

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

*“Inibição da Sintase do Óxido Nítrico no Núcleo Dorsal da Rafe sobre o efeito ansiogênico induzido pela abstinência do etanol em ratos”.*

Melissa Resende Batistela

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Ciências, Área de concentração: Psicobiologia.

Ribeirão Preto-SP  
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

*“Inibição da Sintase do Óxido Nítrico no Núcleo Dorsal da Rafe sobre o efeito ansiogênico induzido pela abstinência do etanol em ratos”.*

Melissa Resende Batistela  
Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Ciências, Área de concentração: Psicobiologia.

Ribeirão Preto-SP  
2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Batistela, Melissa Resende**

Inibição da Sintase do Óxido Nítrico no Núcleo Dorsal da Rafe sobre o efeito ansiogênico induzido pela abstinência do etanol em ratos. Ribeirão Preto – 2009. 60 p. : il. ; 30cm.

Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

1. Ansiedade. 2. Abstinência de etanol. 3. Etanol. 4. Núcleo Dorsal da Rafe. 5. óxido nítrico. 6. Labirinto em Cruz

***DEDICATÓRIA***

***À minha família.***

***Pelo amor, carinho, cuidado, compreensão, amizade.***

***E à minha querida e amada Sasha.***

## ***AGRADECIMENTOS***

*À profa Cláudia Maria Padovan, por ter me aceito em seu laboratório.  
Aos meus amigos de laboratório, Paulo, Diego Henrique, Gustavo, Selma,  
Natália, Mayra, Mariana e Diego Padovam, vou sentir saudade de todos.  
Em especial a minha amiga e companheira Aline, pela ajuda, conversas e risadas.  
À banca examinadora, pelo tempo dedicado a essa dissertação.  
À Capes, pelo apoio financeiro.*

## *ÍNDICE*

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>I- RESUMO.....</b>	<b>8</b>
<b>II- ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
<b>III- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>IV- OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>22</b>
<b>V- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1- Animais.....</b>	<b>23</b>
<b>5.2- Fármacos utilizados.....</b>	<b>23</b>
<b>5.3- Equipamentos.....</b>	<b>24</b>
<b>5.4- Procedimento.....</b>	<b>24</b>
<b>5.4.1- Estudo 1.....</b>	<b>24</b>
<b>5.4.2- Estudo 2.....</b>	<b>28</b>
<b>VI- RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>6.1- Estudo 1.....</b>	<b>31</b>
<b>6.2- Estudo 2.....</b>	<b>37</b>
<b>VII- DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>VIII CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS:**

ACH- Acetilcolina  
AM- Amígdala  
ATV- Área Tegumentar Ventral  
cGMP- Monofosfato de Guanosina Cíclico  
CID-10-. Código Internacional de Doenças-10ª edição  
CPF- Córtex Pré-Frontal  
DA- Dopamina  
DSM-IVtr- Diagnostic Statistical Manual  
DMSO- Dimetilsulfóxido  
FAD- Dinucleotídeo de Flavina e Adenina  
FMN- Mononucleotídeo de Flavina  
GABA- Ácido Gama-Amino-Butírico  
GLU- Glutamato  
5-HT- Serotonina  
LCE- Labirinto em Cruz Elevado  
L-NAME- *N*<sup>o</sup>-Nitro-L -Arginine Methyl Ester  
MeA- Amígdala Medial  
NA- Noradrenalina  
NADPH- Adenina Di-Nucleotídeo  
7-NI- 7-Nitroindazol  
NDR- Núcleo Dorsal da Rafe  
NMDA- N-Metil-D-Aspartato  
NO- Óxido Nítrico  
NOS- Sintase do Óxido Nítrico  
eNOS ou NOS-III- NOS Endotelial  
iNOS ou NOS-II- NOS Induzida  
nNOS ou NOS-I- NOS Neuronal  
PMd- Núcleo Dorsal Pré-mamilar do Hipotálamo  
PVN- Núcleo Paraventricular  
SCPd- Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal  
sGC- Guanilato Ciclase Solúvel  
SNC- Sistema Nervoso Central

## I- RESUMO

A abstinência ao etanol está associada ao transtorno de ansiedade. Várias estruturas e sistemas de neurotransmissores estão envolvidos na mediação deste efeito, entretanto, tais substratos ainda não foram completamente elucidados. Em modelos animais, estudos mostram aumento significativo da neurotransmissão nitrérgica em resposta à abstinência do consumo crônico de etanol. O Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) é uma importante região envolvida na gênese da ansiedade e possui grande quantidade da isoforma neuronal da enzima Sintase do Óxido Nítrico (nNOS). Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se a inibição da transmissão nitrérgica no NDR atenua os efeitos ansiogênicos induzidos pela abstinência ao etanol. Com essa finalidade, ratos wistar machos foram submetidos a tratamento crônico (21 dias) ou agudo (1 dia) com etanol 6% (v/v) seguido da suspensão abrupta do tratamento por 48hs. Após as 48hrs os animais receberam uma injeção intra-NDR de L-NAME (100nmoles/0,2µL; inibidor não seletivo da NOS) ou 7-NI (7-Nitro-Indazol; 5 nmoles/0,2µL; inibidor seletivo para nNOS) e 5 min. depois foram testados no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Em resumo, os dados mostraram que a abstinência de 48hs. do tratamento crônico com etanol promoveu efeitos ansiogênicos significativos, evidenciados pela redução do número de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE, o qual foi atenuado pelo tratamento intra-NDR com L-NAME mas não com 7-NI, sugerindo o envolvimento do NO no NDR na ansiedade induzida pela abstinência ao etanol.



## II- ABSTRACT

Ethanol withdrawal has been related to anxiety disorder. Several brain structures and neurotransmitter systems are involved in mediating this effect; however, such substrates have not yet been elucidated. In animal models, studies show significant increase in nitrenergic neurotransmission in response to abstinence from chronic consumption of ethanol. The Dorsal Raphe Nucleus (DRN) is an important region involved in the genesis of anxiety and has large amounts of the neuronal isoform of the enzyme Nitric Oxide Synthase (nNOS). The aim of this study was to verify if blocking NO neurotransmission by inhibiting NOS in the DRN attenuates the anxiogenic effects induced by ethanol withdrawal. Briefly, male Wistar rats were subjected to chronic (21 days) or acute (1 day) treatment with 6% ethanol (v/v) followed by the abrupt suspension of treatment for 48 hours. After this period the animals received an intra- DRN injection of L-NAME (100nmoles / 0.2  $\mu$ L, non-selective inhibitor of NOS) or 7-NI (7-Nitro-indazol, 5 nmol / 0,2  $\mu$ L; selective inhibitor for nNOS ) and 5 min. later they were tested in the elevated plus-maze (EPM). Our data showed that ethanol withdrawal induced "anxiety-like" behaviors, as revealed by decreased number of entries and time spent in the open arms of the EPM. These effects were attenuated by intra- DRN treatment with L-NAME, but not with 7-NI. These findings suggest the involvement of DRN nitrenergic neurotransmission in "anxiety-like" behaviors induced by withdrawal of ethanol.

### III- INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas alcoólicas acompanha a humanidade desde seus primórdios, com os primeiros relatos datados há, aproximadamente, 6000 anos no Egito antigo e na Babilônia. É uma das poucas drogas psicotrópicas que tem seu consumo admitido e até incentivado pela sociedade, estando presente em rituais religiosos, nos momentos de comemorações e confraternizações, como veículo de remédios e no preparo de pratos sofisticados da culinária (Bermond II e Tose, 2000; Giglionti e Bessa, 2004).

As primeiras bebidas alcoólicas a serem utilizadas foram as fermentadas. Com o advento do processo de destilação, introduzido na Europa pelos árabes na Idade Média, surgiram as bebidas destiladas, que passaram a ser consideradas com um remédio para todas as doenças, pois “dissipavam as preocupações mais rapidamente que o vinho e a cerveja, além de produzirem um alívio mais eficiente da dor” (Bermond II e Tose, 2000). Com a revolução industrial, no século XVIII, uma crescente produção e comercialização das bebidas alcoólicas contribuíram para um maior consumo e, conseqüentemente, um maior número de pessoas passou a ter algum tipo de problema devido ao uso excessivo destas bebidas. (Giglionti e Bessa, 2004).

Assim, a aceitabilidade do consumo do etanol vem sofrendo restrições uma vez que seu consumo agudo é responsável por inúmeros acidentes de trânsito e violência associada a episódios de embriaguez. Além disso, o consumo crônico (dependendo da dose, frequência e circunstância) pode provocar um quadro de dependência conhecido como etilismo (ou alcoolismo), o qual acarreta altos custos para a sociedade e envolve questões médicas, psicológicas, profissionais e familiares (Bermond II, 2000). A dependência de substâncias químicas como o etanol apresenta como característica essencial a presença de um agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos indicando que o indivíduo continua utilizando a droga, apesar de problemas significativos relacionados a ela (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition -DSM IV, 2000).

Esta dependência a substâncias, tal como definido pela American Psychiatric Association (2000), inclui sete critérios descritos abaixo. O indivíduo que se enquadrar em pelo menos três deles é diagnosticado como dependente.

Critérios de dependência de substância psicoativas:

*1. Um desejo forte ou compulsivo para consumir a substância;*

2. *Dificuldades para controlar o comportamento de consumo da substância em termos de início, fim ou níveis de consumo;*

3. *Estado de abstinência fisiológica quando o consumo é suspenso ou reduzido, evidenciado por síndrome de abstinência característica, ou o consumo da mesma substância (ou outra muito parecida) com a intenção de aliviar ou evitar sintomas de abstinência;*

4. *Evidência de tolerância, definida como a necessidade de doses crescentes da substância psicoativa para se obter os efeitos anteriormente produzidos com doses inferiores;*

5. *Abandono progressivo de outros prazeres ou interesses devido ao consumo de substâncias psicoativas;*

6. *Aumento do tempo empregado em conseguir ou consumir a substância ou recuperar-se de seus efeitos;*

7. *Persistência no consumo de substâncias apesar de provas evidentes de conseqüências manifestamente prejudiciais, tais como lesões hepáticas causadas por consumo excessivo de álcool, humor deprimido conseqüente a um grande consumo de substâncias, ou perturbação das funções cognitivas relacionadas com a substância. Devem ser feitos esforços para determinar se o consumidor estava realmente, ou poderia estar consciente da natureza do dano.*

A síndrome de abstinência tem sido alvo de estudos clínicos e experimentais nos últimos anos. É definida como um conjunto de sintomas que se agrupam de diversas maneiras e cuja gravidade é variável e que ocorrem devido a uma abstinência absoluta ou relativa de uma substância psicoativa consumida de modo prolongado (CID-10. Classificação de transtornos mentais e de comportamento, 100 edição). A síndrome de abstinência ao etanol tem início 6 a 8 horas após a parada da ingestão, sendo caracterizada por agitação, ansiedade, alteração do humor, náuseas, vômitos, taquicardia e hipertensão arterial, podendo ocorrer complicações como alucinações e convulsões. A persistência de alguns destes sintomas, principalmente a ansiedade e alterações do humor, está relacionada com a recaída de etilistas abstêmios (Koob e Bloom, 1988; Laranjeira et al, 2000; Zhao et al, 2007)

Desta forma, a dependência do etanol é um grave problema de saúde pública e acomete cerca de 10 % a 12% da população mundial (OMS, 1999). No Brasil, segundo o primeiro levantamento domiciliar sobre o uso de drogas, 11,2% das pessoas que vivem nas 107 maiores cidades do país apresentam dependência do etanol (Carlini et al, 2002) e os problemas relacionados a ele são responsáveis por mais de 10% dos problemas totais na saúde (Fontes et al, 2006).

Dentre as diversas doenças que podem se desenvolver com o uso crônico de bebidas alcoólicas, as relacionadas com fígado (esteatose hepática, hepatite alcoólica e cirrose) e com o aparelho digestório (gastrite, síndrome de má absorção e pancreatite) são as mais comuns (Fontes et al, 2006). Estudos demonstram também que o consumo crônico de etanol está associado com disfunções cardiovasculares e hipertensão. Neste sentido, trabalhos mostram que ratos submetidos ao modelo de etilismo crônico semi-voluntário apresentam um aumento da pressão arterial o qual foi decorrente da elevação de ambas as pressões sistólica e diastólica, aumento este relacionado ao efeito do etanol sobre componentes simpáticos e parassimpáticos do barorreflexo (Resstel et al, 2006; Tirapelli et al, 2007) e sobre a ativação de receptores cardiopulmonares (Macieira et al, 1997).

Além destas fisiopatologias, o consumo de etanol está igualmente relacionado com alterações comportamentais e cognitivas, uma vez que o encéfalo é um dos maiores alvos do efeito tóxico desta droga. Estas alterações são resultados do efeito do etanol sobre sistemas de neurotransmissores, neuropeptídeos e neuroendócrinos (Esel, 2006). Assim, a exposição aguda ao etanol está relacionada, dependendo da dose, com efeitos ansiolíticos, sedativos, anticonvulsivantes e prejuízos na coordenação motora, devidos, principalmente, a facilitação na neurotransmissão GABAérgica (ácido gama-amino-butírico (GABA)) mediada por receptores de tipo GABA<sub>A</sub> e/ou prejuízo da neurotransmissão glutamatérgica mediada por receptores de tipo NMDA (N-Metil\_D-Aspartato), promovendo uma depressão do sistema nervoso central (SNC) (Eckardt et al, 1998; Krystal, 2003).

A facilitação na neurotransmissão GABAérgica mediada por receptores GABA<sub>A</sub> promovida pelo etanol não é igual em todas as partes do encéfalo. É conhecido que o etanol aumenta a ação inibitória do GABA<sub>A</sub> principalmente no córtex cerebral, nos neurônios do septo-medial e em certos neurônios hipotalâmicos (Faingold et al, 1998). O efeito inibitório do álcool etílico sobre receptores de glutamato (GLU) de tipo NMDA também não é idêntico em todas as regiões do SNC (Faingold et al, 1998). Nesse sentido, o etanol leva a um aumento extracelular de cálcio através, principalmente, da inibição de receptores de NMDA em neurônios corticais, em células granulares cerebelares e em neurônios mesencefálicos (Bhave e Hoffman, 1997).

O consumo de bebidas alcoólicas possui, ainda, propriedades reforçadoras promovendo ambas, euforia branda e redução da ansiedade. Esses efeitos sugerem que o etanol pareça interagir com múltiplos sistemas de neurotransmissores, contribuindo com o reforço positivo para o consumo da droga (Koob e Le Moal, 1997). Os neurotransmissores e sistemas de receptores implicados na ação reforçadora incluem GABA, GLU, dopamina (DA)

e serotonina (5-HT), os quais estão dentro do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, que começa na Área Tegmentar Ventral (ATV) e se projeta, entre outras estruturas, para o Núcleo Accumbens (Koob e Nestler, 1997). A liberação de dopamina nesta via tem sido associada com efeito reforçador do consumo agudo do etanol e outras drogas de abuso. Esta liberação é mediada por impulsos excitatórios e inibitórios. Os impulsos excitatórios incluem as projeções glutamatérgicas originadas no córtex cerebral, amígdala e hipocampo e os impulsos inibitórios incluem os neurônios GABAérgicos (Johnson, 2004).

Outro neurotransmissor que participa da modulação da liberação de DA neste sistema de recompensa é a 5-HT. Estudos demonstram que neurônios serotoninérgicos do Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) enviam projeções para a ATV modulando a atividade de neurônios dopaminérgicos que fazem contato sináptico com o Núcleo Accumbens (Nevo e Hamon, 1995). Além disso, a serotonina parece estar envolvida diretamente no efeito motivacional do consumo de etanol. Nesse sentido, estudos demonstraram que, além do aumento extracelular de DA no Núcleo Accumbens há, também, uma elevação no nível de 5-HT neste núcleo com o consumo da droga (Diana et al, 1993; Weiss et al, 1996).

Com a exposição prolongada ao etanol ocorrem alterações adaptativas (plasticidade ou alostasia) nos sistemas de neurotransmissores. Assim, Cagehi et al (2003) observaram, em regiões hipocampais de ratos abstêmios ao etanol consumido cronicamente, uma redução funcional do receptor GABAA acompanhada por alterações no mRNA e expressão protéica de subunidades deste receptor (aumento da expressão das subunidades  $\alpha 4$  e  $\gamma 2$ , e diminuição da expressão das subunidades  $\alpha 1$  e  $\delta$ ). Além disso, estudos demonstram redução do complexo de receptores GABAA-Benzodiazepínicos, principalmente no lobo pré-frontal de etilistas (Lingford-Hughers et al, 1998). Também foi observado, no núcleo central da amígdala de ratos sob privação de etanol após seu consumo crônico, um aumento da função do receptor NMDA devido a um “up-regulation” de várias subunidades deste receptor associado a um aumento no nível de mRNA destas subunidades (Roberto et al., 2006). Além do GABA e GLU, outros neurotransmissores, como noradrenalina (NA), DA, 5-HT óxido nítrico (NO) também estão relacionados com os efeitos da ingestão prolongada de bebidas alcoólicas. (Tsai et al, 1998; Eckardt et al, 1998; Krystal, 2003).

A redução ou a completa descontinuação do consumo crônico do etanol resulta nos sinais e sintomas da síndrome de abstinência. Esta síndrome decorre de alterações neurobiológicas em níveis moleculares, celulares e de sistemas que ocorrem nos mesmos sistemas de neurotransmissores envolvidos com a administração aguda da droga e que são alterados com a dependência (Koob e Le Moal, 1997). Estas alterações incluem uma

hiperexcitabilidade do SNC, principalmente devido à diminuição na neurotransmissão gabaérgica e um aumento da função glutamatérgica. Neste sentido, Tsai et al (1998) mostraram um aumento no nível de GLU e uma redução no nível de GABA no fluído cerebrospinal de etilistas durante a retirada da droga.

Aumento na atividade de NA no SNC durante a síndrome de abstinência ao etanol também já foram descritos (Nutt et al, 1988). O aumento da liberação noradrenérgica afeta outros órgãos do corpo através da ativação simpática, resultando em diversas reações fisiológicas, tais como taquicardia por ativação de receptores beta-adrenérgicos, hipertensão por ativação de vias alfa-adrenérgicas, aumento da força de contração do músculo cardíaco por ação adrenérgica inotrópica positiva, náuseas e vômitos devido à redução do esvaziamento gástrico, piloereção, midríase, tremores, aumento do consumo de oxigênio e aumento da temperatura corporal em até 2oC (Major et al, 1984; DePetrillo e McDonough, 1999). É sugerido que a elevação na liberação de NA ocorra por hiperexcitação de neurônios noradrenérgicos promovido pela liberação de GLU e, por uma diminuição da inibição destes neurônios através da redução funcional de adrenoceptores inibitórios pré-sinápticos do subtipo  $\alpha_2$ , (Nutt et al, 1988).

Uma diminuição de DA e 5-HT no Núcleo Accumbens também foi observada na retirada do etanol. Esta diminuição tem sido relacionada ao reforço negativo e sintomas afetivos negativos, como disforia e ansiedade, observados durante abstinência da droga (Weiss et al, 1996).

Estes sintomas afetivos negativos estão associados com a recaída de etilistas abstêmios. Inúmeros estudos clínicos mostram que pacientes com dependência de álcool etílico, com ou sem desordem de ansiedade ou depressão associada, exibem marcados sintomas de ansiedade e depressão após a retirada da droga e que os mesmos diminuem, na maioria dos casos, após quatro a cinco semanas sem o etanol (File et al, 1989; Schucki, 1994; Heinz et al, 1998; Wetterling e Junghanns, 2000; Driessen et al, 2001; Lippas et al, 2002; Willinger et al, 2002; Haynes et al; 2005).

O aumento da ansiedade na abstinência também foi evidenciado em estudos utilizando roedores tratados cronicamente com etanol e que, após um curto período sem a droga, foram submetidos a diferentes modelos animais de ansiedade, como os testes no labirinto em cruz elevado, de interação social, de agressividade, na caixa claro-escuro, (Wilson et al, 1998; Gatch et al, 1999; Knapp et al, 2005; Cabral et al, 2006; Overstreet et al, 2006; Zhang et al, 2007). Nestes estudos, o consumo crônico de etanol foi realizado utilizando-se diferentes protocolos experimentais, como por exemplo, administração de vapor de ar em uma atmosfera

controlada (Pokk et al, 2001; Zhao et al, 2007) e inclusão de etanol a uma dieta líquida como única fonte de alimentação (Wilson et al, 1998; Gatch et al, 1999; Knapp et al, 2005; Cabral et al, 2006).

Além destes, vários outros protocolos experimentais de consumo crônico de etanol são descritos na literatura e utilizados com diferentes finalidades (Kliethermes, 2005) e em muitos deles o modelo animal utilizado é o Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

O LCE é o teste de ansiedade mais comumente empregado na procura de novos agentes ansiolíticos e também na investigação das bases fisiológicas e neuroquímicas da ansiedade (Pellow e File, 1985; Dawson e Tricklebank, 1995). As vantagens da utilização deste teste incluem a validade etológica, pois se baseia em estímulos naturais que podem ser comparáveis aos que induzem ansiedade em humanos como, por exemplo, agorafobia, ou o medo inato de espaços abertos. Além disso, é um modelo que apresenta rapidez e simplicidade, baixo custo e não há necessidade de treinamento prévio dos animais. Finalmente, apresenta capacidade de detectar efeitos ansiolíticos de algumas drogas, em particular as derivadas dos benzodiazepínicos, assim como efeitos ansiogênicos de compostos que induzem ansiedade no homem (Dawson e Tricklebank, 1995; Rodgers et al, 1997; Weiss et al, 1998).

Neste sentido, diversos estudos com ratos tratados cronicamente com etanol e submetidos ao LCE após a retirada têm mostrado o efeito ansiogênico da retirada (Kliethermes, 2005). Assim, o LCE tem sido constantemente empregado na avaliação da ansiedade gerada pela retirada do etanol após seu consumo crônico, em diferentes protocolos experimentais nos quais o consumo da droga variou entre 14 até 40 dias, em ratos e camundongos (File et al, 1989; Gatch et al, 1999; Pokk et al, 2001; Esteban et al, 2002; Knapp et al, 2005; Overstreet et al, 2006).

Embora o efeito ansiogênico da retirada do etanol já tenha sido bastante estudado, os sítios cerebrais e os neurotransmissores envolvidos na mediação deste efeito ainda não foram elucidados. Nesse sentido Knapp et al (2005), utilizando um tratamento intermitente com doses moderadas de etanol, demonstraram que a administração aguda de drogas que realçam ou diminuem a atividade de receptores BDZ-GABA durante o período sem o etanol, aliviam ou potencializam, respectivamente, a ansiedade gerada pela abstinência. Já Gatch et al (1999), mostraram a influência de antagonistas do receptor de GLU de tipo NMDA no alívio da ansiedade decorrente da retirada do etanol. Outros estudos têm demonstrado que inibidores da enzima responsável pela síntese do NO (NOS) também atenuam sinais físicos e emocionais da retirada da droga (; Usbay et al, 1997; Vassiljev et al, 1998).

Além destes trabalhos utilizando ratos, em um estudo com pacientes etilistas em tratamento, Heinz et al (1998) observaram uma relação inversa entre a diminuição da viabilidade de transportadores de 5-HT na região mesencefálica correspondente aos núcleos da rafe rostral (núcleos envolvidos na modulação dos estados afetivo-emocionais, via neurônios serotoninérgicos) e aumento dos índices de ansiedade e depressão após abstinência ao etanol. Estes resultados sugeriram que as alterações de humor decorrentes da abstinência do consumo crônico de etanol seriam devidas às alterações neuroadaptativas, a níveis moleculares e celulares que ocorrem nos sistemas de neurotransmissores envolvidos com a administração da droga, em regiões do cérebro relacionadas com a modulação das emoções.

Neste sentido, a associação de diferentes técnicas como cirurgia estereotáxica, administração intracerebral de drogas, detecção de genes de expressão imediata e da expressão de proteínas como a FOS e a utilização de modelos animais de ansiedade como o LCE, têm contribuído para a elucidação dos substratos neurais da ansiedade (Guimarães et al, 2005). Nestes trabalhos, as neurotransmissões serotoninérgica, glutamatérgica, GABAérgica e nitrérgica em estruturas cerebrais como Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal (SCPd) (Guimarães et al, 1991; Graeff et al, 1996; De Oliveira e col., 1999 e 2001) e Núcleo Dorsal da Rafe (Grahn et al, 1999) dentre outras, foram descritas como envolvidas na mediação das respostas comportamentais da ansiedade. Mais especificamente, alguns trabalhos têm mostrado que no Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) estas alterações estariam relacionadas, por exemplo, com o efeito ansiogênico do consumo crônico do etanol e sua retirada (Heinz et al, 1998; Evrard et al, 2006; Overstreet et al, 2006).

O NDR é uma estrutura mesencefálica que envia projeções serotoninérgicas excitatórias para receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> na amígdala (AM) e córtex pré-frontal (CPF), além de projeções inibitórias para receptores 5-HT<sub>2A/2C/1A</sub> na SCPd. Assim, com o aumento da estimulação da via NDR-AM/CPF poder-se-ia observar sintomas relacionados ao distúrbio de ansiedade generalizada, enquanto que a hipofunção da via NDR-SCPd estaria relacionada ao distúrbio do pânico (Deakin e Graeff.,1991).

Mais especificamente, a via NDR-AM/CPF estaria relacionada à facilitação dos comportamentos defensivos aprendidos frente a perigos potencial e distal, enquanto que a via NDR-SCPd ou via periventricular estaria relacionada à inibição de reações inatas de fuga ou luta em resposta a perigo proximal (Deakin e Graeff.,1991).

O sistema serotoninérgico do NDR envia também projeções para outras regiões do SNC, como córtex fronto-parietal, hipocampo ventral, septo lateral, núcleo accumbens e núcleos do hipotálamo, exercendo, influência em diversas funções cerebrais, dentre elas,



comportamento emocional, resposta autonômica, e atividades sensoriomotoras. (Hornung, 2003; Lechin et al, 2006). Por outro lado, o NDR recebe aferências descendentes e ascendentes de várias regiões do SNC tais como projeções glutamatérgicas do córtex pré-frontal, habênula lateral e núcleos do hipotálamo; projeções GABAérgicas da PAG; projeções dopaminérgicas da ATV; e projeções noradrenérgicas do Locus Ceruleus, as quais participam da modulação da neurotransmissão serotoninérgica e, assim, das diferentes funções relacionadas com este núcleo (Lee et al, 2003; Hornung, 2003).

De particular interesse é a influência da neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica sobre os neurônios serotoninérgicos no NDR. Estudos têm demonstrado que a ativação de neurônios serotoninérgicos do NDR, em resposta a estímulo sensorial fásico, é dependente de GLU, enquanto que o GABA exerce uma regulação tônica sobre este sistema de neurotransmissor (Tao e Auerbach, 2000 e 2003).

Assim, os neurotransmissores GLU e GABA participam da regulação da atividade de neurônios de 5-HT no NDR. Estes sistemas de neurotransmissores, como discutido anteriormente, são afetados pelo consumo crônico de etanol e, desta forma, o uso desta droga pode alterar o funcionamento do NDR via alterações nestes sistemas. Além da ação sobre GLU e GABA, o etanol pode exercer influência direta sobre o sistema serotoninérgico, o que contribui com os efeitos deletérios do consumo e da abstinência desta droga. Em um estudo da literatura, Pitis (1997) detectou uma redução da atividade elétrica basal de neurônios de 5-HT no NDR após 12 horas da retirada do etanol. Já Overstreet et al (2006), através do tratamento intermitente com doses moderadas de etanol por 15 dias, demonstraram que a administração intra-NDR de buspirona, um agonista parcial de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, durante a retirada do etanol após primeiro e segundo ciclo de um total de três ciclos de administração da bebida, impediu déficits na interação social observados em animais em abstinência da droga.

Outro neurotransmissor presente no NDR e que tem sido implicado tanto na modulação de respostas de ansiedade como também nos efeitos tóxicos do etanol é o óxido nítrico (NO).

O papel fisiológico do NO constitui um campo de estudo relativamente recente e em rápido desenvolvimento. A primeira evidência da produção endógena de NO foi a constatação, no início da década de 80, de excreção de nitrato na urina de homens e ratos submetidos a uma dieta com baixa concentração deste sal (Green, 1981 a e b). Nesta mesma década, Furchgott e Zawdzki (1980) pesquisaram a participação de um fator vasodilatador derivado do endotélio vascular (endothelium-derived relaxing factor – EDRF) indispensável para a ação da acetilcolina no relaxamento dos vasos sanguíneos. Anos mais tarde, estudos

demonstraram que este fator era idêntico ao NO. (Ignarro et al, 1987). Neste mesmo período, observou-se, também, a produção de nitritos e nitratos por macrófagos após ativação por lipossacarídeos bacterianos (Stuehr e Marletta, 1985). Estudos subsequentes esclareceram a origem do nitrato, estabelecendo a L-arginina como aminoácido essencial para sua formação (Hibbs et al, 1987). Em 1988, Marleta identificou o NO como produto da oxirredução da L-arginina.

No cérebro, o NO foi primeiramente reconhecido como mensageiro neuronal em 1988, ao se observar a formação de um fator semelhante ao EDRF, após a estimulação do receptor de GLU de tipo NMDA em culturas de células granulares cerebelares. Este fator promovia aumento do nível de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) (Garthwaite et al, 1988).

O NO é um gás de vida curta produzido endogenamente a partir do aminoácido L-arginina, pela ação de uma família de enzimas denominadas de NO sintase (NOS). Foram encontrados três genes que codificam três isoformas desta enzima: NOS neuronal (nNOS ou NOS-I), NOS induzida (iNOS ou NOS-II) e NOS endotelial (eNOS ou NOS-III). As três isoenzimas possuem semelhanças estruturais, mas são reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (nNOS), 12 (iNOS) e 17 (eNOS) (Filho e Zilberstein, 2000). Todas as isoformas da NOS são hemoproteínas que requerem fosfato de adenina di-nucleotídeo (NADPH) e O<sub>2</sub> para a produção de NO, e usam dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN) e tetrahydrobiopterina como cofatores (Bruhwylter et al, 1993; Garthwaite e Boulton, 1995; Dawson e Dawson, 1996; Barañano et al, 2001).

A iNOS é expressa nos macrófagos e nas células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patogênicos como citocinas e endotoxinas. Necessita de síntese protéica antes de ser expressa, mas depois de sintetizada, é capaz de produzir altas concentrações de NO por longo tempo, o qual pode contribuir para algumas condições patológicas como doenças neurodegenerativas e isquemia cerebral (Dawson e dawson, 1996; Filho e Zilberstein, 2000). A eNOS e nNOS são constitutivamente expressas e rapidamente ativadas pelo aumento intracelular de cálcio, produzindo pequenas quantidades de NO quando ativadas. Em condições fisiológicas estão presentes no endotélio, promovendo o relaxamento da musculatura vascular, e nos neurônios, atuando como mensageiro neuronal (Garthwaite e Boulton, 1995; Dawson e Dawson, 1996).

Os neurônios contendo a isoforma nNOS representam de 1 a 2% da população neuronal de diversas regiões do SNC como córtex cerebral, estriado, núcleos hipotalâmicos e

hipocampo, estando em concentrações maiores no bulbo olfatório e nas células granulares do cerebelo (Breat e Snyder, 1990; Dawson e Dawson, 1996; Barañano et al, 2001). Esta isoforma está intimamente ligada a receptores NMDA por proteínas PSD95. Assim quando o receptor NMDA é ativado, ocorre influxo de  $Ca^{2+}$  para o citosol onde se liga à calmodulina. Este complexo ativa a nNOS que catalisa a conversão de arginina para L-citrulina e NO, a partir de  $O_2$  e redução de NADPH (Garthwaite e Boulton, 1995; Barañano et al, 2001). O NO produzido difunde-se facilmente de um neurônio para outro onde, no citosol, reage com a guanilato ciclase solúvel (sGC). Esta enzima ativada converte GTP em GMP cíclico (cGMP), que, por sua vez, inicia diversas reações em cascatas que, dependendo da localização, poderá promover a fosforilação de proteínas, aberturas de canais iônicos e/ou liberação de outros neurotransmissores (Bruhwylter et al, 1993; Garthwaite e Boulton, 1995; Dawson e Dawson, 1996; Barañano et al, 2001).

Além da nNOS, as outras isoformas também são encontradas no SNC e a síntese do NO neste sistema está relacionada, entre outras coisas, ao controle do fluxo sanguíneo, aprendizagem e memória, expressão gênica, defesa imune, sobrevivência celular, neurodegeneração e modulação da liberação e/ou efeito de neurotransmissores como dopamina (DA), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), acetilcolina (ACH), glutamato (GLU) e serotonina (5-HT) (Davis & Syapin, 2005).

O NO pode ainda ter um papel modulatório nas reações defensivas, uma vez que neurônios nNOS-positivos estão localizados em regiões relacionadas com estas respostas como SCPd, amígdala medial (MeA), núcleos paraventricular (PVN) e dorsal pré-mamilar do hipotálamo (PMD) e o NDR (Léger et al, 1998; Guimarães et al, 2005; Beijamini & Guimarães, 2006; Okere e Waterhouse, 2006). Neste sentido, animais tratados intra-SCPd com inibidores da nNOS e submetidos ao LCE apresentaram um aumento significativo da expressão da proteína Fos na SCPd, no hipotálamo lateral (HL) e NDR (Beijamini e Guimarães, 2006). No SNC, a expressão da proteína FOS encontra-se bastante aumentada em relação aos níveis basais quando o animal é submetido a uma situação de estímulo, sugerindo que estruturas responsivas a esse estímulo sejam ativadas em resposta ao mesmo. Assim, acredita-se que o NO nestas regiões atue modulando ou promovendo a liberação de neurotransmissores. (Grahn et al, 2000; Beijamini e Guimarães, 2006).

Reforçando o envolvimento do NO nas reações defensivas, vários estudos têm demonstrado que inibidores da nNOS promovem um efeito ansiolítico no LCE, embora alguns resultados contraditórios tenham sido também encontrados (Czech et al, 2003).

Deste modo, a administração intracerebral na SCPd de inibidores da NOS promoveu um efeito ansiolítico no LCE em ratos (De Oliveira et al, 2001). Outra evidência sobre a influência do NO sobre o comportamento emocional foi demonstrada no trabalho de Grahn et al (2000) em que a administração de L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, na região do NDR preveniu as conseqüências comportamentais de choques inescapáveis na cauda. Estes autores sugeriram que o estresse incontrolável levaria a um aumento na liberação de glutamato, que por sua vez aumentaria a síntese de NO e, este neurotransmissor promoveria uma maior liberação de 5-HT nas áreas de projeção deste núcleo (SCPd, AM e CPF), levando o animal a se adaptar a esta situação aversiva (Grahn et al, 2000). Um estudo posterior, demonstrou que a administração intra-NDR de inibidores da nNOS não seletivo como o L-NAME e seletivo como o 7-NI, promovem, em baixas doses, efeito ansiolítico no LCE, enquanto que altas doses diminuem a atividade locomotora geral (Spiacci et al, 2008).

Além destas evidências sobre o envolvimento da neurotransmissão mediada pelo NO na ansiedade estudos demonstram que este gás também pode estar relacionado com a resposta ansiogênica da retirada do etanol após um consumo crônico (Uzbay et al, 1997; Davis e Syapin, 2005). Nesse sentido Vassiljev et al (1998) observaram que a administração intraperitoneal de 7-nitroindazol (7-NI), um inibidor seletivo da nNOS, atenua os sinais físicos de retirada do etanol em ratos.

Apesar da grande quantidade de estudos mostrando os efeitos ansiogênicos da síndrome de retirada do etanol, pouco ainda se sabe sobre a participação do óxido nítrico no NDR na mediação destas respostas, onde este neurotransmissor tem sido implicado nos mecanismos neurais da ansiedade. Sendo assim, a hipótese do nosso trabalho é que a retirada do etanol leva a um aumento na produção de NO no NDR e que este aumento seria o responsável pelos níveis elevados de ansiedade observados na síndrome de abstinência.

## **IV- OBJETIVOS**

### **4.1- Objetivo Geral**

Verificar se o tratamento com inibidores inespecífico e específico da nNOS, L-NAME e 7-NI respectivamente, administrados diretamente no NDR, são capazes de reverter o quadro de ansiedade induzida pela abstinência do consumo crônico do etanol.

### **4.2- Objetivos específicos**

**4.2.1**→ Verificar as alterações comportamentais induzidas pela abstinência do consumo crônico de etanol, utilizando o modelo do Labirinto em Cruz Elevado;

**4.2.2**→ Verificar se a inibição da NOS no Núcleo Dorsal da Rafe pela administração local de um inibidor não seletivo, o L-NAME, atenua as alterações comportamentais induzidas pela abstinência do consumo crônico de etanol; e

**4.2.3**→ Verificar se a inibição da nNOS, pela administração de um inibidor seletivo da enzima, o 7-NI, no Núcleo Dorsal da Rafe, atenua as alterações comportamentais induzidas pela abstinência do consumo crônico de etanol.

## V- MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1- Animais

Foram utilizados 287 ratos Wistar machos provenientes do biotério central do *campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com 49 ou 69 dias de idade (7 ou 10 semanas; adulto jovem) no início do tratamento, de acordo com o grupo experimental, como será detalhado a seguir.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão, sob ciclo de luz (luzes ligadas das 6:30 às 18:30 hrs.) e temperatura ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) controlados. Permaneceram aos pares em gaiolas de polipropileno (medidas 41 x 34 x 16 cm), com livre acesso a ração comercial (Nuvital) e divididos randomicamente em três grupos, de acordo com a dieta líquida que receberam (CONTROLE, com livre acesso a água; ISOCALÓRICO, com livre acesso a solução de sacarose; ou ETANOL, com livre acesso a solução de etanol).

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do campus da USP-Ribeirão Preto (Processo CEUA nº07.1.992.53.2)

### 5.2- Fármacos utilizados

Foram utilizados os seguintes fármacos:

- N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Sigma, dose de 100 nmoles/0,2µL) diluída em salina estéril;
- 7-Nitroindazol (7-NI, Sigma, dose de 5nmoles/0,2µl) diluído em veículo (20% dimetilsulfóxido (DMSO) em salina estéril).
- etanol (concentrações de 2%, 4%, 6% e 9% v/v);
- Tribromoetanol (2,5 %, 10 ml/kg, Aldrich, EUA);
- Lidocaína (3%, 0,2mL, PROBEM, Brasil);
- Pentabiótico veterinário (0,2 ml, dose única, Fort Dodge, Brasil)
- Banamine (2,5mg/kg, 1ml/kg, Fort Dodge, Brasil);

- Uretana (25%, 5mL/kg, Sigma-Aldrich).

### **5.3- Equipamentos**

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Aparelho estereotáxico (Stoelting);
- Labirinto em Cruz Elevado: o LCE é um aparato de madeira constituído por uma plataforma central (10 x 10 cm) com dois braços abertos perpendiculares a dois braços fechados os quais possuem iguais dimensões (50 cm x 12 cm de largura) e estão elevados 50 cm em relação ao solo. Os braços fechados são circundados por paredes laterais (40 cm de altura) e os braços abertos, com o objetivo de evitar a queda dos animais, são circundados por uma pequena barreira de acrílico transparente de 1 cm de altura (Pellow *et al*, 1985);

### **5.4- Procedimento**

O projeto foi realizado em duas etapas distintas. Na primeira etapa (estudo 1) foram analisadas as alterações comportamentais induzidas pelo consumo crônico do etanol. Na segunda etapa (estudo 2) investigamos se a inibição da NOS no Núcleo Dorsal da Rafe, de animais submetidos ao tratamento crônico com etanol, atenuaria a ansiedade induzida pela abstinência ao etanol.

#### ***5.4.1- Estudo 1 – Efeitos da retirada do etanol sobre a ansiedade no LCE em ratos submetidos ao modelo do consumo crônico semi-voluntário de etanol.***

Para este estudo os animais foram divididos em dois grupos experimentais, sendo um deles submetidos ao consumo crônico de etanol, enquanto o segundo foi submetido ao consumo agudo do mesmo.

Para o estudo sobre os efeitos da abstinência ao etanol consumido cronicamente, ratos com 49 dias de idade foram divididos em quatro grupos experimentais, de acordo com a bebida a que tiveram livre acesso. Assim, os ratos do grupo controle tiveram livre acesso à água; os ratos dos grupos etanol receberam solução de etanol 6% ou 9% (v/v) como única fonte de bebida; e os ratos do grupo isocalóricos receberam solução de sacarose (como única fonte de bebida) na concentração correspondente ao conteúdo calórico do etanol 6% (82,6 g/L). Considerando-se a intenção de desenvolver um modelo experimental utilizando uma dose de etanol mínima para indução de alterações comportamentais, para esta etapa do estudo foram utilizadas duas concentrações distintas (6 e 9%).

Os animais do grupo etanol passaram por um breve período de adaptação à solução alcoólica. Para o grupo cuja concentração final de etanol foi de 6% (v/v), os animais receberam inicialmente 2% de etanol (v/v) nos três primeiros dias de tratamento; seguido de 4% de etanol (v/v) nos três dias subsequentes e recebendo 6% de etanol (v/v) até o final do tratamento. Para o grupo de animais em que a concentração final de etanol foi de 9% (v/v), os animais receberam inicialmente 3% de etanol (v/v) nos três primeiros dias de tratamento; seguido de 6% (v/v) nos três dias subsequentes e finalmente 9% de etanol (v/v) até o final do tratamento.

Quanto ao grupo isocalórico, foi adotado procedimento semelhante de aumento gradativo da solução de sacarose. Este grupo foi realizado considerando-se apenas a equivalência para o grupo tratado com etanol 6% (v/v). Assim, para este grupo isocalórico, a solução de sacarose foi gradativamente aumentada, considerando-se sua equivalência calórica com as soluções de etanol administradas.

Para todos os grupos de tratamento crônico, o mesmo teve duração de 21 dias. Porém, no vigésimo dia os bebedouros foram removidos das gaiolas e, desta forma, os animais foram privados<sup>1</sup> de líquido por um período de 24 horas. Assim, no 21º dia os bebedouros retornaram para as gaiolas por 2 horas e, após este intervalo, os ratos dos grupos etanol e sacarose tiveram suas soluções substituídas por água até o momento do teste no LCE, realizado 48 horas (ou 24 horas) depois. Desta maneira, tanto o grupo etanol quanto o sacarose ficaram sob abstinência das respectivas bebidas por um período de 48 horas (ou 24 horas).

---

<sup>1</sup> O A privação de bebida (água, etanol ou sacarose) por vinte e quatro horas leva o animal a consumir o líquido apresentado após esse período, garantindo, dessa forma, o período de abstinência posterior de 24 ou 48 horas.



Decorridas 48 horas (ou 24 horas) de abstinência, os animais de todos os grupos foram submetidos ao teste comportamental no LCE. Os consumos de bebida e ração foram mensurados a cada dois dias, no mesmo período em que ocorreu a limpeza das caixas onde os animais permaneceram alojados.

Durante o teste no LCE, os ratos foram colocados na plataforma central deste aparato com o focinho voltado para um dos braços fechados, permitindo-lhes a livre exploração do aparelho por cinco minutos, após os quais foram retirados e o aparelho limpo com papel higiênico embebido em álcool 70%. Durante o teste, os comportamentos foram filmados e os parâmetros tradicionais deste modelo foram avaliados, registrando-se o número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados.

Terminado o teste comportamental, os animais foram mortos em câmara de CO<sub>2</sub>. A ausência de batimentos cardíacos e movimentos respiratórios por período superior a dez minutos foram utilizados como parâmetros para confirmar a morte dos mesmos.

Considerando-se os resultados obtidos no grupo cronicamente tratado com etanol, para o estudo sobre os efeitos da abstinência ao etanol consumido agudamente, animais com 69 dias de idade foram divididos randomicamente em dois grupos, sendo eles: controle e etanol 6%. Após 24 horas de adaptação no biotério do laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão, todos os animais foram privados de água ou solução de etanol 6% por um período de vinte e quatro horas, como descrito para o tratamento crônico. Passado este período, os animais tiveram acesso por duas horas a uma das seguintes bebidas, de acordo com o grupo a que pertencerem: água ou solução de etanol (6%). Decorridas duas horas, os animais do grupo etanol tiveram suas soluções substituídas por água ficando sob abstinência da solução de etanol por 48 horas.

Após quarenta e oito horas, os animais dos dois grupos foram submetidos ao teste no LCE, tendo seus comportamentos registrados e analisados como já descrito anteriormente. Terminado o teste comportamental, os animais, assim como no tratamento crônico, foram mortos em câmara de CO<sub>2</sub>.

### ***Medida dos níveis de etanol no sangue.***

Animais tratados crônica ou agudamente com etanol 6%, como descritos anteriormente, foram anestesiados com uretana (25%, 5mL/kg, Sigma-Aldrich) e as amostras de sangue foram coletadas da veia cava inferior ( $\pm$  4mL por rato) utilizando-se seringas heparinizadas. As coletas de sangue foram realizadas nos seguintes períodos do tratamento: 21 dias (grupo crônico) ou 2 horas (grupo agudo) após tratamento com etanol, ou 24 ou 48 horas após abstinência do mesmo.

Realizadas as coletas, as amostras foram acondicionadas em tubos contendo fluoreto de sódio (1 mg/mL de sangue). Em seguida, as mesmas foram transferidas para frascos contendo cloreto de sódio (1 mg/ mL de sangue) e água (1 mL/mL de sangue), os quais foram devidamente lacrados e colocados no Head Space HSS4A (Shimadzu, Japão). As amostras foram, então, injetadas no cromatógrafo GC17A (Shimadzu, Japão) e as medidas obtidas foram comparadas com uma curva padrão de calibração realizada previamente, através da adição de diferentes concentrações conhecidas de etanol (0,02 – 20 mg/mL) em amostras de sangue de animais controle. Os resultados encontrados foram expressos em mg de etanol/mL de sangue, conforme protocolo descrito por Tirapelli et al (2006).

### **Análise estatística**

A análise dos dados de consumo de bebida e ração foi realizada através de uma ANOVA de medidas repetidas, considerando-se como significativos valores de  $p < 0,05$ .

Para análise da concentração de etanol no sangue foi feita uma ANOVA de duas vias considerado como fatores tempo de tratamento (agudo ou crônico) e período de abstinência ao etanol (sem abstinência e com abstinência de 24 ou 48 horas). Quando a interação foi significativa os resultados foram analisados pelo teste de Tukey HSD.

Para as análises dos comportamentos observados no teste no LCE, primeiramente foram calculados os valores das porcentagens da frequência e do tempo despendidos nos braços abertos em relação aos valores totais (braços abertos + fechados) de frequência e tempo despendido, como apresentado na fórmula abaixo:

$$\%FA = 100 * [FA/(FA+FF)]$$

e

$$\%TA = 100 * [TA/(TA+TF)] ;$$

onde:

FA = frequência (ou número) de entradas nos braços abertos

FF = frequência (ou número) de entradas nos braços fechados

TA = tempo despendido nos braços abertos

FF = tempo despendido nos braços fechados

Após calcular as porcentagens de frequência e tempo despendidos, e o número de entradas nos braços fechados, os dados foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, sendo as variáveis dependentes a porcentagem do tempo e da frequência nos braços abertos e a frequência nos braços fechados, e as variáveis independentes os fatores tempo de tratamento (agudo x crônico) e tipo de tratamento (água, sacarose, ou etanol) (estudo 1). Para o grupo tratado cronicamente com etanol, quando as análises mostraram interação significativa entre os fatores, seguiu-se uma análise de variância de uma via e teste *post-hoc* de Duncan. Os resultados do grupo agudo foram submetidos ao teste t de Student.

O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

#### ***5.4.2- Estudo 2 – Efeitos do tratamento intra-cerebral com o L-NAME ou 7-NI no Núcleo Dorsal da Rafe na ansiedade induzida pela síndrome de abstinência causada pela abstinência de etanol em ratos submetidos ao modelo de etilismo semi-voluntário.***

Foram realizados dois grupos experimentais, sendo um deles submetidos ao consumo crônico de etanol, enquanto que o segundo foi submetido ao consumo agudo do mesmo. O tratamento com etanol foi realizado como descrito no Estudo 1, utilizando-se apenas a concentração de 6% (v/v).

No que se refere às diferenças quanto a procedimento experimental, os animais do grupo crônico foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia no

Núcleo Dorsal da Rafe no 14º dia de tratamento. Já os animais do grupo agudo passaram pela mesma cirurgia uma semana antes do tratamento com etanol.

### **Cirurgia estereotáxica**

Cinco a dez minutos antes do início da cirurgia, cada animal foi anestesiado com tribromoetanol (2,5%, 10 ml/kg intraperitoneal, Sigma-Aldrich, EUA) e, em seguida, foram fixados ao aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA), pelo rochedo temporal, com a barra dos incisivos -3,3 mm abaixo da linha interaural. Após a fixação no aparelho e assepsia da cabeça, dorso e pata com solução alcoólica de iodo 2%, receberam subcutaneamente o anestésico local, cloridrato de lidocaína associado a vasoconstritor (Lidocaína 3%, 0,2mL, PROBEM, Brasil), assim como pentabiótico veterinário (0,2 ml, dose única, Fort Dodge, Brasil, intramuscular) e o antiinflamatório e antipirético Banamine (2,5mg/kg, 1ml/kg, Fort Dodge, Brasil, por via subcutânea). Em seguida, o crânio foi exposto, limpo com solução hidroalcoólica 70% e três pequenos orifícios foram abertos: dois para os parafusos, com o intuito de auxiliar a fixação de uma prótese de acrílico, e um para a inserção de uma cânula-guia de 11 mm de comprimento, a qual foi inserida a partir do Lambda, de acordo com as seguintes coordenadas: +1,3 mm ântero-posterior; + 2,0 mm látero-medial; - 5,2 mm dorso-ventral, estando a haste inclinada 20º (Paxinos e Watson, 1986). Um mandril de aço inoxidável foi introduzido na cânula-guia para evitar possíveis obstruções. A cânula-guia foi implantada 2 mm acima da região de interesse, a fim de evitar possíveis lesões nessa estrutura. Essa diferença, no entanto, foi corrigida no momento da injeção, pela inserção de uma agulha mizzi (30 od), através da cânula-guia, de 13 mm de comprimento.

### **Teste comportamental**

Além dos animais do grupo controle (salina e veículo), os animais foram subdivididos em dois grupos, conforme tratamento intracerebral a que foram submetidos: um grupo recebeu o inibidor inespecífico da NOS, o L-NAME; o outro grupo recebeu o inibidor específico da nNOS, o 7-NI.

O teste comportamental foi realizado nove dias após a cirurgia e 48 horas após abstinência ao etanol (no caso do grupo etanol). No dia do teste os animais do grupo L-

NAME receberam uma injeção intra-NDR de Salina ou L-NAME, e os animais do grupo 7-NI receberam uma injeção intra-NDR de veículo (salina+DMSO 20%) ou 7-NI.

Para a injeção intracerebral foram utilizadas agulhas dentais de 13 mm de comprimento e 0,2 mm de diâmetro externo, conectadas a uma seringa Hamilton de 10 µL através de um tubo de polietileno. As agulhas foram introduzidas pela cânula-guia, após a remoção do mandril. Um minuto depois da introdução da agulha dental, a administração das drogas ou salina ou veículo iniciou-se. Em todos os experimentos, um volume de 0,2 µL foi administrado durante um período de trinta segundos (0,4 µL/ minuto). Terminada a administração, a agulha permaneceu por mais sessenta segundos adicionais no interior da cânula para evitar refluxo da substância administrada. A movimentação de uma bolha de ar ao longo do tubo de polietileno confirmou o fluxo da injeção. Cinco minutos após a administração dos fármacos ou veículos, os animais foram submetidos ao teste comportamental LCE como descrito para o estudo 1.

### **Perfusão e Histologia**

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uretana (25%, 5mL/kg, Sigma-Aldrich) e perfundidos por via intra-cardíaca com salina seguida por solução de formaldeído a 10%. Os cérebros foram removidos e armazenados em solução de formalina a 10% por pelo menos 3 dias.

Após o armazenamento em solução de formaldeído 10%, os cérebros foram cortados em secções coronais de 50 µm de espessura, utilizando-se um criostato de congelamento (modelo Cryocut 1800, Leica, Alemanha) para verificação microscópica do sítio da microinjeção. As secções obtidas foram comparadas aos diagramas e fotomicrografias do Atlas de Paxinos e Watson (1997). Foram incluídos na análise estatística somente os animais que tiverem os sítios de injeção localizados no NDR.

### **Análise estatística**

Análises dos comportamentos exibidos pelos ratos no LCE foram calculados como descrito no estudo 1.

Após calcular as porcentagens de frequência e tempo despendidos, e o número de entradas nos braços fechados, os dados submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA)

Multifatorial, sendo as variáveis dependentes a porcentagem do tempo e da frequência nos braços abertos e a frequência no braço fechado, e as variáveis independentes os fatores bebida (água x etanol), tempo de tratamento (agudo e crônico), droga administrada (salina x L-NAME x veículo x 7-NI) e a interação entre estes fatores.

Posteriormente a ANOVA multifatorial, os dados foram analisados separadamente. Foi realizada ANOVA de uma via dos animais submetidos ao tratamento agudo com etanol, sendo a variável independente o fator bebida. Em relação ao efeito do tratamento crônico do etanol, foi realizada ANOVA de uma via levando em consideração o fator tratamento. Quando as análises mostraram diferenças significativas entre os fatores, os resultados foram submetidos ao teste *post-hoc* de Tukey.

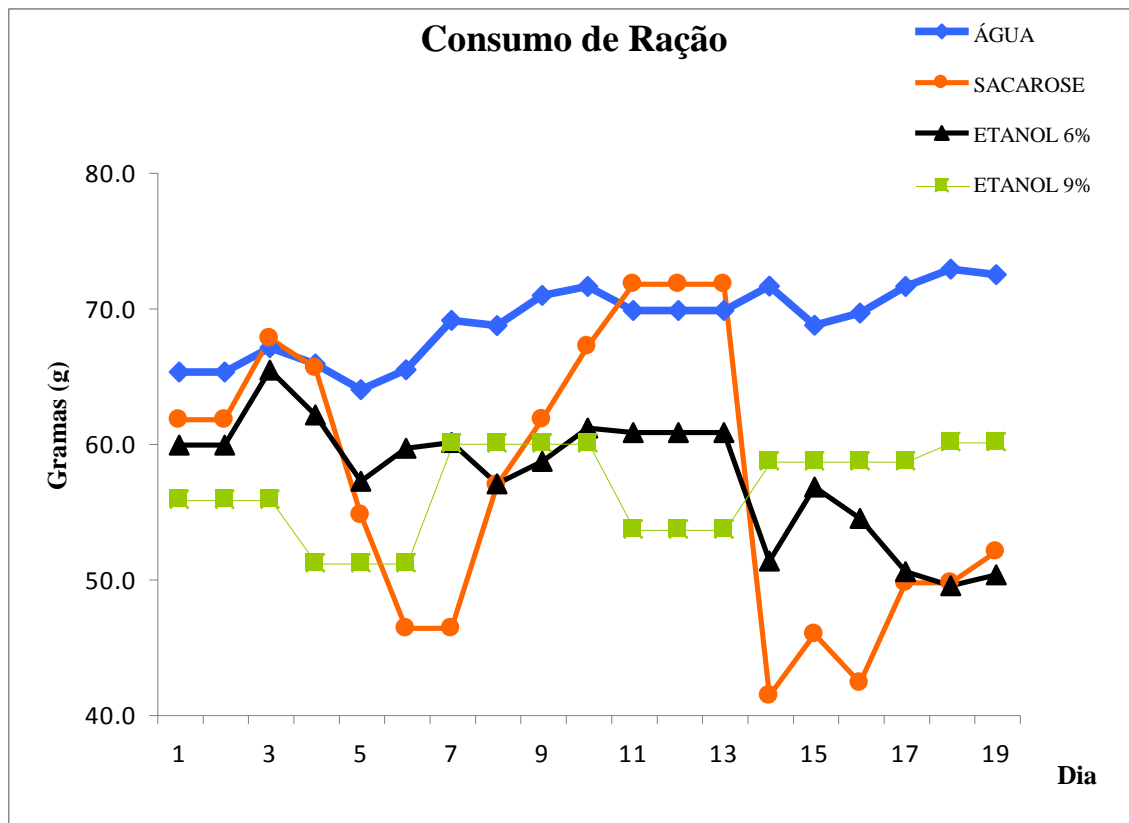
## VI- RESULTADOS

### 6.1- Estudo 1: Efeitos da retirada do etanol sobre a ansiedade no LCE em ratos submetidos ao modelo do consumo crônico semi-voluntário de etanol

#### Consumo de ração e bebida e níveis de etanol no sangue

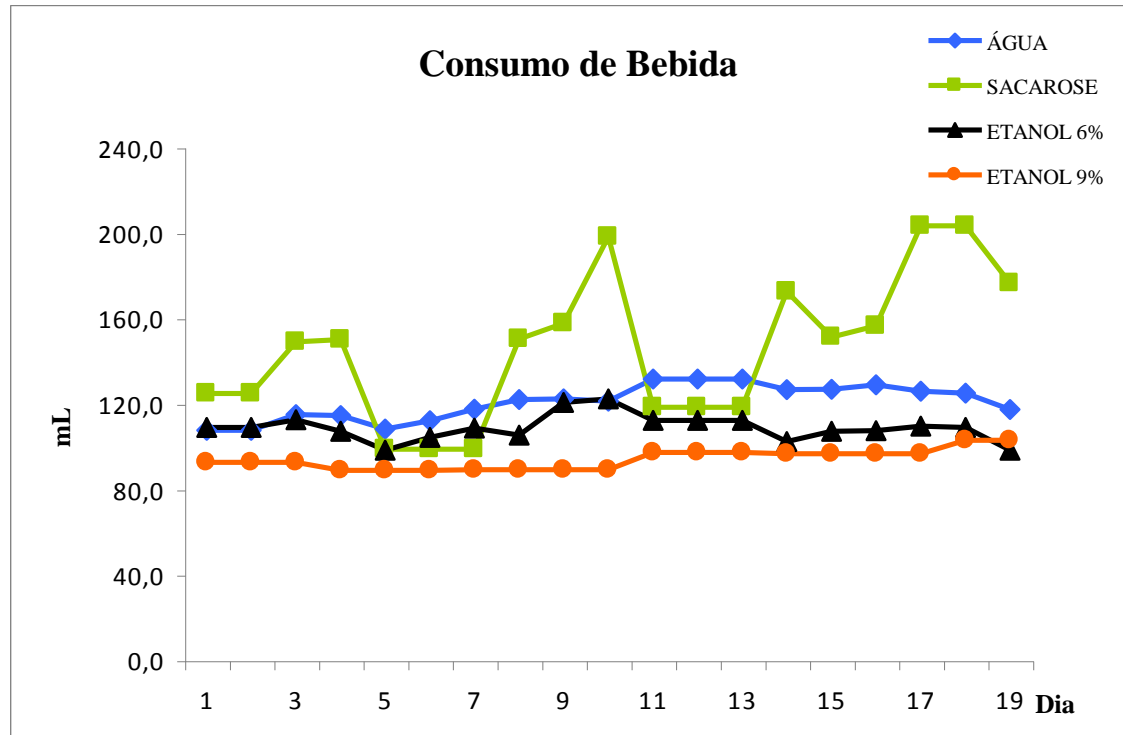
Nas figuras 1 e 2 são mostradas as médias do consumo de ração e solução líquida medidos diariamente durante todo o tratamento (20 dias).

No que se refere ao consumo de ração, observou-se uma diminuição média neste consumo entre os animais dos grupos Sacarose e Etanol 6% e 9% ( $F_{48,84}=4,54$ ;  $p<0,05$ ) em relação aos do grupo controle (que bebeu somente água).



**Figura 1:** O consumo de ração está diminuído nos animais tratados cronicamente com Etanol (6% e 9%) ou Sacarose. Os animais foram submetidos ao modelo do consumo crônico de etanol (21 dias), no qual tiveram como única bebida disponível água (n=28), etanol 6% (n=30), etanol 9% (n=20) ou sacarose (n=14). O consumo de ração, mensurados diariamente, está expresso em gramas (ANOVA de medidas repetidas,  $p<0,05$ ).

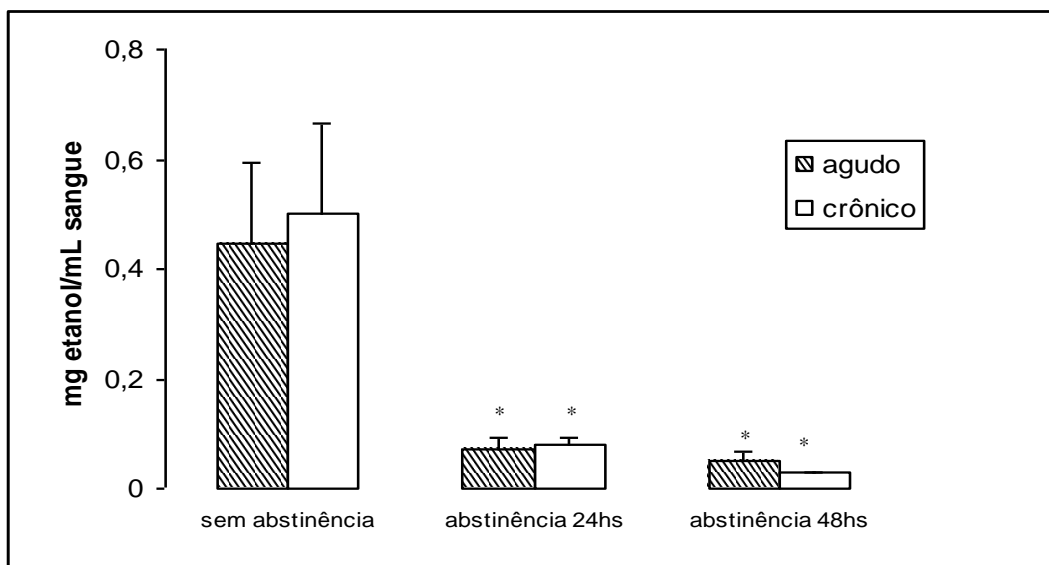
Em relação ao consumo de bebida, observou-se uma diminuição significativa dos animais dos grupos Etanol 6% e 9% em comparação ao controle (água). Por outro lado, os animais do grupo Sacarose apresentaram um maior consumo dessa bebida ( $F_{48,84}=3,47$ ;  $p<0,05$ ).



**Figura 2: Diminuição no consumo de Etanol (6% e 9%) e aumento no consumo de Sacarose ao longo do tratamento crônico em ratos.** Os dados são expressos em mL para os diferentes grupos experimentais analisados (água, sacarose, etanol 6% e etanol 9%) (ANOVA de medidas repetidas,  $p<0,05$ ). Para maiores especificações, consultar figura 1.



Na figura 3 são apresentadas as médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) das concentrações de etanol no sangue imediatamente após o consumo crônico ou agudo da solução de etanol 6% decorridas 24 ou 48 horas deste consumo. A ANOVA de 2 fatores (abstinência x tempo de consumo) demonstrou uma redução significativa na concentração de etanol após a abstinência ( $F_{2,32}= 15,54$ ;  $p<0,02$ ), não apresentando interação com o tempo de tratamento ( $F_{2,32}=0,10$ ;  $p>0,05$ ). A análise *post-hoc* de Tukey demonstrou redução significativa dos níveis de etanol no sangue tanto após abstinência de 24 horas ( $p<0,05$ ) como de 48 horas ( $p<0,05$ ), não havendo diferenças significativas entre estes níveis no sangue de ratos abstêmios 24 ou 48 hrs ( $p>0,05$ ).

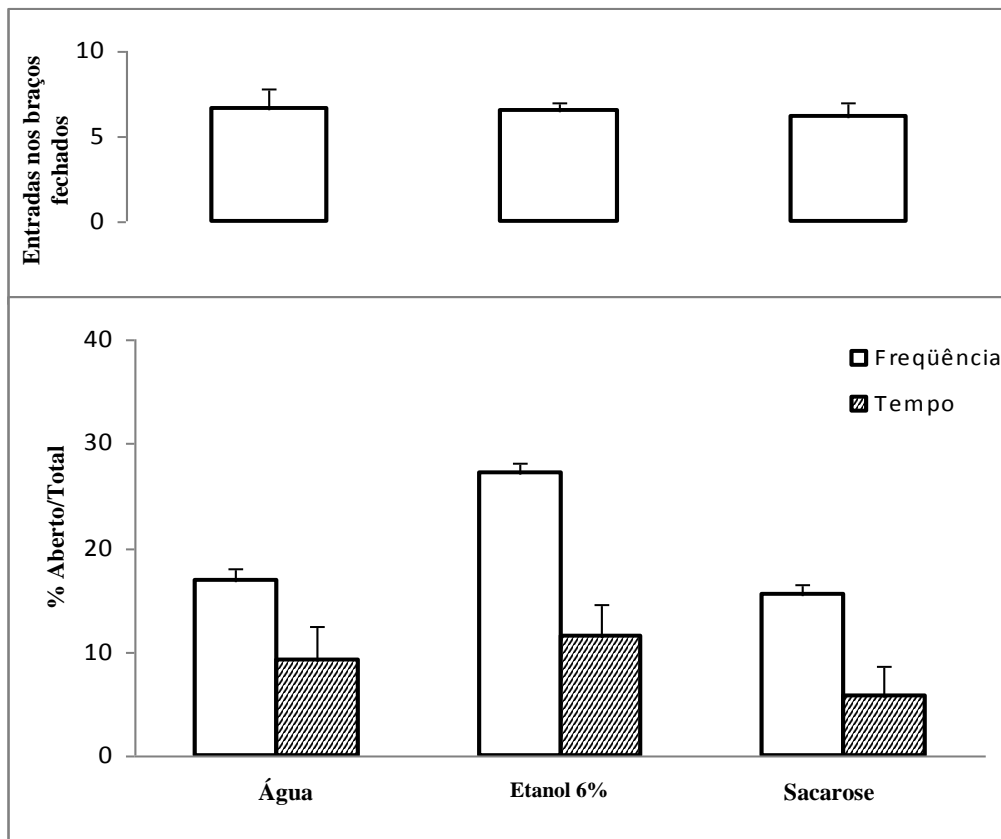


**Figura 3: Diminuição da concentração de etanol no sangue após 24 ou 48 hrs. de abstinência.** Os dados são expressos em mg de etanol por mL de sangue para os diferentes grupos experimentais analisados (sem abstinência agudo,  $n=5$ ; sem abstinência crônico,  $n=5$ ; abstinência de 24 hs agudo,  $n=4$ ; abstinência de 24hs crônico,  $n=6$ ; abstinência de 48hs agudo,  $n=6$ ; e abstinência de 48 hs crônico,  $n=6$ )(ANOVA de duas via seguida de Tukey). O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo sem abstinência (agudo e crônico). ( $p<0,05$ ).

**Comportamento exploratório de ratos, submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado, após privação de solução de etanol consumida crônica ou agudamente.**

Na figura 4 são apresentadas as médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da frequência nos braços fechados (FF) do LCE (painel superior) e das porcentagens de frequência (%FA) e tempo gasto nos braços abertos (%TA) (painel inferior) dos grupos controle, etanol 6% e sacarose que foram submetidos a 24 horas de abstinência ao etanol consumido cronicamente.

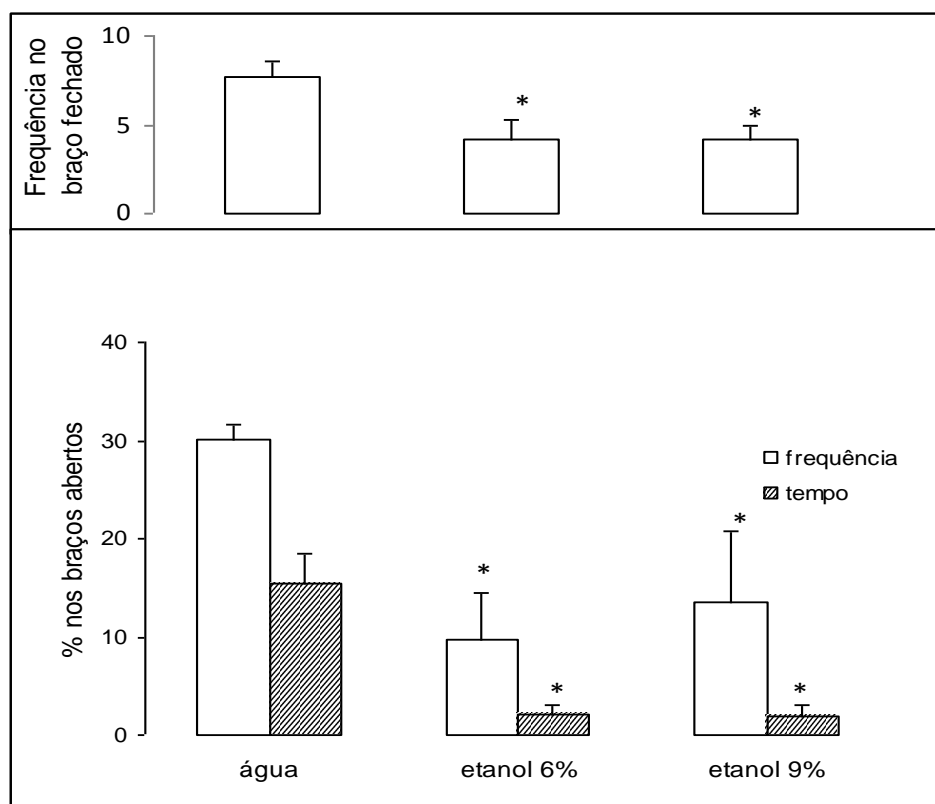
Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à FF ( $F_{2,27}=0,09$ ;  $p>0,05$ ) assim como na %FA ( $F_{2,27}=1,53$ ,  $p>0,05$ ) e da %TA ( $F_{2,27}=0,093$ ,  $p>0,05$ ).



**Figura 4: Abstinência de 24 horas ao etanol 6% administrado cronicamente (21 dias) não altera a atividade exploratória de ratos avaliados no teste do LCE.** Os animais foram submetidos ao modelo do consumo crônico de etanol, no qual tiveram como única bebida disponível água (n=6), etanol 6% (n=8) ou sacarose (n=12), durante 21 dias. Terminado esse período foram submetidos a 24 horas de abstinência, onde a única bebida disponível era água para todos os grupos. Após a abstinência os animais foram submetidos ao teste no LCE (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

Como na figura 4, a figura 5 mostra as médias+EPM da FF no LCE e das %FA e %TA dos grupos controle, etanol 6% e etanol 9% submetidos ao protocolo experimental de 21 dias de ingestão de etanol seguida de 48 horas de abstinência ao mesmo.

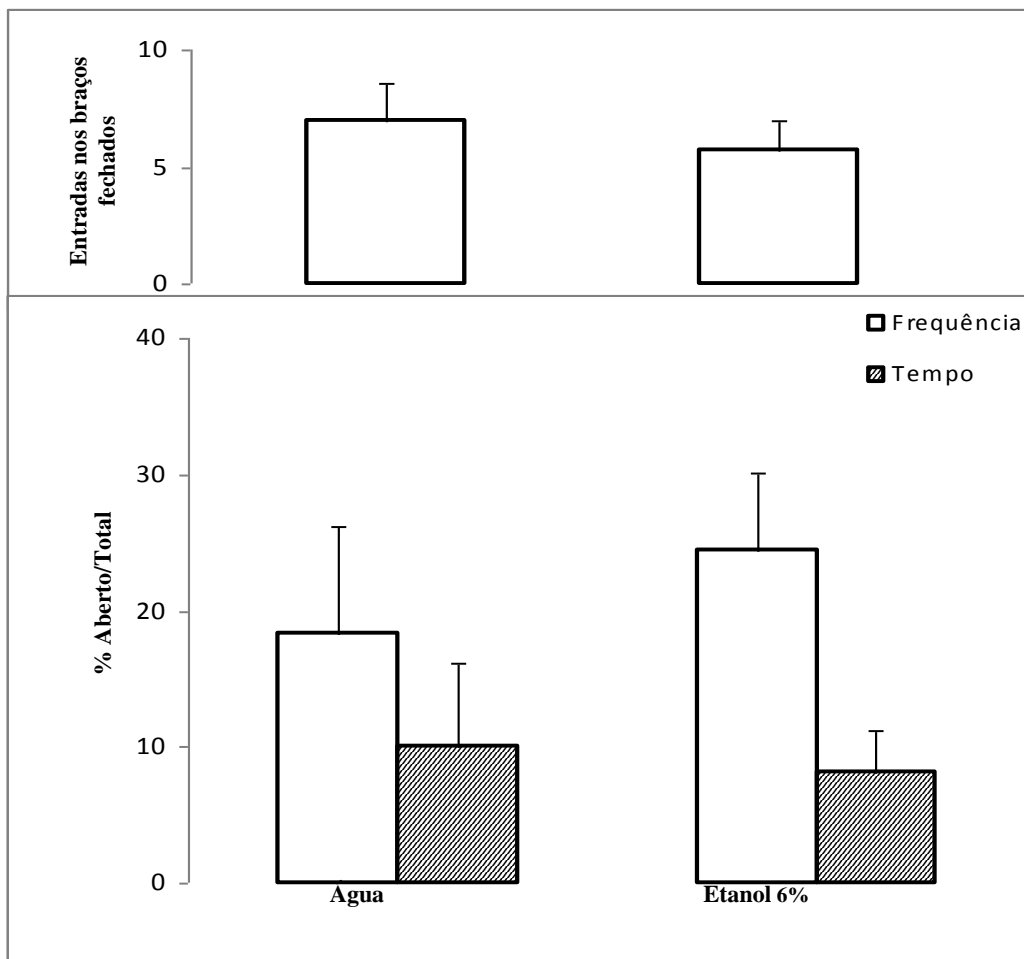
Houve uma redução significativa da FF dos grupos etanol 6% e 9% em comparação com o grupo controle ( $F_{2,43}=1,92$ ;  $p<0,05$ ). Foi observada também uma diminuição significativa da média da %FA ( $F_{2,43}=5,40$ ;  $p<0,05$ ) e da %TA ( $F_{2,43}=6,00$ ;  $p<0,05$ ) dos grupos etanol 6% e 9% quando comparados ao grupo controle.



**Figura 5: Abstinência de 48 horas ao etanol administrado cronicamente (21 dias) aumenta os níveis de ansiedade de ratos avaliados no teste do LCE.** Os animais foram submetidos ao modelo de consumo crônico de etanol, no qual tiveram como única bebida disponível água (n=7) ou etanol 6% (n=7), ou 9% (n=7), durante 21 dias. Terminado esse período foram submetidos a 48 horas de abstinência, onde a única bebida disponível era água para todos os grupos. Após a abstinência os animais foram submetidos ao teste no LCE. (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan). O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (água) ( $p<0,05$ ).

Na figura 6 estão apresentadas as médias+EPM da FF, assim como das %FA e %TA dos animais dos grupos controle e etanol 6% que foram submetidos ao protocolo experimental de administração aguda de etanol seguida de 48 horas de abstinência ao mesmo.

Não foram observadas diferenças significativas na FF dos grupos etanol 6% em comparação com o grupo controle ( $t_{12}=-0,63$ ,  $p>0,05$ ), ou ainda quanto a %FA ( $t_{12}=-0,64$ ,  $p>0,05$ ) e a %TA ( $t_{12}=0,30$ ,  $p>0,05$ ) do grupo etanol 6% quando comparados com o grupo controle.



**Figura 6: Abstinência de 48 horas ao etanol 6% consumido agudamente não altera o comportamento exploratório de ratos avaliados no teste do LCE.** Os animais foram submetidos ao protocolo de consumo agudo (um único dia) de etanol, oferecido na concentração de 6% (n=8), enquanto animais do grupo controle (n=6) tiveram acesso à água. Após 48 horas de privação da solução alcoólica, onde apenas água foi oferecida como bebida, os animais foram testados no LCE. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (t de Student,  $p=0,05$ ).

**6.2- Estudo 2 – Efeitos do tratamento intra-cerebral com inibidores da NOS, L-NAME ou 7-NI no Núcleo Dorsal da Rafe sobre a ansiedade induzida pela suspensão do tratamento crônico com etanol.**

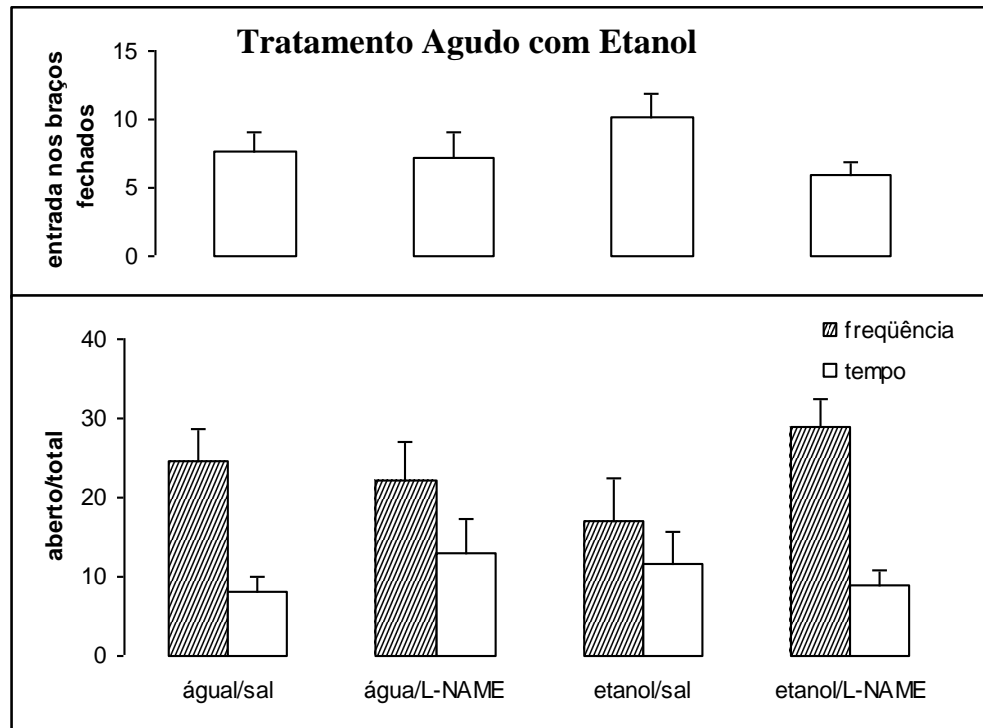
Nas figuras 7 e 8 estão apresentadas as médias+EPM da FF do LCE, assim como das %FA e %TA dos grupos: água/salina (n=14), água/L-NAME (n=9), etanol/salina (n=8) e etanol/L-NAME (n=9) (figura 7); água/veículo (n=7), água/7-NI (n=8), etanol/veículo (n=8) e etanol/7-NI (n=10) (figura 8), submetidos ao protocolo experimental de administração aguda de etanol seguida de 48 horas de abstinência ao mesmo.

Nas figuras 9 e 10 são mostradas as médias+EPM da FF do LCE, assim como das %FA e %TA dos grupos: água/salina (n=10), água/L-NAME, etanol/salina (n=9), (n=8) e etanol/L-NAME (n=9) (figura 9); água/veículo (n=9), água/7-NI (n=9), etanol/veículo (n=9) e etanol/7-NI (n=13) (figura 10), submetidos ao protocolo experimental de administração crônica de etanol, seguida de 48 horas de abstinência ao mesmo.

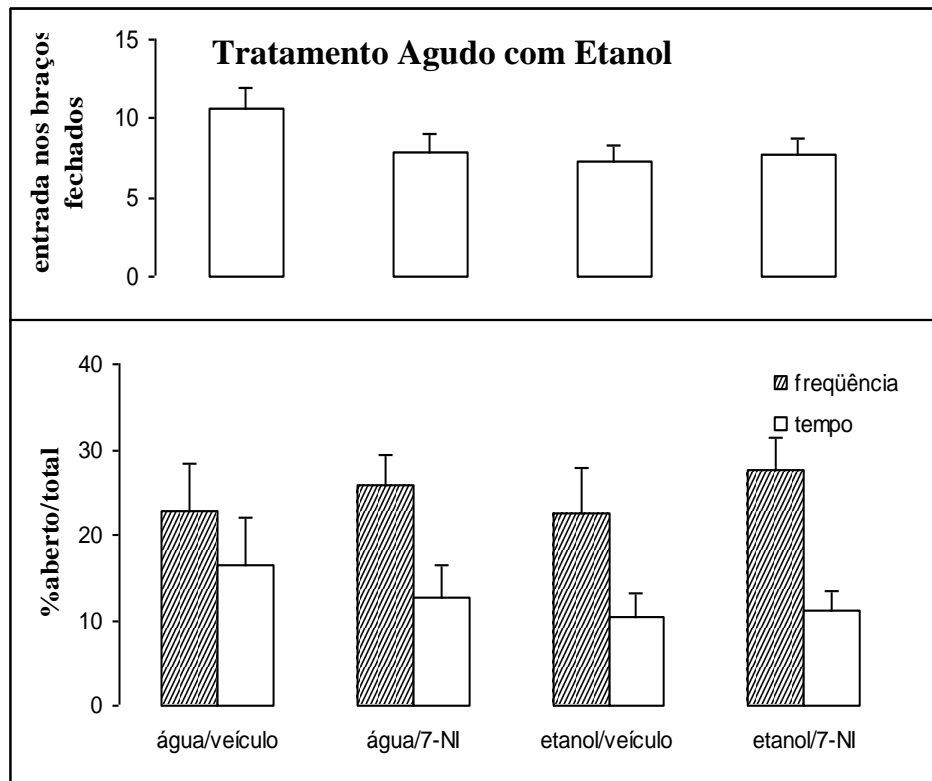
ANOVA multifatorial para bebida (água x etanol), tempo de tratamento (agudo e crônico) e droga administrada (salina x L-NAME x veículo x 7-NI) mostrou que não foram observadas diferenças significativas entre as três variáveis analisadas em relação aos fatores tempo (FF:  $F_{1,148}=0,0004$ ;  $p>0,05$ ; %FA:  $F_{1,148}=0,269$ ;  $p>0,05$ ; %TA:  $F_{1,148}=2,43$ ;  $p>0,05$ ) e droga administrada (FF:  $F_{3,148}=0,3$ ;  $p>0,05$ ; %FA:  $F_{3,148}=1,709$ ;  $p>0,05$ ;  $F_{3,148}=0,6894$ ;  $p>0,05$ ). No que se refere ao fator bebida foram encontradas diferenças significativas na %FA ( $F_{1,148}=5,691$ ,  $p<0,05$ ) e %TA ( $F_{1,148}=6,869$ ,  $p<0,05$ ), mas não na FF ( $F_{1,148}=1,796$ ,  $p>0,05$ ). Houve interação em relação à variável %FA, mas não em relação a %TA e FF, entre os fatores tempo x bebida (FF:  $F_{1,148}=0,148$ ,  $p>0,05$ ; % FA  $F_{1,148}=6,083$ ,  $p<0,05$ ; %TA  $F_{1,148}=1,99$ ,  $p>0,05$ ) e droga x bebida (FF:  $F_{3,148}=1,044$ ,  $p>0,05$ ; % FA:  $F_{1,148}=6,083$ ,  $p<0,05$ ; %TA:  $F_{3,148}=1,044$ ,  $p>0,05$ ). Não houve interação entre os fatores Tempo e Droga nas três variáveis analisadas (FF:  $F_{3,148}=0,891$ ,  $p>0,05$ ;  $F_{3,148}=0,092$ ,  $p>0,05$ ; %TA:  $F_{3,148}=0,121$ ,  $p>0,05$ ). Houve interação entre os fatores Tempo x Droga x Bebida em relação a FF ( $F_{3,148}=2,797$ ,  $p<0,05$ ), mas não a %FA ( $F_{3,148}=0,994$ ,  $p>0,05$ ) e a %TA ( $F_{3,148}=2,291$ ,  $p>0,05$ ).

Considerando-se os resultados de interação entre os diferentes fatores, foi realizada ANOVA de uma via dos animais submetidos ao tratamento agudo com etanol. Não houve

diferenças significativas entre os controles (que beberam apenas água) em relação à FF ( $F_{3,37}=0,797$ ;  $p>0,05$ ) assim como na %FA ( $F_{3,37}=0,119$ ,  $p>0,05$ ) e da %TA ( $F_{3,37}=0,928$ ,  $p>0,05$ ). Da mesma forma, ANOVA de uma via dos animais dos grupos etanol demonstrou que não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à FF ( $F_{3,34}=2,064$ ;  $p>0,05$ ) assim como na %FA ( $F_{3,34}=1,466$ ,  $p>0,05$ ) e da %TA ( $F_{3,34}=0,178$ ,  $p>0,05$ ) (figuras 7 e 8).

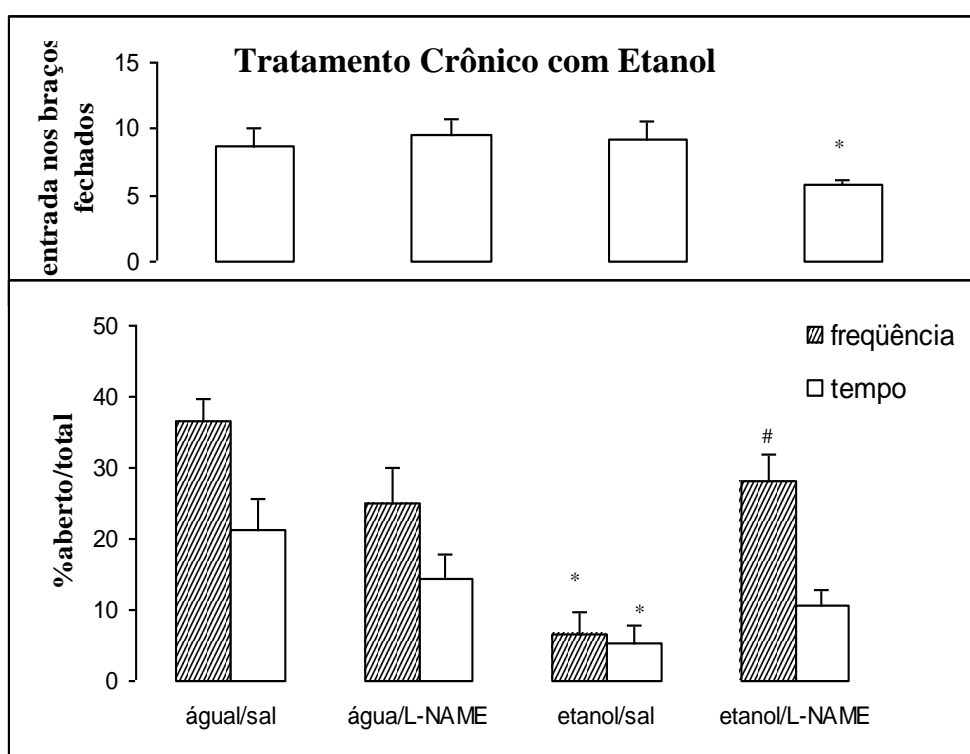


**Figura 7: Abstinência de 48 horas ao etanol 6% administrado agudamente seguido da administração intra NDR de L-NAME.** Os animais foram submetidos ao modelo de consumo agudo de etanol, no qual tiveram como única bebida disponível água ou etanol 6% por 2 horas. Terminado esse período foram submetidos a 48 horas de abstinência, onde a única bebida disponível era água para todos os grupos. Após a abstinência, os ratos receberam microinjeções no NDR de L-NAME (100 nmoles) ou salina e, em seguida, foram testados LCE. (ANOVA de uma via para os grupos água (salina x L-NAME) e para os grupos etanol (salina x L-NAME), seguida de Tukey).



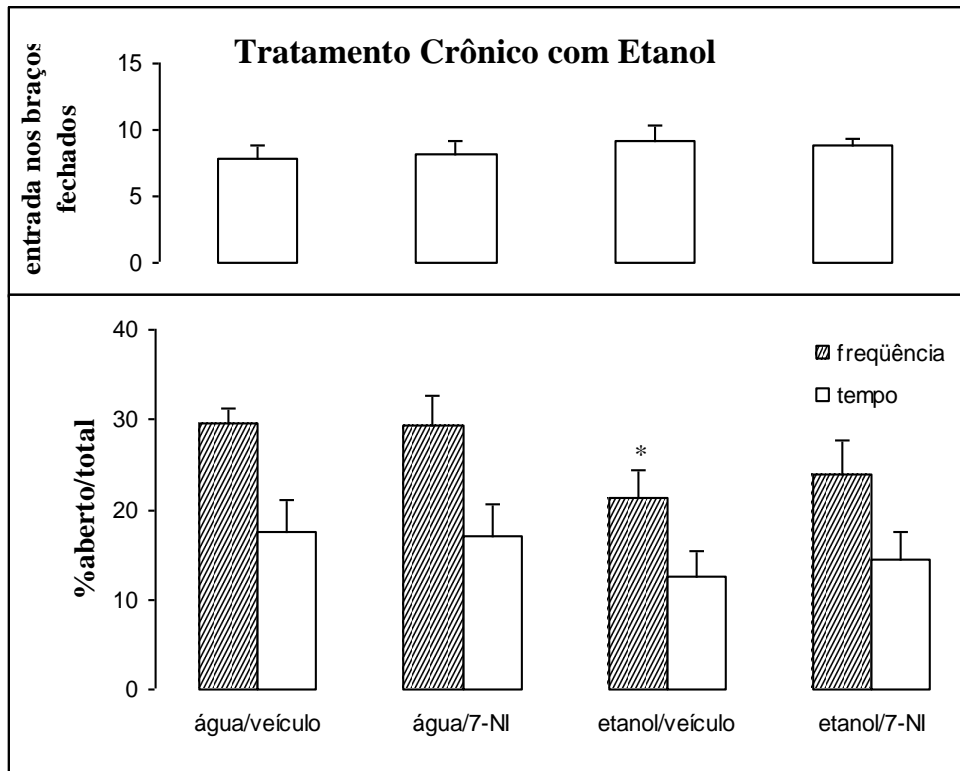
**Figura 8: Abstinência de 48 horas ao etanol 6% administrado agudamente seguido da administração intra NDR de 7-NI.** Os animais foram submetidos ao modelo de consumo agudo de etanol seguido de abstinência de 48 horas como descrito na figura 7. Após a abstinência, os ratos receberam microinjeções no NDR de 7-NI (5 nmoles) ou veículo e, em seguida, foram testados no LCE. (ANOVA de uma via para os grupos água (veículo x 7-NI) e para os grupos etanol (veículo x 7-NI), seguida de Tukey).

Em relação aos animais submetidos ao tratamento crônico com etanol, ANOVA de uma via comparando os grupos etanol/salina e etanol/veículo com os etanol/L-NAME e etanol/7-NI, mostrou uma diminuição significativa na FF ( $F_{3,42}=2,948$ ;  $p<0,05$ ) e na %FA ( $F_{3,42}=4,287$ ;  $p<0,05$ ) dos grupos etanol/salina e etanol/veículo em comparação com os etanol/L-NAME e etanol/7-NI, respectivamente. Esta diminuição não ocorreu em relação a %TA ( $F_{3,42}=1,836$ ;  $p>0,05$ ). A análise *post-hoc* de Tukey mostrou um aumento significativo da %FA do grupo etanol/L-NAME em relação ao etanol/salina ( $p<0,05$ ), porém este aumento não foi confirmado para o grupo etanol/7-NI quando comparado com o etanol/veículo ( $p>0,05$ ). A alteração na FF não foi observada nesta análise (figuras 9 e 10).



**Figura 9: L-NAME administrado no NDR de ratos reverteu o efeito ansiogênico induzido pela abstinência ao etanol após consumo crônico (21 dias).** Os animais foram submetidos ao modelo do consumo crônico de etanol, no qual tiveram como única bebida disponível água ou etanol 6% durante 21 dias. Terminado esse período foram submetidos a 48 horas de abstinência, onde a única bebida disponível era água para todos os grupos. Após a abstinência, os ratos receberam microinjeções no NDR de L-NAME ou salina e, em seguida, foram testados no LCE. (t de Student, comparando água/salina com etanol/salina; e ANOVA de uma via comparando etanol/salina com etanol droga/L-NAME, seguido de Tukey). O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (água/sal). ( $p<0,05$ ). O # indica diferença significativa em relação ao grupo etanol/ sal





**Figura 10: 7-NI administrado no NDR de ratos falhou em reverter o efeito ansiogênico induzido pela abstinência ao etanol após consumo crônico (21 dias).**

Os animais foram submetidos ao modelo do consumo crônico de etanol, no qual tiveram como única bebida disponível água ou etanol 6% durante 21 dias. Terminado esse período foram submetidos a 48 horas de abstinência, onde a única bebida disponível era água para todos os grupos. Após a abstinência, os ratos receberam microinjeções no NDR de 7-NI ou veículo e, em seguida, foram testados no LCE. (t de Student, comparando água/veículo com etanol/veículo; e ANOVA de uma via comparando etanol/veículo com etanol droga/7-NI, seguido de Tukey). O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (água/veículo). (p<0,05).

## VII- DISCUSSÃO

O consumo crônico de bebidas alcoólicas pode levar a dependência física e emocional que é caracterizada pela síndrome de abstinência incluindo, além dos sintomas somáticos (tremores, agitação, taquicardia, náuseas e convulsões), distúrbios emocionais, em particular, altos níveis de ansiedade, os quais estão relacionados com a recaída após períodos prolongados sem a droga (Koob e Bloom, 1988; Laranjeira et al, 2000; Zhao et al, 2007).

Modelos de etilismo crônico com roedores têm sido utilizados no estudo da ansiedade gerada pela abstinência ao etanol (Wetterling e Junghanns, 2000; Driessen et al, 2001; Lippas et al, 2002; Cabral et al, 2006; Overstreet et al, 2006). Neste sentido, diversos trabalhos com ratos tratados cronicamente com etanol e submetidos ao LCE após a retirada têm mostrado o efeito ansiogênico da abstinência (Kliethermes, 2005). Nestes modelos, vários períodos de abstinência têm sido adotados com o intuito de induzir estas alterações comportamentais e/ou neuroquímicas (para revisão ver Kliethermes, 2005; Cabral et al, 2006; Jung et al, 2000; Pokk et al, 2001; Zhang et al, 2007; Zhao et al, 2007).

Em nosso estudo a abstinência de 24 horas ao etanol consumido cronicamente não foi suficiente para induzir uma síndrome de abstinência detectável no LCE. Ao contrário, após este período sem a droga os animais tratados com etanol apresentaram uma tendência a uma maior atividade exploratória nos braços abertos em comparação com o grupo controle, sugerindo um possível efeito ansiolítico da droga (figura 4).

Sabe-se que a exposição ao etanol está relacionada, dependendo da dose e do tempo, com efeitos ansiolíticos decorrentes, principalmente, da potencialização da neurotransmissão mediada pelo GABA sobre receptores GABA<sub>A</sub> e prejuízo da neurotransmissão mediada pelo GLU sobre receptores NMDA, levando a uma depressão do SNC (Eckardt et al, 1998; Krystal, 2003). Assim, uma possível explicação para o efeito ansiolítico do etanol após as 24 horas de abstinência seria que este efeito depressor do etanol sobre o SNC persistiria por algum tempo após a eliminação da droga no sangue, uma vez que as análises bioquímicas do sangue após 24 horas de abstinência não detectaram níveis relevantes de etanol (figura 3).

Devido a estes resultados, modificamos o protocolo experimental aumentando o período de abstinência de 24 para 48 horas, como descrito por Cabral et al (2006). Esses pesquisadores observaram um aumento da ansiedade no LCE de ratos tratados 21 dias com

etanol e submetidos posteriormente a este período de abstinência. Neste estudo, a concentração de etanol utilizada foi de 6-8% (v/v) administrada com sustentagem (dieta líquida).

Assim como no trabalho de Cabral et al (2006), observamos um efeito ansiogênico após abstinência de 48 horas ao etanol 6% ou 9% consumido cronicamente.

O efeito ansiogênico da abstinência por 48 horas foi evidenciado por uma redução significativa na atividade exploratória geral no LCE, refletida por uma diminuição no número de entradas nos braços fechados, assim como na porcentagem de entradas e tempo despendido nos braços abertos em comparação com o grupo controle (figura 5). Estes resultados estão de acordo com outros estudos da literatura, nos quais foi observada uma diminuição da atividade geral no LCE dos animais em abstinência ao etanol após consumo crônico da bebida (Kliethermes, 2005; Pokk et al, 2001; Zhang et al, 2007). Zhang et al (2007) acreditam que a diminuição do tempo gasto nos braços abertos durante a abstinência ao etanol reflete uma potencialização da ansiedade devido a retirada do mesmo, enquanto que a diminuição do número de entradas tanto nos braços abertos quanto nos fechados estaria relacionada com uma hipoatividade gerada pela abstinência ao etanol. Tal hipoatividade poderia ser explicada como possíveis alterações do sistema locomotor do animal, refletindo-se numa dificuldade locomotora causada pelo etanol. Entretanto, esta não parece ser a explicação mais adequada para os resultados observados em nosso estudo, visto que a redução significativa da frequência de entradas nos braços fechados nos animais em abstinência comparados com o grupo controle, não foi igualmente observada nos animais em abstinência submetidos ao protocolo experimental descrito para o estudo 2 (tratamento com solução de etanol 6% por 21 dias, seguido de 48 horas de abstinência e, após abstinência, administração 7-NI ou L-NAME intra-NDR 5 minutos antes do teste do LCE)(figuras 9 e 10).

Por outro lado, o consumo agudo de etanol não apresentou alterações nos níveis de ansiedade e na atividade geral dos animais tratados em comparação ao grupo controle, reforçando a hipótese de que o aumento da ansiedade causado pela retirada do etanol ocorre após consumo crônico e não agudo dessa bebida (figuras 6, 7 e 8). Deste modo, validamos a metodologia do nosso trabalho, onde a abstinência de 48 horas do uso crônico de etanol (21 dias) resulta numa resposta ansiogênica avaliada no LCE. Embora ambas as soluções de etanol 6% e 9% terem demonstrado um aumento da ansiedade na abstinência de 48 horas, optamos por trabalhar com a menor concentração de solução de etanol (6%).

Apesar do grande número de estudos sobre o efeito ansiogênico da abstinência ao etanol (Kliethermes, 2005), os sítios cerebrais e os neurotransmissores envolvidos na

mediação desta resposta de ansiedade ainda não foram completamente elucidados. Diversos estudos têm mostrado que o uso crônico de bebidas alcoólicas leva a mudanças nas neurotransmissões mediadas por 5-HT, GABA, glutamato e NO no SNC (Heinz et al, 1998; Evrard et al, 2006; Overstreet et al, 2006). Neste sentido, utilizando-se modelos animais, foi detectado envolvimento da neurotransmissão nitrérgica em resposta a abstinência do consumo crônico de etanol (Vassiljev et al, 1998; Pokk et al, 2001; Davis e Syapin, 2005). O NDR é uma importante região envolvida na gênese da ansiedade (Deakin e Graeff, 1991; Graeff et al, 1996) e possui grande quantidade da isoforma neuronal da enzima Sintase do NO (nNOS).

Assim, para verificarmos possíveis efeitos do NO no NDR durante a abstinência de 48hrs. do etanol consumido cronicamente (21 dias), administramos inibidores da nNOS, o L-NAME e o 7-NI, diretamente no NDR. O L-NAME tem atividade não seletiva para as diferentes isoformas da NOS, enquanto o 7-NI é seletivo para a nNOS.

Igualmente ao observado no estudo de validação metodológica, ratos tratados com salina intra-NDR, após abstinência de 48 horas de etanol consumido cronicamente, demonstraram nível elevado de ansiedade quando testados no LCE. Estes animais permaneceram mais tempo nos braços fechados e entraram menos vezes nos braços abertos do LCE, quando comparados ao controle. A redução do tempo de permanência nos braços abertos não pode ser atribuída a alterações inespecíficas na atividade motora, causadas pelo tratamento com etanol, uma vez que a frequência de entradas nos braços fechados nos animais em abstinência não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com os animais controle. A administração intra-NDR de L-NAME reverteu este efeito ansiogênico da abstinência ao etanol (figura 9), sugerindo a participação do NO no NDR na gênese da ansiedade relacionada com retirada da droga

O consumo de etanol tem propriedades reforçadoras positivas, promovendo ambas euforia branda e redução da percepção da ansiedade e a sua retirada abrupta neutraliza este efeito reforçador levando a uma experiência aversiva (Koob e Bloom, 1988). Deste modo, a abstinência ao etanol apresenta a característica de um estressor incontrolável e, assim, podemos sugerir que este estresse promovido pela retirada do etanol estaria relacionado com um aumento do NO no NDR, uma vez que estudos têm mostrado que neurônios positivos para a nNOS estão presentes em grandes concentrações no NDR e esta enzima é ativada em situações estressantes (Guimarães et al, 2005; Beijamini e Guimarães, 2006). Nesse sentido, Grahn et al (2000), utilizando o modelo de desamparo aprendido, demonstraram que o L-NAME (18nmols) intra-NDR foi capaz de reverter déficits no escape induzido por exposição

prévia de choques inescapáveis na cauda quando administrado antes do teste. Sugerindo que a abstinência, que seria um estresse incontrollável, levaria a um aumento na liberação de glutamato no NDR, que por sua vez aumentaria a síntese e a concentração de NO neste núcleo durante retirada, onde o NO pode atuar modulando ou promovendo a liberação de neurotransmissores levando aos efeitos comportamentais.

Além disto, o etanol, como citado anteriormente, interfere em diversos sistemas de neurotransmissores no SNC e o seu consumo crônico pode levar a alterações neuroadaptativas tais como, um aumento na densidade de receptores excitatórios NMDA e uma diminuição na densidade de receptores inibitórios GABA<sub>A</sub>, as quais contribuem para uma hiperexcitabilidade observada no SNC durante a retirada da droga (Faingold et al, 1998; White et al, 2000; Krystal, 2003; Cagehi et al, 2003). A neurotransmissão serotoninérgica do NDR é fortemente modulada por aferências GABAérgicas e glutamatérgicas, deste modo as alterações neuroadaptativas envolvidas com estes neurotransmissores na abstinência ao etanol podem afetar a liberação de 5-HT pelo NDR (Tao e Auerbach, 2000 e 2003) . Nesse sentido, o possível aumento do NO no NDR durante a abstinência ao etanol pode estar associado a potencialização da neurotransmissão de GLU sobre receptores de NMDA neste núcleo, pois quando o receptor NMDA é ativado, ocorre influxo de Ca<sup>2+</sup> para o citosol onde se liga a calmodulina e, este complexo ativa a nNOS que produz o NO (Barañano et al, 2001). O NO aumentado, por sua vez, poderia regular a liberação de GLU, GABA e 5-HT resultando em um complexo efeito sobre as diferentes funções cerebrais moduladas pelo NDR, entre elas os processos relacionados com a emoção.

Em outro grupo experimental, ratos tratados com veículo (salina + 20% DMSO) intra-NDR, após abstinência de 48 horas de etanol consumido cronicamente, apresentaram uma resposta ansiogênica quando testados no LCE. Estes animais entraram menos vezes nos braços abertos do LCE quando comparados ao controle (água/veículo), apesar do tempo despendido nestes braços não foi diferente entre o grupo etanol em relação ao grupo controle (figura 10).

Embora tenha sido observado efeito da abstinência ao etanol nos animais tratados com veículo, o tratamento com 7-NI intra-NDR não foi capaz de reverter o efeito ansiogênico da retirada do etanol, efeito este observado pela ausência de diferença em relação aos grupos controle (água/veículo e etanol/veículo) quanto a porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados.

A explicação para este resultado não é clara. Dados da literatura mostram que a administração de 7-NI diretamente no NDR de ratos (Spiacci et al, 2008) ou periféricamente a animais submetidos ao consumo crônico de etanol (Vassiljev et al, 1998) é capaz de diminuir os níveis de ansiedade. Em nosso estudo é possível que estes efeitos ansiolíticos do 7-NI tenham sido mascarados por um possível efeito ansiolítico do veículo utilizado na diluição deste fármaco, o DMSO. O DMSO é um solvente bastante utilizado na diluição de fármacos, apresentando nenhum ou pouco efeito biológico. Vários trabalhos na literatura utilizam concentrações de até 100% para diluição desses compostos como o próprio 7-NI (Marcen, 1998; Spolidório et al, 2007; Spiacci et al, 2008), nos quais não foram observadas alterações nos parâmetros analisados. Entretanto, em concentrações mais elevadas este composto poderia interferir nas respostas estudadas, como por exemplo no modelo por nós utilizado. Em nosso estudo, observamos que a linha de base da atividade exploratória dos animais tratados com etanol e que receberam o tratamento intra-NDR com Veículo (salina+20% DMSO) foi maior quando comparada a de animais do grupo Etanol/salina. Assim, embora tenhamos observado uma diminuição na atividade exploratória dos animais em abstinência ao etanol e tratados com veículo (grupo etanol/veículo), essa diminuição pode ser considerada discreta, quando observamos as alterações induzidas pela abstinência no grupo etanol/salina (figura 9). Para esclarecer essa dúvida, serão necessários novos estudos nos quais seja utilizada uma concentração menor de DMSO, ou ainda outro solvente para a diluição deste fármaco. Uma segunda possibilidade seria a utilização de outros inibidores da nNOS, como NPLA (Miguel e Nunez-de-Souza, 2008).

Outra explicação para os resultados observados após o tratamento com 7-NI está relacionada à dose utilizada. Em nosso estudo selecionamos uma dose de 7-NI que não apresentou efeitos ansiolítico ou ansiogênico em estudos realizados por Spiacci et al (2008). Quando realizada a administração local de diferentes compostos, vários fatores como densidade populacional e de receptores, concentração e condições experimentais são determinantes na resposta comportamental observada. Isso posto, é possível que a interação entre estes fatores com o consumo crônico de etanol seguido de abstinência do mesmo, tenham resultado em um cenário neurobiológico diferente do cenário anteriormente observado por Spiacci et al (2008). Assim, é possível que doses maiores de 7-NI sejam necessárias para reverter as alterações comportamentais induzidas pela abstinência ao etanol.

Um último aspecto que não pode ser desconsiderado é a importância da ativação da nNOS em animais submetidos ao modelo de abstinência ao etanol. É possível que a outros

fatores contribuam com peso maior do que ativação da nNOS nessas condições, como por exemplo a iNOS e outros mediadores relacionados à neurodegeneração induzida pelo consumo crônico de etanol.

Dependendo da dose e do tempo, o consumo crônico de etanol está associado com significativa atrofia do tecido cerebral, degradação de axônios e morte celular (Rosenbloom. et al, 2003). Estudos com modelos animais têm demonstrado que mesmo a breve exposição ao etanol já é capaz de produzir degeneração de neurônios (Blanco e Guerri, 2007) e, estes efeitos deletérios do etanol estão relacionados com processos inflamatórios. Trabalhos demonstram que o consumo crônico de bebidas alcoólicas pode levar a um aumento na produção de citocininas, fatores pró-inflamatórios, os quais ativam macrófagos, no caso do SNC micróglia e/ou astrócitos, que induzem a formação de mediadores inflamatórios, entre eles a iNOS (Blanco e Guerri, 2007; Bal-Price e Brown, 2001). Esta enzima ativada é capaz de produzir elevada concentração de NO que podem atuar como neurotransmissores e/ou radicais livres, os quais produzem injúrias teciduais (Bal-Price e Brown, 2001).

Neste sentido, Oin et al (2008) demonstraram que a exposição crônica ao etanol promove um aumento de citocininas pró-inflamatórias no soro, fígado e encéfalo de camundongos, o qual está relacionado com processos inflamatórios e danos causados por estresse oxidativo nestes órgãos. Corroborando estes resultados, Yuan et al (2006) mostraram severo dano no tecido hepático, especialmente necroinflamação, associado ao aumento da expressão da isoforma induzida da NOS, a iNOS, após consumo prolongado de etanol.

Assim, a ativação da enzima iNOS durante a retirada do etanol pode ter contribuído para um possível aumento de NO no NDR. A utilização de inibidores específicos para iNOS administrado no NDR em um protocolo experimental semelhante ao utilizado neste estudo poderia elucidar a participação desta enzima, no NDR, sobre os efeitos ansiogênicos da retirada do etanol consumido cronicamente.

Em resumo, os resultados mostraram que o tratamento intra-NDR com L-NAME mas não com 7-NI atenuou os efeitos comportamentais da abstinência ao etanol, sugerindo o envolvimento do NO no NDR na ansiogênese induzida pela abstinência ao etanol. Estudos são necessários para identificar quais isoformas da NOS são ativadas durante a abstinência ao etanol e, como o NO influencia nos efeitos deletérios da retirada.

## VIII CONCLUSÕES

- A abstinência de 48 horas do etanol promove efeitos ansiogênicos significativos em ratos submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado.
- A administração intra-NDR com L-NAME mas não com 7-NI atenua os efeitos comportamentais da abstinência ao etanol.



## IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION . Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM IV), 4th edition, 2000. Washington DC, **American Psychiatric Association**. 2000.

BAL-PRICE, A., BROWN, G.C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 17 p. 6480-91, 2001

BARAÑANA, D.E.; FERRIS, C. D.; SNYDER, S. H. Atypical neural messengers. **Trends in Neurosci.**, v. 24, n. 2, p. 99-106, 2001

BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. Activation of neurons containing nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Res. Bull.**, v. 69, p. 347-355, 2006.

BERMOND II, D. M.; TOSE, H. Consumo de bebidas alcoólicas: interpretações com o benzeno e outras substâncias de uso ocupacional. **Rer. Psiq. Clin.**, v. 27, n. 2, 2000.

BLANCO, A.M.; GUERRI, C. Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors. **Front. Biosci.**, v 12, p. 2616-30, 2007.

BHAVE, S.B.; HOFFMAN, P.L. Ethanol Promotes Apoptosis in Cerebellar Granule Cells by Inhibiting the Trophic Effect of NMDA. **J. Neurochem.**, v. 68, n. 2, p. 578-86, 1997.

BREDT, D.S., HWANG, P.M., SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n 6295, p. 768-70, 1990.

BRUHMYLER, J.; CHLEIDE, E.; LIÉGEOIS, J. F.; CARREER, F. Nitric Oxide: A New Messenger in the Brain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.17, p.373-384, 1993.

CABRAL, A.; ISOARDI, N.; SALUM, C.; MACEDO, C. E.; NOBRE, M. J.; MOLINA, V. A.; BRANDÃO, M. L. Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG. **Exp. Neurology**, v. 200. p. 200-208, 2006.

CAGETTI, E.; LIANG, J.; SPIGELMAN, I. Withdrawal from chronic intermittent changer subunit composition, reduces synaptic function, and decrease behaviorl responses to positive allosteric modulators of GABA<sub>A</sub> receptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 63, p. 53-64

CARLINI, E. A.; GALDUROZ, J. C .F.; NOTO, A. R.; NAPPO, S.A. I Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil – 2002. **Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas** – Departamento de Psicologia da Escola Paulista de Medicina e SENAD – Secretaria Nacional Antidrogas, Presidência da República, Gabinete de Segurança Nacional, 2002.

Classificação de transtornos mentais e de comportamento, 10º edição (CID-10), **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS)**, 1993. Disponível em [http://www.psicologia.com.pt/instrumentos/dsm\\_cid/](http://www.psicologia.com.pt/instrumentos/dsm_cid/)

CZECH, D. A.; JACOBSON, E. B.; LESUEUR-REED, K. T.; KAZEL, M. R. Putative anxiety-linked effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME en three murine exploratory behavior models. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, p. 741-748, 2003.

DAVIS, R. L.; SYAPIN, P. J. Interactions of alcohol and nitric-oxide synthase in the brain. **Brain Res. Rev.**, v. 49, p. 494-504, 2005.

DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M.D. use of the plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **TIPS**, v. 16, p. 33-36, 1995.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric Oxide actions in neurochemistry. **Neurochem. Int.**, v. 29, n. 2, p. 97- 110, 1996.

DEAKIN, J.F.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J. Psychopharmacol.**, v. 5, p. 305-315, 1991.

DE OLIVEIRA, R. M. W.; DELBEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. **Neurosci Biobehav. Rev.**, v. 25, p. 679-685, 2001.

DE OLIVEIRA, R. W ; GUIMARAES, F. S. . Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 1529-1532, 1999.

DEPETRILLO, P.B.; MCDONOUGH, M.K. AWS and the AWS tipology. In: **Alcohol Withdrawal Treatment Manual**, New York: Adobe Trade markers, p. 7-17, 1999.

DIANA, M.; PISTIS, M.; GESSA, G., CARBONI S, GESSA GL, ROSSETTI, Z.L. Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 90, n. 17, p. 7966-9, 1993.

DRIESSEN, M.; MEIER, S.; HILL, A.; WETTERLING, T.; LANGE, W.; JUNGHANNS, K. The Course of Anxiety, Depression and Drinking Behaviours After Completed Detoxification in Alcoholics With and Without Comorbid Anxiety and Depression Disorders. **Alcohol & Alcoholism**, v. 36, n. 3, p. 249-255, 2001.

ECKARDT MJ, FILE SE, GESSA GL, GRANT KA, GUERRI C, HOFFMAN PL, KALANT H, KOOB GF, LI TK, TABAKOFF B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 22, n. 5, p. 998-1040, 1998.

EŞEL, E. Neurobiology of alcohol withdrawal inhibitory and excitatory neurotransmitters. **Turk Psikiyatri Derg.**, v. 17, n. 2, p.129-37, 2006.

ESTEBAN, S.; MORANTA, D.; SASTRE-COLL, A.; MIRALLES, A.; GARCÍA-SEVILLA, J.A. Withdrawal from chronic ethanol increases the sensitivity of presynaptic 5-HT(1A) receptors modulating serotonin and dopamine synthesis in rat brain in vivo. **Neurosci. Lett.**, v. 326, n. 2, p. 121-4, 2002.

EVARD, S. G.; DUHALDE-VEGA, M.; TAGLIAFERRO, P.; MIROCHNIC, S.; CALTANA, L. R.; BRUSCO, A. A low chronic ethanol exposure induces morphological changes in the adolescent rat brain that are not fully recovered even after a long abstinence: An immunohistochemical study. **Exp. Neurol.**, v. 200, p. 438-459, 2006.

FAINGOLD, C.L.; N'GOUEMO, P.; RIAZ, A. Ethanol and neurotransmitter interactions--from molecular to integrative effects. **Prog. Neurobiol.**, v. 55, n. 5, p. 509-35, 1998.

FILE, S.E.; BALDWIN, H.A.; HITCHCOTT, P.K. Flumazenil but not nitrendipine reverses the increased anxiety during ethanol withdrawal in the rat. **Psychopharmacol. (Berl)**, v. 98, n. 2, p. 262-4, 1989.

FILHO, F. R.; ZILBERSTEIN, B. Nitric oxide: the simple messenger passing through complexity. Metabolism, synthesis and functions. **Ver. Assoc. Méd. Bras.** v. 46, n. 3, p. 265-71, 2000.

FONTES, A.; FIGLIE, N. B.; LARANJEIRA, R. O Comportamento de beber entre dependentes de álcool: estudo de seguimento. **Rev. Psiqu. Clin.**, v. 33, n. 6, p. 304-312, 2006.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**; v. 288 n. 5789, p. 373-6, 1980.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C. M. Nitric Oxide signaling in the central nervous system. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 683-706, 1995.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**; v. 336, n. 6197, p.385-8, 1988.

GATCH, M.B.; WALLIS, C.J.; LAL, H. Effects of NMDA antagonists on ethanol-withdrawal induced "anxiety" in the elevated plus maze. **Alcohol**. v. 19, n. 3, p. 207-11, 1999.

GIGLIOTTI A.; BESSA. M. A. Síndrome de Dependência do Álcool: critérios diagnóstico. **Rev. Bras. Psiquiatr.**; v. 26, N. 2, p.:III-V, 2004.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; DE ANDRADE, T. G. C. S.; DEAKIN, J. F. W. Role of 5-HT in Stress, Anxiety, and Depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 54, n. 1, p. 129-141, 1996.

GRAHN, R.E.; WILL, M.J.; HAMMACK, S.E.; MASWOOD, S.; MCQUEEN, M.B.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. **Brain Res.**, v. 826, n. 1, p. 35-43, 1999.

GRAHN, R. E.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Impaired escape performance and enhanced conditioned fear in rats following exposure to an uncontrollable stressor are mediated by glutamate and nitric oxide in the dorsal raphe nucleus. **Behav. Brain Res.**, v. 112, p. 33-41, 2000

GREEN, L.C.; RUIZ DE LUZURIAGA, K.; WAGNER, D.A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; OUNG, V.R.; TANNENBAUM, S.R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Nat.l Acad. Sci. U S A.**, v.78, n. 12, p. 7764-8, 1981 a.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n 4490, p 56-8, 1981 b.

GUIMARÃES, F. S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; LUCCA, A. C. B. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neurosci. Biobehav. Rev.** , v. 29, p. 1313-1322, 2005.

GUIMARÃES FS, CAROBREZ AP, DE AGUIAR JC, GRAEFF FG. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacol. (Berl)**. v. 103, n. 1, p. 91-4, 1991.

HAYNES, J. C.; FARRELL, M.; SINGLETON, N.; MELTZER, H.; ARAYA, R.; LEWIS, G.; WILES, N. J. Alcohol consumption as a risk factor for anxiety and depression. **Brit. J. Psychiatry.**, v. 187, p 544-551, 2005.

HEINZ, A.; REGAN, P.; JONES, D. W.; HOMMER, D.; WILLIAMS, W.; KNABLE, M. B.; GOREY, J. G.; DOTY, L.; GEYER, C.; LEE, K. S.; COPPOLA, R.; JUNG, M.E.;WALLIS, C.J.; GATCH, M.B., LAL, H. Abecarnil and alprazolam reverse anxiety-like behaviors induced by ethanol withdrawal. **Alcohol**, v. 21, p. 161-168, 2000

HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 473-6, 1987.

IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.E.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.**, v. 61, n. 6, p. 866-79, 1987.

JOHNSON, B. A. Progress in the development of topiramate for treating alcohol dependence: from a hypothesis to a proof-of-concept study. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 28, p. 1137-1144. 2004

HORNUNG, J-P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 26, n. 4, p.331-43, 2003

KNAPP, D.J.; OVERSTREET, D.H.; BREESE, G.R. Modulation of ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior during later withdrawals by treatment of early withdrawals with benzodiazepine/gamma-aminobutyric acid ligands. **Alcohol Clin. Exp. Res. Apr.**; v. 29, n. 4, p. 553-63, 2005.

KLIETHERMES, C.L. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. **Neurosci Biobehav. Rev.**, v. 28, p. 837-850, 2005

KRYSTAL, J.H.; PETRAKIS, I.L.; MASON G.; TREVISAN, L.; D'SOUZA, D.C. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. **Pharmacol. Ther.**, v. 99, n. 1, p. 79-94, 2003.

KOOB, G.F.; BLOOM, F.E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242, p. 715-723, 1988.

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science**, 278, 52-58, 1997

KOOB, G.F.; NESTLER, E.J. The neurobiology of drug addiction. **J. Neuropsychiatry. Clin. Neurosci.**, v. 9, p. 482-497, 1997.

LARANJEIRA, R.; NICASTRI, S.; JERÔNIMO, C.; MARQUES, A.C. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SSA) e o seu tratamento. **Rev. Bras Psiquiatr**; v. 22, n. 2, p. 62-71, 2004.

LECHIN, F.; VAN DER DIJS, B.; HERNÁNDEZ-ADRIÁN, G. Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: relevance for neuropharmacological therapy. **Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.**, v. 30, n. 4, p. 565-85, 2006.

LEE, H.; JEONG, J.; SON, E.; MOSA, A.; CHO, G.J.; CHOI, W.S.; HÁ, J.H.; KIM, I.K.; LEE, M.G.; KIM, C.Y.; SUK, K. Ethanol selectively modulates inflammatory activation signaling of brain microglia. **J. Neuroimmunol.**, v.156, n. 1-2, p. :88-95, 2004.

LÉGER, L.; GAY, N.; BURLET, S.; CHARNAY, Y.; CESPUGLIO. Localization of nitric oxide-synthesizing neurons sending projections to the dorsal raphe nucleus of the rat. **Neurosci. Letters**, v. 257, p. 147-150, 1998.

LIAPPAS, J.; PAPARRIGOPOULOS, T.; TZAVELLAS, E.; CHRISTODOULOU, G. Impact of alcohol detoxification on anxiety and depressive symptoms. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 68, p. 215-220, 2002.

LINGFORD-HUGHE, A.R.; ACTON, P.D.; GACINOVIC, S.; SUCKLING, J.; BUSATTO, G.F.; BODDINGTON, S.J.; BULLMORE, E.; WOODRUFF, P.W.; COSTA, D.C.; PILOWSKY, L.S.; ELL, P.J.; MARSHALL, E.J.; KERWIN, R.W. Reduced levels of GABA-benzodiazepine receptor in alcohol dependency in the absence of grey matter atrophy. **Br. J. Psychiatry**, v. 173, p. 116-22, 1998.

MACIEIRA, M. S.; SILVA, E. A.; ALMEIDA, W. G.; NAKAMURA-PALACIOS, E. M.; VASQUEZ, E. C. Efeitos da Administração Crônica do Álcool sobre os Mecanismos Neurais de Regulação da Pressão. **Arterial. Arq. Bras. Cardiol.**, v. 68, n. 3, p. 149-154, 1997.

MAJOR, L.F.; HAWLEY, R.J.; LINNOILA, M. The role of the central noradrenergic nervous system in the mediation of the ethanol intoxication and ethanol withdrawal syndrome. **Psychopharmacol. Bull.**, v. 20, p. 487-493, 1984

MAREN, S. Effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, on locomotor activity and contextual fear conditioning in rats. **Brain Res.**, v. 804, n°. 1, p. 155-158, 1998.

MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; ENGAR, R.; LEAF, C.D.; WISHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v. 27, n. 24, p. 8706-11, 1988.

MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. "Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice." **Brain Res.**, 13:1240, P. 39-46, 2008.

NEVO, I.; HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. **Neurochem. Int.**, v. 26, n. 4, p. 305-36, 1995

NUTT, D.; GLUE, P.; MOLYNEUX, S.; CLARK, E. Alpha-2-adrenoceptor function in alcohol withdrawal: a pilot study of the effects of iv. clonidine in alcoholics and normals. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 12, p. 14-18, 1988.

QIN, L.; HE, J.; HANES, R.N.; PLUZAREV O.; HONG, J.S.; CREWS, F.T.;. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. **J. Neuroinflammation**, v. 18, p. 5:10, 2008.

OKERE, C. O.; WATERHOUSE, B. D. Activity-dependent heterogeneous populations of nitric oxide synthase neurons in the rat dorsal raphe nucleus. **Brain Res.**, v. 286, p. 117-132, 2006

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global status report on alcohol. **OMS**, Genebra, 1999. Disponível em [http://www.who.int/substance\\_abuse/pubs\\_alcohol.htm](http://www.who.int/substance_abuse/pubs_alcohol.htm)

OVERSTREET, D. H.; KNAPP, D. J.; ANGEL, R. A.; NAVARRO, M.; BREESE, G. R. Reduction in repeated ethanol-withdrawal-induced anxiety-like behavior by site-selective injections of 5-HT1A and 5-HT2D ligands. **Psychopharmacol.**, v. 187, p. 1-12, 2006.

PAXINOS, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. **Academic. Press, Inc.**, San Diego, USA. 1997

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PISTIS, M.; MUNTONI, A.L.; GESSA, G.; DIANA, M. Effects of acute, chronic ethanol and withdrawal on dorsal raphe neurons: electrophysiological studies. **Neurosci.**, v. 79, N. 1., p. 171-6, 1997.

POKK, P.; SEPP, E.; VASSILJEV, V.; VÄLI, M. The effects of de nitric oxide synthase inhibitor 7- Nitroindazole on the behaviour of mice after chronic ethanol administration. **Alcohol & Alcoholism**, v. 36, n. 3, p 193-198, 2001.



RESSTEL, L. B. M.; TIRAPELLI, C. R.; LANCHOTE, V.L.; UYEMURA, S. A.; de OLIVEIRA, A. M.; CORRÊA, F. M. A. Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. **Life Sciences**, v. 78, p. 2179-2187, 2006.

ROBERTO, M.; BAJO, M.; CRAWFORD, E.; MADAMBA, S.G.; SIGGINS, G.R. Chronic Ethanol Exposure and Protracted Abstinence Alter NMDA Receptors in Central Amygdala. **Neuropsychopharmacol.**, v. 31, p 988-996, 2006.

RODGERS, R. J.; CAO, B-J; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. J. Med. Biol.Res.**, v. 30, p. 289-304, 1997.

ROSENBLOOM, M.; SULLIVAN, E.V.; PFEFFERBAUM, A. Using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging to assess brain damage in alcoholics. **Alcohol Res. Health.**, v. 27, n. 2, p. 146-52, 2003.

SCHUCKIT, M. A. Alcohol and depression: a clinical perspective. **Acta Psychiatr. Scand Suppl**, v. 377, p. 28-32, 1994.

SPIACCI, A. Jr.; KANAMARU, F.; GUIMARÃES, F.S.; OLIVEIRA, R.M.W. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 88, p. 274-255, 2008.

SPOLIDÓRIO, P. C. M; ECHEVERRY, M. B.; IYOMASA1, M.; GUIMARÃES, F.S.; DEL BEL, A. "Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus." **Psychopharmacol.**, v. 195, p.193-192, 2007.

STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. . Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**; v. 82, n. 22, p.7738-42, 1985.

TAO, R.; AUERBACH, S.B. Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. **J. Psychopharmacol.** v. 14, n. 2, p 100-113, 2000.

TAO, R.; AUERBACH, S.B Influence of inhibitory and excitatory inputs on serotonin efflux differs in the dorsal and median raphe nuclei. **Brain Res.** v. 961, n. 1, p. 109-202, 2003.

TIRAPELLI, C.R.; AL-KHOUR, Y.J.; BKAIL, Y.G.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; LANCHOTE, V.L.; UYEMURA, S.A.; DE OLIVEIRA, A.M. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 316, n. 1, p. 41, 2006.

TIRAPELLI, C.R.; LEONE, A.F.; COELHO, E.B.; RESSTEL, L.B.; CORREA, F.M.; LANCHOTE, V.L.; UYEMURA, A.S.; PADOVAN, C.M.; DE OLIVEIRA, A.M. Effect of ethanol consumption on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 59, n. 7, p. 985-993, 2007.

TSAI, G.E.; RAGAN, P.; CHANG, R.; CHEN, S.; LINNOILA, V.M.; COYLE, J.T. Increased glutamatergic neurotransmission and oxidative stress after alcohol withdrawal. **Am J. Psychiatry.**, v. 155, n. 6, p. 726-32, 1998.

UZBAY, I.T.; ERDEN B.F.; TAPANYIGIT E.E.; KAYAALP, S.O. Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats. **Life Sci.**, v. 61, N. 22, p. 2197-209, 1997..

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

WEINBERGER, D. R.; LINNOILA, M. Reduced Central Serotonin Transporters in Alcoholism. **Am. J. Psychiatry**, v. 155, p. 1544-1549, 1998.

WEISS F, PARSONS LH, SCHULTEIS G, HYYTIÄ P, LORANG MT, BLOOM FE, KOOB GF. Ethanol Self-Administration Restores Withdrawal-Associated Deficiencies in Accumbal Dopamine and 5-Hydroxytryptamine Release in Dependent Rats. **J. Neurosci.**, v. 16, n. 10, p. 3474-85, 1996

WEISS, S. M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C.T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neurosci Biobehav. Rev.**, v. 3, p. 265-271, 1998.

WETTERLING, T., JUNGHANNS, K. Psychopathology of alcoholics during withdrawal and early abstinence. **Eur. Psychiatry**, v. 15, p. 483-488, 2000.

WHITE, A. M.; MATTHEWS, D. B.; BEST, P. J. Ethanol, Memory, and Hippocampal Function: A Review of Recent Findings. **Hippocampus**, v. 10, p. 88-93, 2000.

WILLINGER, U.; LENZINGER, E.; HORNIK, K.; FISCHER, G.; SCHÖNBECK, G.; ASCHAUER, H.N.; MESZAROS, K. Anxiety as a predictor of relapse in detoxified alcohol-dependent patients. **Alcohol Alcohol**. v. 37, n. 6, p. 609-12, 2002.

WILSON, J.; WATSON, W.P.; LITTLE, H.J. CCK(B) antagonists protect against anxiety-related behaviour produced by ethanol withdrawal, measured using the elevated plus maze. **Psychopharmacol.(Berl)**, v. 137, n. 2, p. 120-31, 1998.

ZHANG, Z.; MORSE, A.C.; KOOB, G.F.; SCHULTEIS, G. Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. **Alcoholism: Clin. Exp. Res.**, v. 31, n. 11, p. 1811-1819, 2007.

ZHAO, Y.; WEISS, F.; ZORRILLA, E. remission and resurgence of anxiety-like behavior across protracted withdrawal stages in ethanol-dependent rats. **Clin. Exp. Res.**, v. 31 n. 9, p. 1505-1515, 2007.

YUAN, G.J.; ZHOU, X.R.; GONG, Z.J.; ZHANG, P.; SUN, X.M.; ZHENG, S.H. Expression and activity of inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase correlate with ethanol-induced liver injury. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 15, p. 2375-2381, 2006.