothalamic serotonergic systems, but not midbrain serotonergic or striatal dopaminergic systems in the adult rat. **Neurosci. Lett.**, v. 201, p. 195-198, 1995.

WANG, Y.; HUANG, C.; CAO, Y.; HAN, J.S. Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. **Life Sci.**, v. 8, p. 261-267, 2000.

WATERS, N. LUNDGREN, C. HANSSON, L.O. CARLSSON, M.L. Concurrent locomotor stimulation and decrease in dopamine release in rats and mice after treatment with the competitive NMDA receptor antagonists D-CPPene and CGS 19755. **J. Neural Transm.**, v. 103, p. 117-129, 1996.

WEDZONY, K.; CZYRAK, A.; MACKOWIAK, M.; FIJAL, K. The impact of a competitive and a non-competitive NMDA receptor antagonist on dopaminergic neurotransmission in the rat ventral tegmental area and substantia nigra. **Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.**, v. 353, p. 517-527, 1996.

WEISS, F.; MITCHNER, M.; BLOOM, F.E.; KOOB, G.F. Free-choice responding for ethanol versus water in alcohol preferring (P) and unselected Wistar rats is differentially modified by naloxone, bromocriptine, and methysergide. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 178-186, 1990.

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

WESTERINK, B.H.; KAWAHARA, Y.; DE BOER, P.; GEELS, C.; DE VRIES, J.B.; WIKSTROM, H.V.; VAN KALKEREN, A.; VAN VLIET, B.; KRUSE, C.G.; LONG, S.K. Antipsychotic drugs classified by their effects on the release of dopamine and noradrenaline in the prefrontal cortex and striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 412, p. 127-138, 2001.

WHITTON, P.S.; BIGGS, C.S.; PEARCE, B.R.; FOWLER, L.J. MK-801 increases extracellular 5-hydroxytryptamine in rat hippocampus and striatum in vivo. **J. Neurochem.**, v. 58, p. 1573-1575, 1992.

WIDDOWSON, P.S.; HOLMAN, R.B. Ethanol-induced increase in endogenous dopamine release may involve endogenous opiates. **J. Neurochem.**, v. 59, p. 157-163, 1992.

WISE, R.A. & LEEB, K. Psychomotor-stimulant sensitization: a unitary phenomenon? **Behav. Pharmacol.**, v. 4, p. 339-349, 1993.

WOLFFGRAMM, J.; ROMMELSPACHER, H.; BUCK, E. Ethanol reduces tolerance, sensitization, and up-regulation of D2-receptors after subchronic haloperidol. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 36, p. 907-914, 1990.

WOODWARD, J.J.; GONZALES, R.A. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated endogenous dopamine release from rat striatal slices: reversal by glycine. **J. Neurochem.**, v. 54, p. 712-715, 1990.

YAMAMOTO, B.K.; DAVY, S. Dopaminergic modulation of glutamate release in striatum as measured by microdialysis. **J. Neurochem.**, v. 58, p. 1736-1742, 1992.

YAMAMOTO, Y.; NAKANISHI, H.; TAKAI, N.; SHIMAZOE, T.; WATANABE, S.; KITA, H. Expression of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation in the neostriatal neurons in an in vitro slice after ethanol withdrawal of the rat. **Neuroscience**, v. 91, p.59-60, 1999.

YOSHIDA, I.; SAKAGUCHI, Y.; MATSUIISHI, T.; YANO, E.; YAMASHITA, Y.; HAYATA, S.; HITOSHI, T.; YAMASHITA, F. Acute accidental overdose of haloperidol in children. **Acta. Paediatr.**, v. 82, p. 877-880, 1993.

YOUNG, A.M.; BRADFORD, H.F. N-methyl-D-aspartate releases excitatory amino acids in rat corpus striatum in vivo. **J. Neurochem.**, v. 56, p. 1677-1683, 1991.

ZALESKI, M.J.; 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**, v. 153, p. 415-424, 2001.

ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. **Fundamental Neuroscience**. Ed. Academic Press. California-USA, 1999.