

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

**Alterações no Processamento da Informação Sensorial Auditiva
Induzidas pela Abstinência ao Álcool em Ratos: Importância dos
Mecanismos GABAérgicos e Glutamatérgicos do Colículo Inferior**

Renata Ferreira

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

RIBEIRÃO PRETO-SP

2010

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

**Alterações no Processamento da Informação Sensorial Auditiva
Induzidas pela Abstinência ao Álcool em Ratos: Importância dos
Mecanismos GABAérgicos e Glutamatérgicos do Colículo Inferior**

Renata Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

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

RIBEIRÃO PRETO-SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, R.

Alterações no processamento da informação sensorial auditiva induzidas pela abstinência ao álcool em ratos: importância dos mecanismos GABAérgicos e glutamatérgicos do colículo inferior. 88p.:il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Psicobiologia.

Orientador: Marcus Lira Brandão

1. Drogas de Abuso. 2. Ansiedade. 3. Mesencéfalo. 5. Álcool. 5. GABA. 6. Glutamato.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Marcus Lira Brandão pela orientação e pelos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Manoel Jorge Nobre pela confiança, ensinamentos e grande contribuição neste trabalho.

À Dra. Alícia Cabral pela amizade, contribuição e por ter sido assessora deste trabalho.

À Renata Vicentini Del Moro, pelos conselhos e apoios prestados.

Aos amigos desse laboratório de Neuropsicofarmacologia.

Aos amigos da pós-graduação em Psicobiologia, em especial, José Luiz, Ana Carolina, Juliana, Yara e Daniela.

À minha maravilhosa família: José, Izabel, Débora e Rafael, pelo apoio e amor incondicionais.

À toda minha enorme família: meu porto seguro.

Ao meu maior presente e amor: Carlos Eduardo.

Aos meus grandes amigos: Estevan, Patrícia, Guilherme, Lucas, Celso, Fabiana, Leila e Raquel.

Aos meus queridos e necessários amigos da turma 50 da Biologia - UEL pela amizade incomparável, mesmo à distância.

À família Merlo Sgobbi pelo carinho, apoio e compreensão.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho, muito obrigada.

Ao apoio financeiro do CNPq.

“Explicar para que serve o Cérebro é tarefa tão difícil quanto retratar a Alma,
sobre a qual se costuma dizer que tudo entende, salvo a si mesma.”

Thomas Willis, Anatomia do Cérebro (1664)

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES	07
RESUMO	08
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	12
Álcool Etílico	15
Informação Sensorial Auditiva	18
Ansiedade e Consumo de Álcool	19
Sistema Encefálico Aversivo	21
Colículo Inferior – Subdivisões	22
Reações Defensivas Induzidas por Estimulação do CI	25
Potencial Evocado Auditivo	30
JUSTIFICATIVA	32
OBJETIVOS	34
MATERIAIS E MÉTODOS	36
Animais	37
Drogas	37
Procedimentos para Indução da Dependência de Álcool	37
Cirurgia	38
Equipamentos	39
Procedimento Experimental	40
Procedimento para Microinjeção	41
Delineamento Experimental	42
Histologia	43
Análise Estatística	43
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE ABREVIÇÕES

5-HT = serotonina

AM = amígdala

ANOVA = análise de variância

AP7 = ácido 2-amino-7-fosfoheptanóico

CI = colículo inferior

Clc = núcleo central do colículo inferior

CS = colículo superior

DAG = enzima descarboxilase do ácido glutâmico

EPM = erro padrão médio

GABA = aminoácido gama-aminobutírico

HM = hipotálamo medial

MUS = muscimol

NMDA = N-Metil-D-Aspartato

PEA = potencial evocado auditivo

SAL = salina

SEA = sistema encefálico aversivo

SCP = substância cinzenta periaquedutal

SCPd = substância cinzenta periaquedutal dorsal

SNC = sistema nervoso central

RESUMO

A expressão de respostas de medo condicionadas e incondicionadas geradas por estímulos auditivos de natureza aversiva envolve a transmissão neural do colículo inferior (CI) para o núcleo geniculado medial do tálamo, principalmente através do seu núcleo central (Clc). Como outras drogas de abuso, o álcool atua em múltiplos alvos no cérebro produzindo uma variedade de efeitos, incluindo tanto efeitos recompensadores quanto aversivos. A ingestão crônica e a síndrome de abstinência ao álcool promovem alterações severas na regulação homeostática entre GABA e glutamato: os principais neurotransmissores inibitório e excitatório respectivamente, do sistema nervoso central, particularmente do CI. Esse estudo tem o objetivo de investigar os efeitos da interrupção crônica de álcool no processamento da informação acústica no Clc de ratos dependentes de álcool pelo uso da técnica dos potenciais evocados auditivos (PEA). Como uma medida adicional, os PEAs também foram registrados em ratos sob os efeitos do álcool. A influência da neurotransmissão de GABA e de glutamato na modulação das modificações induzidas pela abstinência ao álcool foi analisada por microinjeções locais no CI do agonista GABA_A muscimol e do antagonista NMDA AP7. Nossos resultados mostraram que a ingestão crônica de álcool promove o seu bem conhecido efeito ansiolítico no processamento da informação auditiva no Clc, reduzindo a amplitude do PEA. Por outro lado, a abstinência ao álcool causa um aumento da sensibilidade dos neurônios do Clc a estímulos auditivos. Este efeito apareceu somente após 96 horas da retirada do álcool. Os resultados obtidos com a manipulação farmacológica mostraram que o muscimol e o AP7 promoveram efeitos bastante distintos com cursos de tempo diferentes. De fato, o muscimol foi

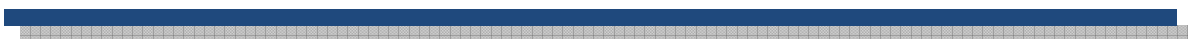
eficaz na redução dos PEAs em ratos com 48 horas de abstinência. O antagonismo de receptores glutamatérgicos NMDA ocorreu somente após 96 horas da retirada do álcool. Esses resultados mostraram que as modificações induzidas pela abstinência ao álcool em neurônios do Clc de ratos dependentes de álcool são diferentemente modulados por mecanismos GABA e NMDA.

ABSTRACT

The expression of conditioned and unconditioned fear responses generated by auditory stimuli of aversive nature, involves neural transmission from the inferior colliculus (IC) to the medial geniculate nucleus of the thalamus and thence to the integrates acoustic information of aversive nature, mainly by its central nucleus (cIC). Like other drugs of abuse, alcohol acts on multiple targets in the brain to produce a complex array of effects, including both rewarding and aversive ones. Alcohol administration and alcohol withdrawal syndrome promote severe changes in the normal homeostatic regulation between GABA and glutamate; the major inhibitory and excitatory neurotransmitters in the IC, respectively. This study was aimed at investigating the alcohol chronic withdrawal effects on the processing of acoustic information in the cIC of alcohol-dependent rats through the use of the auditory evoked potentials (AEPs) technique. As an additional measure AEPs were also recorded in rats under alcohol effects. The influence of GABA and glutamate neurotransmission on the modulation of changes induced by alcohol withdrawal was analyzed by local IC microinjections of the GABA_A agonist muscimol and the NMDA antagonist AP7. Our results showed that the chronic intake of alcohol promotes its well-known anxiolytic-like effects on the processing of auditory information in the cIC, reducing the amplitude of the AEPs. On the other hand, alcohol withdrawal causes increased sensitivity of the cIC neurons to auditory stimuli. This effect appeared only after 96 hours of alcohol withdrawal. The results obtained with the pharmacological manipulation showed that muscimol and AP-7 promoted quite distinct effects with different time courses. In fact, muscimol was effective in reducing AEPs in 48-hours

withdrawal-rats. The antagonism of glutamate NMDA receptors occurred only at 96-hours of alcohol withdrawal. These results showed that the changes induced by alcohol withdrawal on cIC neurons of alcohol-dependent rats are differently modulated by GABA and NMDA mechanisms.

Introdução



Aldoux Huxley, em seu livro *As Portas da Percepção e Céu e Inferno*, busca algumas razões para explicar a ingestão de drogas de abuso, afirmando que: “a maioria dos homens e mulheres levam vidas tão dolorosas na pior das hipóteses ou tão monótonas, pobres e limitadas na melhor delas, que a tentação de transcender a si mesmos, ainda que por alguns momentos, é e sempre foi um dos principais apetites da alma” (Huxley, 1956). Em seu livro *Uma História Íntima da Humanidade*, Theodore Zeldin afirma: "A fuga para dentro de estados alterados de consciência, para a sedação ou a exaltação, foi uma ambição constante por toda a parte, em todos os séculos. Não houve civilização que não procurasse fugir à normalidade com a ajuda do álcool, do tabaco, do chá, do café e de plantas de todas as espécies" (Zeldin, 1994).

Droga de abuso é qualquer substância que modifica, aumenta, inibe ou reforça as funções fisiológicas, psicológicas ou imunológicas do organismo de maneira transitória ou permanente. Podem ser divididas em: depressoras do sistema nervoso central (álcool, sedativos / hipnóticos, solventes voláteis); estimulantes (cocaína, anfetamina, ecstasy); opióides (morfina, heroína) e alucinógenas (LSD).

A adição a drogas de abuso é um distúrbio definido pela recaída caracterizada pela busca compulsiva pela droga e uma perda do controle de seu consumo (American Psychiatric Association, 1994; World Health Organization, 1992). Dependendo de vários fatores moduladores, tais como predisposição genética, experiências ambientais significativas, contexto social, histórico farmacológico e outros, o consumo dessas drogas pode se tornar compulsivo e, finalmente, a adição pode se desenvolver. Entretanto, a despeito dos avanços obtidos no estudo dos fatores responsáveis pelo

desenvolvimento da dependência e abstinência a drogas, os mecanismos exatos subjacentes a este fenômeno ainda permanecem obscuros.

De forma geral, a dependência de diferentes drogas psicoativas assume um padrão consideravelmente similar que inicia com a ingestão aguda, alterações de humor (prazer e bem-estar ou, no caso de substâncias ansiolíticas, redução ou eliminação de desprazer ou mal-estar), tolerância (induzida pelo uso contínuo), abstinência (se o consumo é interrompido) seguida por um desejo incontrolável pela droga e seus efeitos (fissura ou “craving”) e, finalmente, recaída.

A adição a drogas de abuso é função do efeito reforçador interno que estas substâncias produzem, sendo esta uma das principais razões pelas quais elas são consumidas. O consumo em longo prazo, no entanto, produz uma adaptação fisiológica e farmacológica do sistema nervoso central (SNC) o que resulta, por sua vez, no surgimento de processos internos contra-adaptativos contrários aos efeitos da droga (Koob *et al.*, 1989). Nesta condição, a interrupção da ingestão crônica produz um desequilíbrio homeostático que se manifesta na expressão dos diversos sintomas observados durante a abstinência a drogas de abuso (Koob & Le Moal, 2001; Melichar *et al.*, 2001; Lingford-Hughes *et al.*, 2003). Estes sintomas podem ser divididos em físicos e afetivos e sua variedade é função de diversos fatores como tipo de substância ingerida, frequência e tempo de tratamento, dose, histórico pessoal e familiar, resistência ao estresse, etc. Por exemplo, a abstinência a opióides produz uma série de alterações somáticas (perda de peso, diarreia, salivação, corrimento nasal), comportamentais (postura anormal, contrações abdominais, ranger de dentes) e afetivas (irritabilidade ao toque, ansiedade) (Schultheis *et al.*, 1997). A interrupção do

tratamento crônico com benzodiazepínicos elicia um padrão similar de sintomas ainda que, neste caso, as alterações físicas observadas não sejam tão proeminentes. A abstinência ao álcool produz perda de peso considerável, fraqueza, agitação, insônia, disforia, tremores, náuseas, suor intenso, dores abdominais, vômitos, alucinações, *delirium tremens*, ansiedade extrema além de convulsões (Nathan, 1990; Buck & Harris, 1991; Matsumoto *et al.*, 1996). No entanto, embora esses sintomas variem em função de diversos fatores, a expressão de medo e ansiedade exacerbados, após a interrupção da ingestão crônica de drogas de abuso, é de longe a característica mais comum da abstinência a esse tipo de substâncias. A incapacidade de lidar com estes estados afetivos negativos, gerados pela ausência da droga no SNC, é forte fator que induz a recaída, como já verificado tanto em seres humanos quanto em ratos de laboratório (Walker *et al.*, 1995; Woods & Winger, 1995; Nestler & Aghajanian, 1997; Koob & Le Moal, 2001; Lingford-Hughes & Nutt, 2003; Cabral *et al.*, 2006; Castilho *et al.*, 2008).

Álcool Etilico

O álcool etílico é a principal droga psicoativa utilizada no mundo, consumido desde os primórdios da civilização. Toda a história da humanidade está permeada pelo consumo de álcool, prova disso são os registros arqueológicos que revelam que os primeiros indícios do consumo de álcool pelo ser humano datam de aproximadamente 6000 A.C. Na antiguidade, as técnicas de produção do álcool eram restritas apenas à fermentação natural ou espontânea de alguns produtos vegetais, como açúcares, e começou a se expandir com a descoberta da destilação, procedimento que se deve aos

árabes. Os efeitos do álcool tinham algo de religioso, de místico e mesmo de medicinal na história antiga. Por isso, bebidas fizeram e fazem parte de cerimônias de iniciação, de ritos de passagem e de casamentos. As múltiplas utilizações do álcool etílico tornaram seu consumo socialmente aceitável, senão desejado, e tornaram as sociedades mais vulneráveis ao abuso de droga. A partir da Revolução Industrial no século XVIII, registrou-se um grande aumento na oferta deste tipo de bebida, contribuindo para um maior consumo e, conseqüentemente, gerando um aumento no número de pessoas que passaram a apresentar algum tipo de problema devido ao seu uso excessivo. Foi nessa época que surgiu o conceito de alcoolismo.

Em 1952, o alcoolismo foi incluído no Manual de Diagnóstico e Estatística dos Distúrbios Mentais (DSM-I) da Associação Americana de Psiquiatria (APA). A segunda edição desse manual (DSM-II) seguiu a Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID-8) da Organização Mundial de Saúde (OMS), que dividia os problemas em três categorias: dependência, episódios de beber excessivo (abuso) e beber excessivo habitual. Em 1977, a OMS adotou a definição de dependência de álcool como um problema grave e contínuo. Atualmente, o CID-10 traz a classificação F10 - Transtornos Mentais e Comportamentais Devidos ao Uso de Álcool, com as seguintes subdivisões: intoxicação aguda, uso nocivo para a saúde, síndrome de dependência, síndrome (estado) de abstinência, síndrome de abstinência com *delirium*, transtorno psicótico, síndrome amnésica, transtorno psicótico residual ou de instalação tardia, outros transtornos mentais ou comportamentais e transtorno mental ou comportamental não especificado.

Sabe-se que os efeitos reforçadores do álcool decorrem de sua interação com diversos sistemas de neurotransmissão, como o GABAérgico e o glutamatérgico, o que torna sua ação farmacodinâmica mais complexa do que a de outras drogas de abuso, produzindo efeitos seletivos e dose dependentes (Engel *et al.*, 1992; Le *et al.*, 2001; Cabral *et al.*, 2006; Chastain, 2006; Vengeliene *et al.*, 2008). Sua ingestão diminui rapidamente os níveis de ansiedade, tensão, assim como a percepção do estresse (Kushner *et al.*, 1990). O consumo crônico de álcool também está associado a um decréscimo na densidade de receptores GABA_A no SNC, assim como a alterações na produção de suas subunidades (Golovko *et al.*, 2002). Neurônios glutamatérgicos geralmente possuem receptores de GABA de tal forma que reduções na neurotransmissão GABAérgica, induzida por tolerância, leva a um aumento na liberação de glutamato em diversas regiões do SNC durante a abstinência (Fadda & Rossetti, 1998).

Tem sido sugerido que o álcool atua como um antagonista do receptor glutamatérgico NMDA (N-Metil-D-Aspartato), um receptor do tipo excitatório do SNC (Carboni *et al.*, 1990). O consumo crônico de bebidas alcoólicas provoca um aumento na densidade desses receptores (Rossetti & Carboni, 1995). Estudos em animais têm demonstrado que esse aumento persiste por cerca de trinta e seis horas após a retirada do álcool, período que coincide com o aparecimento das crises convulsivas, fenômeno neurotóxico relacionado à hiperatividade glutamatérgica (Laranjeira *et al.*, 2000). O glutamato está estreitamente vinculado à modulação do medo e da ansiedade incondicionados, através de sua ação em estruturas mesencefálicas conhecidas pela expressão/modulação desses estados emocionais (Brandão *et al.*,

2005). Por exemplo, a abstinência ao álcool, que também partilha a característica de um estressor incondicionado, induz um aumento pronunciado na sensibilidade dos neurônios da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), como atestado tanto pela redução significativa nos limiares de estimulação elétrica (Cabral *et al.*, 2006) assim como pelo aumento significativo na expressão da proteína Fos nessa região (Borlikova *et al.*, 2006).

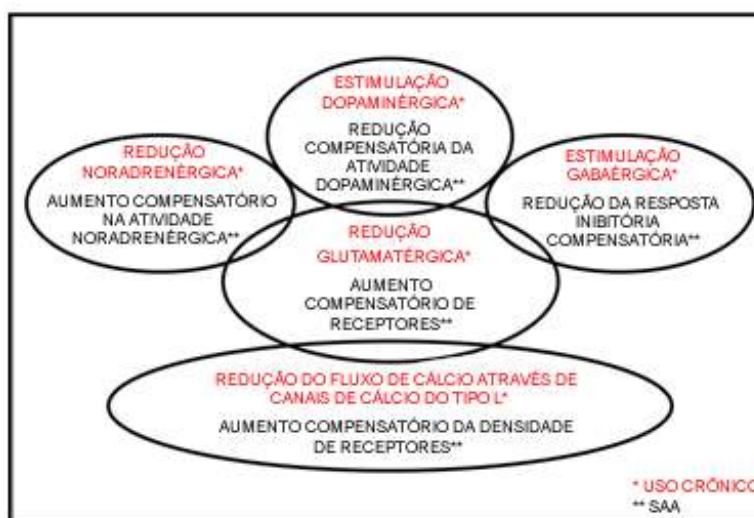


Figura 1. Alterações neurofarmacológicas do uso crônico e da síndrome de abstinência ao álcool (SAA). (extraído de Zaleski *et al.*, 2004).

Informação Sensorial Auditiva

As estratégias utilizadas pelos diversos organismos para sobreviver em seu meio natural envolvem dois aspectos motivacionais básicos, apetitivos e defensivos, que são similares nas diversas espécies de mamíferos (Lang *et al.*, 1998). Estes tipos de estratégias estão estreitamente vinculados à capacidade do organismo de perceber seu meio através dos cinco sistemas sensoriais básicos: olfativo, tátil, visual, gustativo e auditivo. Com referência ao sistema auditivo, uma série de trabalhos demonstra a

existência de fortes pressões seletivas sobre a maioria dos grupos de vertebrados para as habilidades de codificação e processamento dos diversos tipos de sons, o que resultaria em uma eficiente detecção, localização e identificação dos diversos tipos de fontes sonoras (Popper & Fay, 1997; Fay & Popper, 2000). Disfunções nesses circuitos geram uma série de alterações funcionais levando ao aparecimento de respostas mal adaptativas (crises audiogênicas), perturbações na expressão de respostas adaptativas (orientação em direção a uma fonte sonora, prejuízo da resposta de sobressalto) e ao surgimento de respostas bizarras decorrente de hiperexcitação dos circuitos auditivos (zumbidos) (Jane *et al.*, 1965; Li *et al.*, 1998a; 1998b; Garcia-Cairasco, 2002). Em todo caso, a capacidade de detectar o predador, dentro de um ambiente potencialmente perigoso surge, presumivelmente, como uma das mais fundamentais funções auditivas (Gans, 1992; Casseday & Covey, 1996). De fato, um aumento na intensidade da estimulação acústica aversiva induz a sensibilização dos neurônios do núcleo central do colículo inferior (CIC), como atestado pelo aumento na amplitude dos potenciais evocados induzidos por um estímulo auditivo (Nobre *et al.*, 2003).

Ansiedade e Consumo de Álcool

De modo geral, a ansiedade pode ser definida como um estado subjetivo de apreensão ou tensão, difuso ou vago, frequentemente acompanhado por uma ou mais alterações físicas como, por exemplo, aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, induzido pela expectativa de perigo, dor ou necessidade de um esforço especial (Graeff, 1989). Acredita-se que ela desempenhe um importante papel no

desenvolvimento de dependência e reincidência de álcool. Os relatos clínicos documentam uma alta ocorrência de ansiedade em pacientes dependentes de álcool (Allan, 1995; Lejoyeux *et al.*, 2000) e também um significativo grau de comorbidade entre distúrbios de ansiedade e distúrbios associados ao uso de álcool (Kessler *et al.*, 1997; Kushner *et al.*, 1999; Regier *et al.*, 1990). Muitos desses pacientes informam que seus problemas com a ansiedade precederam ao abuso de álcool (Monteiro *et al.*, 1990). No entanto, o problema de estudos com pacientes é que a ansiedade é baseada em relatos subjetivos de indivíduos que vêm de diferentes ambientes sociais e culturais. Assim, a pesquisa que usa modelos animais traz subsídios importantes ao avaliar e quantificar o comportamento relacionado com o medo e os estados aversivos associados à dependência a drogas em geral (Langen & Fink, 2004). Em ratos Wistar selecionados de um grupo heterogêneo, as diferenças individuais de comportamento no labirinto em cruz elevado e seus níveis de ansiedade foram positivamente correlacionados com o consumo de álcool, sugerindo sua associação com a emocionalidade (Spanagel *et al.*, 1995). Esta noção foi apoiada pelo achado em ratos com lesões bilaterais da amígdala central que resultaram em uma redução tanto da ansiedade experimental como na ingestão voluntária de álcool (Möller *et al.*, 1997).

A abstinência às drogas de abuso, como o álcool etílico, possui a característica de um estressor incondicionado e, como tal, pode estar sob controle de sistemas neuronais e áreas encefálicas que comumente modulam a resposta do organismo a estímulos incondicionados de medo, como as regiões do tronco cerebral pertencentes ao conhecido sistema encefálico aversivo (SEA). De fato, estudos prévios de nosso laboratório demonstraram um aumento pronunciado na ativação neuronal (através da

marcação imunohistoquímica da proteína Fos) de regiões encefálicas estreitamente envolvidas com a expressão do medo e da ansiedade como, por exemplo, alguns núcleos hipotalâmicos, a substância cinzenta periaquedutal (SCP), os colículos superiores (CS) e inferiores, e os núcleos da rafe, em ratos abstinentes de diazepam e morfina (Fontanesi *et al.*, 2007; Castilho *et al.*, 2008). Particularmente com relação à SCP e ao colículo inferior (CI) foi demonstrado que a abstinência ao álcool e morfina induz um aumento pronunciado na sensibilidade à estimulação elétrica dessas estruturas, sugerindo que o aumento nos níveis de ansiedade induzido pela abstinência dessas drogas pode estar associado à sensibilização neuronal dos substratos neurais do medo e da ansiedade nessas regiões (Cabral *et al.*, 2006; Avila *et al.*, 2008).

Sistema Encefálico Aversivo

O sistema encefálico aversivo (SEA) é um sistema composto por uma série de estruturas, muitas delas localizadas no mesencéfalo (Pollak *et al.*, 2003), região esta que alcança, durante a filogenia, um desenvolvimento que precede ao de regiões telencefálicas (Aitkin, 1983). Importante avanço na caracterização do SEA ocorreu a partir dos trabalhos de Graeff *et al.* (1981). Uma série de trabalhos desse grupo apontou a amígdala (AM), o hipotálamo dorsomedial (HM) e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) como as principais estruturas desse sistema. Na década de 90, vários estudos realizados nesse laboratório adicionaram o CI ao SEA com base em evidências obtidas com a estimulação elétrica e química dessa estrutura mesencefálica

que até esse período era associada unicamente com o processamento de sinais acústicos. Sem dúvida, as fibras mesencefálicas que carregam informações de natureza acústica compreendem uma gama de corpos neuronais e feixes de axônios, dispostos paralelamente ou em série, que convergem, em grande parte, para uma área comum (Pollak *et al.*, 2003), o CI, estrutura que consiste de uma massa neuronal central de células circundadas por um córtex (Morest & Oliver, 1984; Oliver & Morest, 1984; Faye-Lund & Osen, 1985). Na literatura, a maioria dos trabalhos sobre o CI versa sobre o papel dessa estrutura na transmissão e modulação da informação auditiva para estruturas superiores e na sua participação na geração e elaboração do comportamento de defesa. O CI envia fibras principalmente para o núcleo geniculado medial do tálamo. Além disso, mantém conexões indiretas com a SCP, o HM e a AM, dentre outras regiões (Webster, 1995). Portanto, o CI apresenta conexões importantes com estruturas que compõem o SEA (Graeff, 1990), como veremos abaixo.

Colículo Inferior - Subdivisões

O CI é uma estrutura bilateral localizada no mesencéfalo dorsal e consiste em um relé das fibras auditivas que ascendem em direção ao córtex temporal, onde ocupa uma posição fundamental na recepção e processamento dos sinais auditivos. Inicialmente, foi verificada a existência de três principais subdivisões do CI em mamíferos: o núcleo central, núcleo externo e o núcleo pericentral (Ramon Y Cajal, 1909). Na literatura, podemos encontrar outras subdivisões e nomenclaturas para o CI, tais como as sugeridas por Morest & Oliver (1984) que distinguiram regiões distintas

no CI de gatos; uma região tectal (composta pelo núcleo central e seus sub-núcleos medial, central, lateral e ventral); um córtex (com suas partes dorsal e caudal); um núcleo paracentral (composto pelos sub-núcleos comissural, dorsomedial, rostral, lateral e ventrolateral) e outra tegmental (composta basicamente por áreas pericoliculares e o núcleo do braço do CI). Posteriormente, Huffman & Henson (1990) adotaram uma subdivisão em três principais núcleos: núcleo central, córtex externo e córtex dorsal, divisão utilizada neste trabalho.

Núcleo Central

O núcleo central do CI (CIc) recebe as principais aferências auditivas ascendentes provenientes do núcleo coclear dorsal e ventral, complexo olivar superior, e núcleos do lemnisco lateral (Woolard & Harpman, 1940; Moore & Goldberg, 1963; Roth *et al.*, 1978). Do CI as fibras da via auditiva se dirigem para o núcleo geniculado medial do tálamo e daí para o córtex auditivo (Osen, 1973). Porém, nem todos os núcleos do CI recebem aferências diretamente dos circuitos auditivos. Moore & Goldberg (1963) verificaram que o núcleo central é o principal alvo das fibras auditivas provenientes dos núcleos cocleares (dorsal e ventral) e do complexo olivar superior. Ainda em relação às aferências do núcleo central, grande parte delas provém do próprio CI, ou seja, das conexões intranucleares e coliculares contralaterais. Já as aferências se dirigem principalmente para a parte ventral do núcleo geniculado medial do tálamo. Todas estas projeções que ascendem em direção as áreas corticais auditivas mantêm uma incrível similaridade em uma ampla gama de mamíferos (Moore *et al.*, 1977).

Córtex Externo

Ao contrário do Clc, o córtex externo recebe escassas aferências contralaterais cocleares e do núcleo olivar superior, sendo que suas principais aferências provêm das áreas de associação corticais 39 e 41, ipsilaterais, núcleo da coluna dorsal (“inputs” somatosensoriais), do núcleo central (“inputs” auditivos), do núcleo parabraquial, núcleo cuneiforme, grácil, trigeminal, e da parte lateral da substância negra (Coleman & Clerici, 1987). Em relação às eferências, o córtex externo envia maciças projeções bilaterais para o núcleo coclear, para o núcleo geniculado medial do tálamo (LeDoux *et al.*, 1987) e núcleo pontino dorsolateral (Kawamura *et al.*, 1974). O córtex externo também apresenta conexões com estruturas envolvidas na gênese e modulação de comportamentos defensivos como a SCP, CS, HM e AM (via tálamo) (Adams, 1980; LeDoux *et al.*, 1985; LeDoux *et al.*, 1990).

Córtex Dorsal

O córtex dorsal também apresenta conexões com a SCP e a substância negra. Em relação às suas aferências, o córtex dorsal recebe substanciais aferências corticais ipsilaterais de várias regiões, como as áreas 20, 36 e 41, e do globo pálido (Moriizumi & Hattori, 1991), e diferentemente do córtex externo, envia a maioria das suas projeções para a divisão dorsal do núcleo geniculado medial do tálamo. Devido a essas diferentes conexões entre os núcleos do CI, Tokunaga (1984) propôs uma dualidade funcional dessa estrutura: o núcleo central seria, primordialmente, uma estação relé das vias auditivas, enquanto que os córtices dorsal e externo, recebendo informações não só auditivas, mas também visuais e somáticas, seriam núcleos participantes da integração sensorial-motora. Corroborando esta sugestão, Moriizumi & Hattori (1991)

verificaram que a maioria das fibras que se originam no globo pálido, estrutura envolvida no controle motor, e que se dirigem para o CI, apresentam seus terminais no núcleo dorsal.

Reações Defensivas Induzidas por Estimulação do Colículo Inferior

Estimulação Elétrica

As respostas de defesa expressas pelos diferentes organismos, particularmente os mamíferos, estão organizadas dentro de um padrão hierárquico específico que varia de estados de alerta e congelamento, até a fuga (Blanchard & Blanchard, 1988). As respostas comportamentais eliciadas por estimulação elétrica do CI (Brandão *et al.*, 1980; Melo *et al.*, 1992; Brandão *et al.*, 1994; Maissonnette *et al.*, 1996; Brandão *et al.*, 1999; Pandóssio & Brandão, 1999; Castilho & Brandão, 2001; Lamprea *et al.*, 2002; Macedo *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002) partilham muitas das características observadas na reação de defesa induzida pela estimulação de outras estruturas pertencentes ao SEA, tais como a AM, as camadas profundas do CS, a SCPd e o HM (Brandão *et al.*, 1982; Brandão *et al.*, 1994). Em geral, essas respostas são acompanhadas também de alterações autonômicas, alterações na pressão arterial, frequência de batimento cardíaco e respiração (Hilton & Redfern, 1986; Yardley & Hilton, 1986; Brandão *et al.*, 1988) e analgesia (Coimbra *et al.*, 1992; 1997), que vão dar o suporte necessário ao organismo para uma possível fuga ou confronto direto em uma situação de ameaça.

Alguns resultados obtidos de experimentos utilizando o paradigma do comportamento operante, no qual os animais se engajam em tarefas que permitem interromper ou desligar a estimulação elétrica do CI (*switch-off*) nos permitem afirmar a natureza aversiva deste tipo de estímulo, assim como a característica defensiva da resposta (Melo *et al.*, 1992; Brandão *et al.*, 1997). Parece então que o CI está envolvido, assim como as outras estruturas do SEA, na mediação das respostas defensivas eliciadas por estímulos de perigo, particularmente os de natureza auditiva, no nível do teto mesencefálico. Neste laboratório tem sido mostrado que aumentos graduais na estimulação elétrica do CI de ratos geram um estado aversivo inicialmente caracterizado por comportamento de alerta (no qual o animal interrompe qualquer atividade na qual esteja engajado, perscrutando cuidadosamente o ambiente), seguido de congelamento (imobilidade tensa acompanhada de algumas respostas autonômicas como exoftalmia, piloereção e arqueamento do dorso) e fuga (resposta caracterizada por saltos e galopes) todas elas estreitamente vinculadas a esta estimulação (Brandão *et al.*, 1980; 1993; 1994; 1997; 1999; Melo *et al.*, 1992; Coimbra & Brandão, 1993; Melo & Brandão, 1995b; Maisonnette *et al.*, 1996; Troncoso *et al.*, 1998; Pandóssio & Brandão, 1999; Pandóssio *et al.*, 2000; Cuadra *et al.*, 2000; Castilho & Brandão, 2001; Lamprea *et al.*, 2002; Macedo *et al.*, 2002). A administração local de benzodiazepínicos ou agonistas GABAérgicos (Melo *et al.*, 1992; Pandóssio & Brandão, 1999) e agonistas ou bloqueadores da recaptção de 5-HT (Melo & Brandão, 1995b) aumenta significativamente os limiares aversivos de estimulação elétrica e a latência para a resposta de “switch-off” dessa estimulação. Foi demonstrado também que a estimulação elétrica do CI aumenta o tempo de congelamento, o índice de analgesia e

a frequência de respostas autonômicas, assim como diminui o número de levantamentos e a auto-limpeza, quando utilizada como estímulo incondicionado num paradigma de condicionamento clássico no qual foi utilizado um pareamento com luz (Castilho & Brandão, 2001). Além disso, a expressão da proteína Fos após estimulação elétrica do CI em intensidade de corrente que gera um contínuo de respostas que varia do alerta até a fuga, revelou a ativação de diversas estruturas cerebrais estreitamente vinculadas à modulação e produção de respostas defensivas como a AM, córtex frontal, hipocampo dorsal e SCPd (Lamprea *et al.*, 2002). Cumpre notar que alguns trabalhos têm sugerido também a possível mediação de outras estruturas encefálicas dos estados aversivos gerados por estimulação do CI, dentre elas possivelmente a substância negra (Coimbra *et al.*, 1989; Coimbra & Brandão, 1993) e a amígdala (Macedo *et al.*, 2002).

Estimulação Química

O GABA é o neurotransmissor mais amplamente distribuído no SNC de vertebrados (Bormann, 2000). As estruturas localizadas no teto mesencefálico também possuem altas concentrações dessa substância (Okada, 1974; Sandner *et al.*, 1981), particularmente o CI (Shiraishi *et al.*, 2001). Esses resultados foram corroborados por estudos bioquímicos (Adams, 1979; Contreras & Bachelard, 1979) e imunológicos (Thompson *et al.*, 1985), que também revelaram a presença de GABA nessa estrutura, e das enzimas responsáveis por sua síntese – a descarboxilase do ácido glutâmico, e por sua degradação – a GABA transaminase (Tachibana & Kuriyama, 1974; Fisher & Davies, 1976; Contreras & Bachelard, 1979; Adams & Wenthold, 1979). Outros trabalhos, utilizando ligantes específicos, também demonstraram a existência, nesta

estrutura, de uma grande quantidade de receptores GABA_A (Sieghart, 1986; Bristow & Martin, 1988; Glendenning & Baker, 1988; Caspary *et al.*, 1990; Shiraishi *et al.*, 2001) e GABA_B (Bowery *et al.*, 1987; Chu *et al.*, 1990). Dados obtidos de estudos comportamentais utilizando modelos animais de ansiedade revelaram, de forma consistente, a interação das ações anti-aversivas dos benzodiazepínicos com mecanismos GABAérgicos no teto mesencefálico (Brandão *et al.*, 1982; Bovier *et al.*, 1982; Brandão *et al.*, 1985; Graeff *et al.*, 1986; Leão-Borges *et al.*, 1988; Brandão *et al.*, 1990; Melo *et al.*, 1992; Brandão *et al.*, 1993; Brandão *et al.*, 1994; Brandão *et al.*, 1999; Pandóssio & Brandão, 1999; Pandóssio *et al.*, 2000).

Microinjeções de agonistas GABAérgicos em estruturas relacionadas ao processamento da informação aversiva promovem efeitos ansiolíticos similares aos tranquilizantes menores (Brandão *et al.*, 1982; Bovier *et al.*, 1982; Audi & Graeff, 1987). Esses efeitos característicos das drogas benzodiazepínicas, assim como dos agonistas GABAérgicos, estão vinculados à ação do GABA diretamente no receptor GABAérgico pós-sináptico (Olsen, 1982; Haefely, 1985). A administração de antagonistas GABAérgicos nessas mesmas estruturas elicia o comportamento de fuga acompanhado de respostas autonômicas características da reação de defesa (Millan *et al.*, 1986). A participação do sistema GABAérgico do CI na mediação das respostas aversivas foi primeiramente mostrada em um estudo com a administração do antagonista de receptores GABA_A, bicuculina, nessa estrutura (Brandão *et al.*, 1988). Os resultados revelaram uma clara ativação comportamental, acompanhada de saltos, intercalada com curtos períodos de congelamento, além de alterações autonômicas (aumentos na pressão arterial e frequência cardíaca). Estas respostas são similares

àquelas observadas após estimulação da SCPd ou do HM, estruturas evidentemente envolvidas nas reações de defesa e que compõem o SEA (Graeff, 1990). Esses resultados levaram à hipótese da participação de uma inibição GABAérgica tônica sobre os estados aversivos mediados pelos substratos neurais do CI, além de sugerir ser essa também uma estrutura participante do SEA (Brandão *et al.*, 1988). Em um estudo posterior (Melo *et al.*, 1992), foi constatado que a administração sistêmica ou local de benzodiazepínicos ou local de agonistas GABAérgicos atenua, de maneira dose-dependente, os efeitos aversivos da estimulação elétrica do CI num procedimento de “switch-off”, no qual o animal aprende a desligar a estimulação aversiva. Da mesma forma, a administração dessas drogas gera um forte efeito depressor sobre as respostas aversivas condicionadas e incondicionadas induzidas por estimulação elétrica do CI e de outras estruturas do teto mesencefálico (Kiser & Lebovitz, 1975; Schenberg & Graeff, 1978; Brandão *et al.*, 1982). Neste laboratório, foi demonstrado que a administração sistêmica ou central do benzodiazepínico midazolam, ou a microinjeção no CI do agonista GABA_A muscimol, atenua as consequências aversivas da estimulação elétrica dessa região sem gerar comprometimento motor (Pandóssio & Brandão, 1999), sugerindo que a facilitação da neurotransmissão GABAérgica nessa estrutura causa efeitos anti-aversivos.

O envolvimento de mecanismos GABAérgicos na regulação dos substratos neurais que processam as respostas defensivas mediadas no nível do CI pode ser melhor compreendido a partir da observação de que a resposta de congelamento induzida pela administração local de semicarbazida, substância que inibe a

descarboxilase do ácido glutâmico, é possuir alguns correlatos sensoriais e eletrofisiológicos.

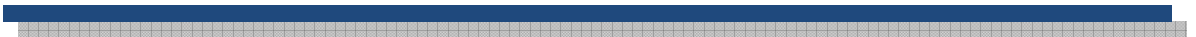
Potenciais Evocados Auditivos (PEA)

As aplicações práticas de medida de potencial evocado auditivo têm sido usadas para propósitos clínicos. Biacabe *et al.* (2001) publicaram uma revisão com o objetivo de descrever a anatomia funcional de estruturas auditivas do tronco encefálico nas quais são gerados potenciais evocados auditivos (BAEP, brainstem auditory evoked potential), e propuseram sua aplicação clínica para a identificação de neurinomas acústicos (tumores) ou lesões, diagnóstico precoce de problemas auditivos em crianças, e para pacientes que não respondem a testes audiométricos tradicionais.

Em laboratório, resultados obtidos por Nobre *et al.* (2003) mostram que microinjeções de semicarbazida no CI promovem o comportamento de congelamento e aumento na amplitude dos potenciais evocados (amplitude da onda P1) associado a uma redução na amplitude da resposta de sobressalto. A inibição das funções GABAérgicas no CI por meio da semicarbazida parece afetar também a reatividade dos neurônios do CI a estímulos auditivos. Brandão *et al.* (2001) verificaram que a microinjeção unilateral de glutamato no CI, em uma dose que causa o comportamento de congelamento – em ratos com eletrodos implantados bilateralmente – produziu um aumento ipsilateral dos potenciais registrados nessa região, sugerindo que o aumento da estimulação aversiva promove um aumento na reatividade dos neurônios do CI aos estímulos auditivos. A medida dos potenciais evocados auditivos (PEA) também é

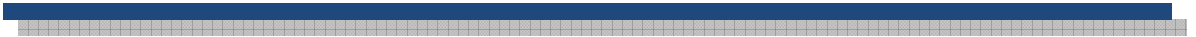
utilizada em estudos para análise de alterações neuronais associadas ao uso agudo ou contínuo de drogas de abuso como o diazepam (Cabral *et al.*, 2009) e o álcool (Chu *et al.*, 1978; Begleiter *et al.*, 1981; Squires *et al.*, 1978).

Justificativa



De forma geral, boa parte dos estados emocionais alterados presentes na abstinência a uma droga de abuso, como o álcool etílico, são frequentemente observados em animais expostos a situações de perigo, ou a partir da estimulação elétrica ou química de estruturas pertencentes ao SEA, tais como a AM, o HM, a SCPd, as camadas profundas do CS e o CI. A facilitação da neurotransmissão glutamatérgica ou o bloqueio da neurotransmissão GABAérgica nessas estruturas produz respostas características de medo e ansiedade similares às aquelas observadas durante a abstinência ao álcool levando à hipótese de que os mesmos mecanismos neurobiológicos estão implicados tanto na ansiedade promovida pela abstinência ao álcool quanto naquela induzida por estímulos que produzem medo. Entretanto, pouco se sabe sobre a interrelação entre os mecanismos neurofuncionais subjacentes ao medo e aqueles que são recrutados durante a síndrome de abstinência às drogas de abuso. Este trabalho dá um passo nessa direção, focalizando a síndrome de abstinência ao álcool e o processamento de sinais acústicos em uma estrutura do SEA – o CI.

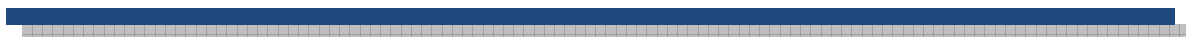
Objetivos



Dando continuidade a estudos prévios desse laboratório, esse trabalho está direcionado para investigar:

1. As possíveis modificações da reatividade dos neurônios do colículo inferior induzidas pela interrupção do tratamento crônico com álcool etílico.
2. A importância da neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica do colículo inferior nas alterações induzidas pela abstinência, através do registro dos potenciais evocados auditivos no núcleo central do colículo inferior de ratos que passaram a ser dependentes de álcool.

Materiais e Métodos



Animais

Ratos Wistar machos, pesando entre 90 e 100g no início dos experimentos, provenientes do Biotério Central do Campus da USP - Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em número de 4, em caixas de polipropileno no biotério setorial do laboratório de Neuropsicofarmacologia, com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), com água ou solução de álcool e ração à vontade, em um ciclo claro - escuro de 12 horas, com as luzes acesas às 07h00min da manhã, até o último dia de experimento. Os experimentos foram conduzidos segundo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (CEUA - Processo nº 08.1.134.53.7).

Drogas

Foram utilizados o álcool etílico, o agonista de receptores do tipo GABA_A muscimol e o antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA ácido 2-amino-7-fosfoheptanóico (AP7). As drogas muscimol e AP7 foram diluídas em salina, que também foi utilizada como solução controle. As soluções foram preparadas a partir de soluções estoque armazenadas a -10°C imediatamente antes dos experimentos.

Procedimentos para Indução de Dependência de Álcool

Cada caixa foi equipada com um bebedouro graduado contendo água + álcool 95% (v/v). Aos animais foi oferecido acesso livre (24 horas) ao álcool durante 21 dias. A

solução foi oferecida nas seguintes concentrações: 2,5% (Dias 1 a 7), 5% (dias 8 a 15) e 10% (dias 16 a 21), conforme a tabela 1. Os animais foram pesados diariamente, antes da troca das soluções. Os testes para registro dos potenciais evocados auditivos foram realizados no 21º dia (efeitos do tratamento crônico - 2 horas após a troca das soluções), 48 e 96 horas (efeitos da abstinência) após a interrupção do tratamento. Os animais foram divididos em dois grupos: um submetido à ingestão semi-voluntária forçada de álcool e outro com livre acesso ao consumo de água.

Dias	1 a 7	8 a 15	16 a 21
Concentração de álcool	2,5%	5%	10%

Tabela 1. Concentração da solução de álcool ao longo do tratamento.

Cirurgia

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica no 16º dia de tratamento para o implante de um quimitrodo (cânula-guia acoplada a um eletrodo de estimulação elétrica) direcionado ao núcleo central do colículo inferior seguindo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2003). O eletrodo de estimulação ultrapassa a cânula-guia em 1 mm. Os animais foram anestesiados com Xylazina (0,25 mg/kg) + Ketamina (0,25 mg/kg) por via intramuscular e levados a um aparelho estereotáxico digital (Insight, Brasil) onde tiveram o crânio fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após tricotomia, uma injeção subcutânea de 0,2 mL de lidocaína a 2% (Harvey, Brasil) foi aplicada na área de incisão. Logo após, o tecido

subcutâneo foi removido, assim como o periósteo (por raspagem, com auxílio de pinça, algodão e hastes flexíveis com ponta de algodão). Já com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre bregma e lambda, quatro orifícios foram feitos nos ossos parietais com uma broca elétrica (Foredom, EUA) para fixação do quimitrodo e de três parafusos para ancorar a prótese. O crânio então foi revestido com acrílico dental (JET, Brasil) para fixação das próteses (eletrodo e cânula). Após a cirurgia cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção de pentabiótico 60.000 UI (0,2 mL) e uma injeção do analgésico e antiinflamatório Banamine (2,5 mg/Kg).

Equipamentos

Para registro das respostas eletrofisiológicas foi utilizada uma gaiola de contenção (25 x 12 x 9 cm), com laterais e piso de barras de aço inoxidável espaçadas 15 mm, localizada dentro de uma gaiola de Faraday, por sua vez inserida em uma caixa de isolamento acústico e luminoso (60 x 40 x 45 cm) dotada de um auto-falante que emitia um ruído constante de 50 dB, conforme figura 2. Os PEA eram registrados como a diferença de voltagem entre o eletrodo do quimitrodo e a cânula guia implantados no CI. Os PEA foram registrados e analisados por um programa de aquisição de sinais biológicos (Bionspector, Lynx, Brasil), que também controlava a apresentação e sequência dos estímulos sonoros (100 estímulos: pulso de onda quadrada de 100 dB, 1000 ms, com frequência de apresentação de 0,33 Hz). Antes de cada sessão experimental, foi realizada a calibração dos equipamentos, de forma a permitir uma

equivalência na sensibilidade dos instrumentos ao longo dos experimentos. Os estímulos sonoros (tom puro) foram apresentados por meio de dois tweeters piezoelétricos (12 Ω , 200 W, Le Son, Brazil), montados isoladamente, 5 cm acima do piso, nas laterais da caixa de isolamento acústico e luminoso e a 15 cm de distância da gaiola de contenção.



Figura 2. Animal acomodado em gaiola de contenção durante o experimento para registro dos potenciais evocados auditivos.

Procedimento Experimental

Inicialmente, os grupos de animais foram tratados da forma já descrita. Os potenciais evocados auditivos do colículo inferior foram registrados no 21^o (último dia de tratamento - efeito crônico), 23^o e 25^o dias (48 e 96 horas de abstinência) após o início do tratamento. Os grupos experimentais álcool e água foram divididos em outros três grupos: salina, muscimol e AP7, conforme a tabela 2.

Animais	0h	48h	96h
Grupo 1	PEA	PEA + Salina	PEA + Salina
Grupo 2	PEA	PEA + Muscimol	PEA + Muscimol
Grupo 3	PEA	PEA + AP7	PEA + AP7

Tabela 2. Representação da divisão dos grupos álcool e água para os testes de PEA.

Procedimento para Microinjeção

As drogas foram administradas através de uma agulha gengival curta (30G) localizada, quando introduzida, 1 mm abaixo da ponta da cânula guia do quimitrodo, atingindo a mesma profundidade que a ponta do eletrodo. A agulha de injeção foi acoplada a uma seringa Hamilton (5 µL, EUA) por meio de um fino tubo flexível de polietileno. O volume injetado foi de 0,2 µL, com o auxílio de uma bomba eletrônica de infusão (Insight, Brasil). As microinjeções no colículo inferior foram realizadas 10 minutos antes do registro dos potenciais evocados auditivos.

Delineamento Experimental

Linha de Base

No último dia de tratamento (21^o dia), os animais foram colocados na gaiola de contenção individual, e alojados no interior da gaiola de Faraday. Foram apresentados 100 estímulos sonoros (1000 ms de duração, 100 dB de amplitude, frequência de

apresentação de 0,33 Hz) sendo registrados, ao mesmo tempo, os potenciais evocados no núcleo central do colículo inferior (amplitude em μV).

Teste 1

No 23^o dia do experimento, já caracterizada a condição de abstinência (48 horas após a interrupção do tratamento com álcool), o teste anteriormente descrito na linha de base foi novamente realizado, seguindo exatamente o mesmo procedimento. Duas horas depois as drogas em estudo foram injetadas. Dez minutos depois as amplitudes foram novamente registradas.

Teste 2

No 25^o dia do experimento, 96 horas após a interrupção do tratamento crônico, as amplitudes foram novamente registradas seguindo o mesmo procedimento observado na sessão Teste 1.

Histologia

Ao final dos experimentos os animais foram sacrificados, por meio de uma injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg/Kg). Uma perfusão intracardíaca com 150 mL de PBS seguido de 150 mL de formalina 4% serviu para a fixação do tecido cerebral. Posteriormente, os animais foram decapitados para retirada dos encéfalos, que foram mantidos numa solução de formalina por no máximo 2 horas, sendo a seguir mergulhados numa solução de sacarose (30%) por 72 horas. Os encéfalos foram então seccionados em cortes de 60 μm de espessura de

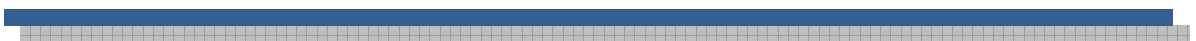
acordo com o atlas de Paxinos Watson (2003). Posteriormente, as lâminas foram montadas e coradas com vermelho neutro para localização do sítio de injeção da cânula e contato do eletrodo.

Análise Estatística

Os dados foram normalizados por meio da raiz quadrada dos dados brutos e apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados de quatro formas. Inicialmente, foram analisados apenas os efeitos da abstinência ao álcool sobre os potenciais evocados auditivos (PEA) do CI através da análise de variância (ANOVA) de dois fatores com medidas repetidas, sendo o fator 1 a condição (água x álcool) e o fator 2 o tempo de abstinência (48 x 96 horas), sendo este último a repetição. Posteriormente, foram analisados os efeitos do AP7 e do muscimol sobre os PEAs após o tempo de abstinência ao álcool por 48 horas. Foi utilizada a ANOVA de dois fatores sendo o fator 1 a condição (água x álcool) e o fator 2 os tratamentos (salina, muscimol e AP7 no colículo inferior). Em um terceiro momento, de forma idêntica a anterior, foram analisados os efeitos dos tratamentos sobre os PEAs registrados no CI após a abstinência por 96 horas sendo a condição (água x álcool) o fator 1 e os tratamentos o fator 2. Finalmente foi realizada uma análise global dos efeitos do muscimol e do AP7 sobre os diferentes períodos de abstinência ao álcool. Para cada condição (água ou álcool) foi utilizada uma análise de variância de 2 fatores (two-way ANOVA). O fator 1 foi considerado os tratamentos (salina, muscimol e AP7) e

o fator 2 o tempo de abstinência ao álcool (48 e 96 horas). As comparações *post-hoc* foram realizadas com o teste de Newman-Keuls, com $p \leq 0,05$.

Resultados



Localização dos Sítios de Microinjeção no Colículo Inferior

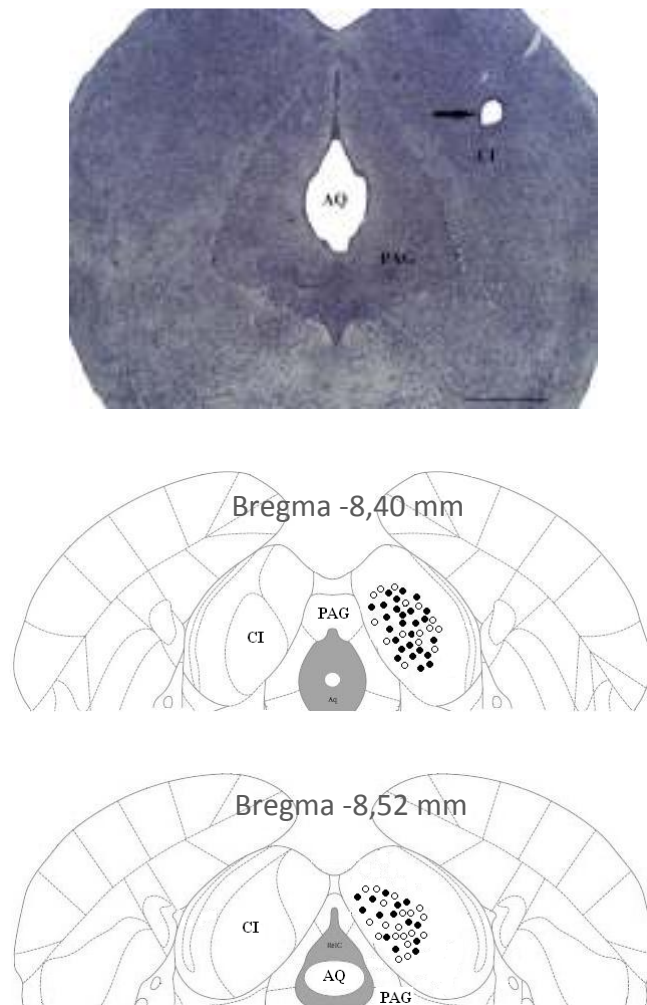


Figura 3. Fotomicrografia (acima) de um sítio representativo de registro dos potenciais evocados auditivos no colículo inferior. Abaixo: pontos de microinjeções das drogas utilizadas, segundo o atlas de Paxinos e Watson (2003). Animais cuja cânula estava fora do núcleo central do colículo inferior foram descartados deste estudo. A barra representa a escala de 500 μm . Sítio de microinjeção em ratos submetidos ao procedimento de consumo de água (o) ou álcool (•) por 21 dias. CI = colículo inferior; AQ = aqueduto; PAG = substância cinzenta periaquedutal.

Efeitos da Abstinência ao Álcool sobre a Amplitude dos Potenciais Evocados Auditivos do Colículo Inferior

A figura 4 apresenta a média da amplitude dos potenciais evocados registrados no CI durante a fase dependência e abstinência (48 ou 96 horas após a interrupção do tratamento crônico) de álcool. A ANOVA de dois fatores com medidas repetidas não revelou efeito significativo para a condição (álcool x água: $F_{1,56} = 0,20$; $p > 0,05$). Entretanto, foi detectado efeito significativo no fator tempo de abstinência ($F_{2,56} = 10,04$; $p < 0,05$), assim como interação entre os dois fatores (condição x abstinência: $F_{2,56} = 17,27$; $p < 0,05$). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que animais testados sob a influência do álcool (condição dependência) apresentam um decréscimo na amplitude dos potenciais. Por outro lado, a abstinência ao álcool induziu um aumento na amplitude desses mesmos potenciais. A análise *post-hoc* mostrou também que a abstinência de 96 horas produz um aumento significativo dos PEAs quando comparados com os resultados obtidos com o teste 48 horas. A figura 5 mostra três PEAs registrados nas condições controle, dependência e abstinência.

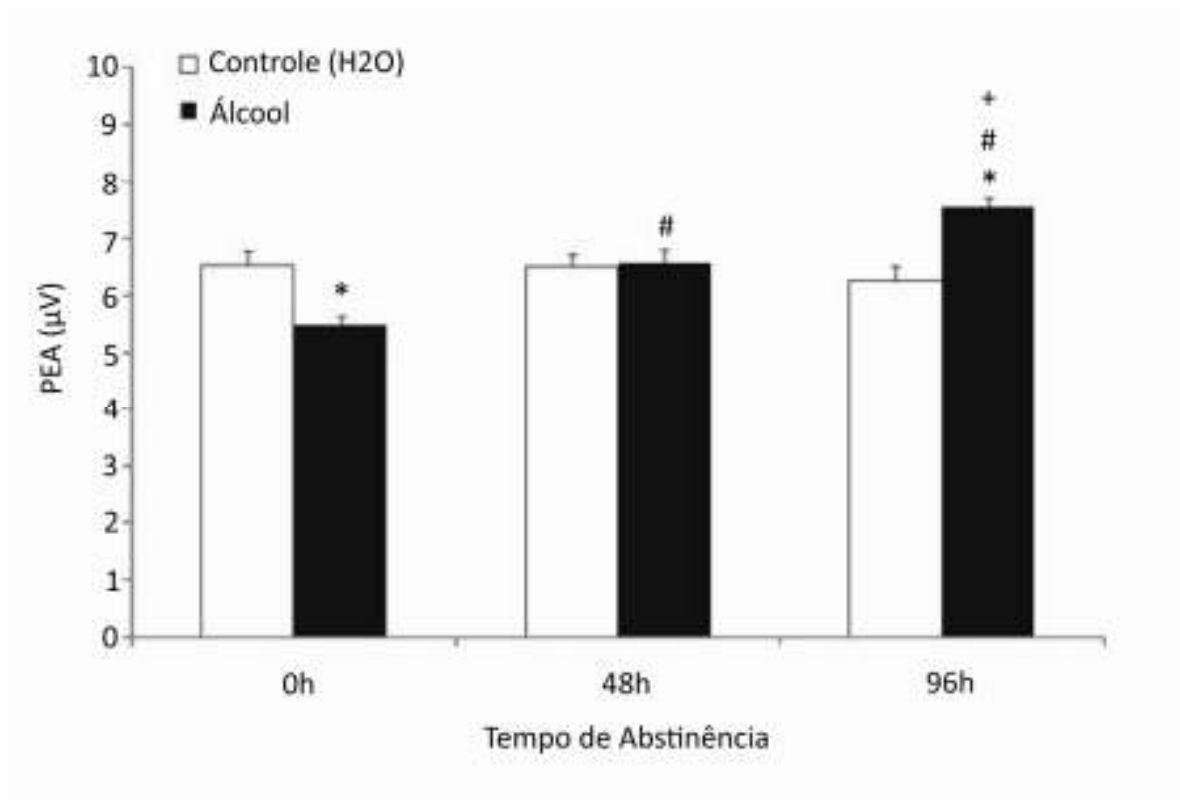


Figura 4. Efeitos da interrupção do tratamento crônico com álcool sobre a amplitude média dos potenciais evocados auditivos registrados no colículo inferior de ratos testados 48 ou 96 horas. * Diferença significativa da condição (água x álcool). # Diferença significativa entre a condição 48 horas ou 96 horas x controle 0 hora (efeito do tratamento crônico x abstinência). + Diferença significativa entre os tempos de abstinência de 96 x 48 horas. Os dados, normalizados, estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de dois fatores com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls, com $p < 0,05$.

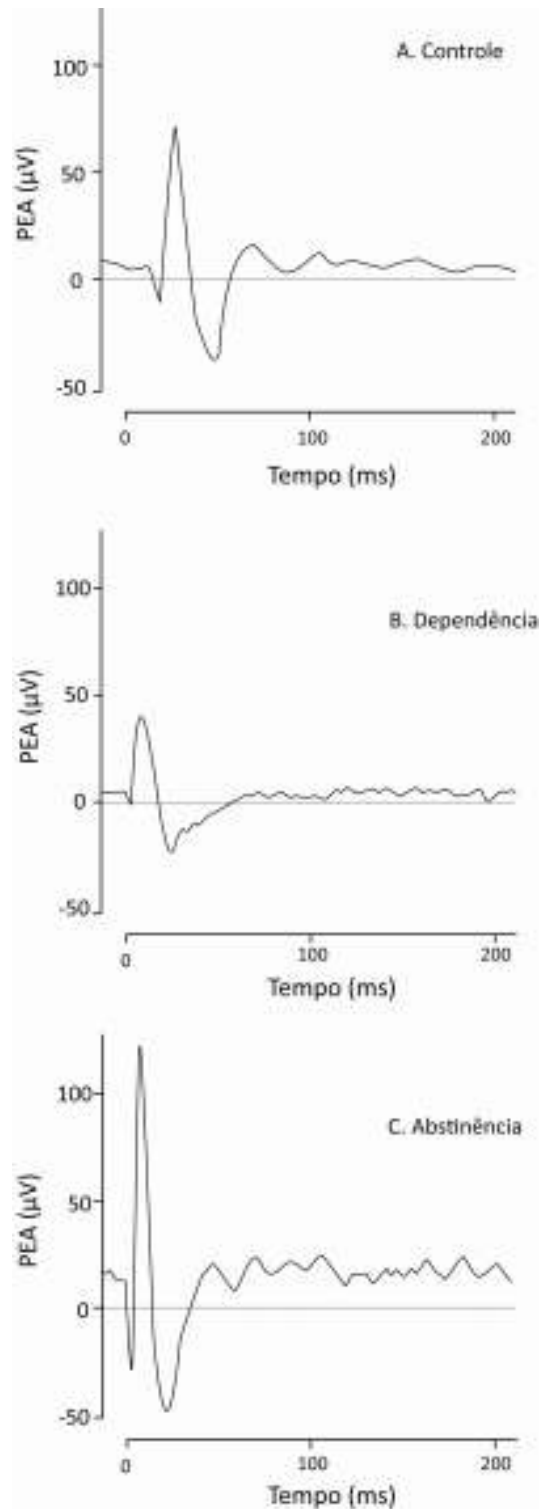


Figura 5. Registro representativo dos potenciais evocados auditivos registrados no núcleo central do colículo inferior de um animal testado na condição controle (A), na dependência (B) ou durante a abstinência ao álcool (C).

Efeitos da Microinjeção Intracollicular de Muscimol ou AP7 sobre os PEA Registrados no Colículo Inferior de Ratos com 48 horas de Abstinência

A figura 6 apresenta os efeitos das microinjeções de muscimol ou de AP7, diretamente no Clc, sobre as amplitudes dos PEAs registrados no CI de ratos dependentes de álcool, testados 48 horas após a interrupção da droga (abstinência). A ANOVA de dois fatores revelou que não houve efeito significativo da condição (álcool x água: $F_{1,32} = 2,32$; $p > 0,05$), entretanto detectou diferença significativa entre os tratamentos ($F_{3,32} = 16,70$; $p < 0,05$). Não houve interação significativa entre os fatores ($F_{3,32} = 1,38$; $p > 0,05$). O teste de Newman-Keuls mostrou que o muscimol reduz a amplitude dos potenciais em ambos os grupos controle e álcool. Por outro lado, a ação inibitória do AP7 foi verificada apenas no grupo controle.

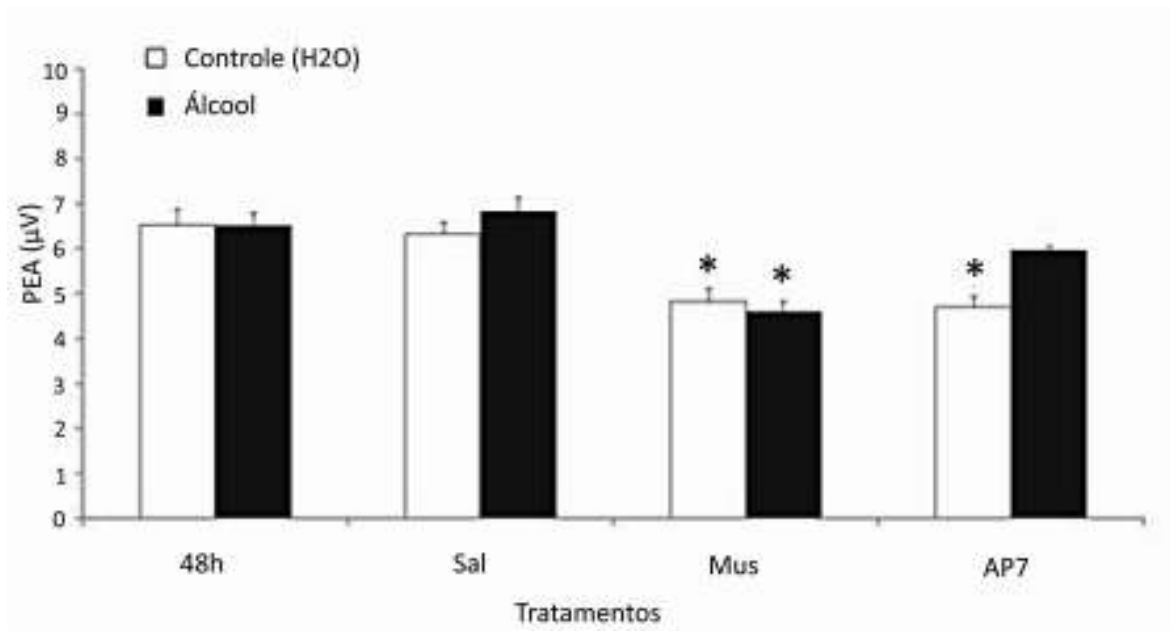


Figura 6. Efeitos da administração local, no núcleo central do colículo inferior, de muscimol ou AP7 sobre os PEA registrados em ratos testados com 48 horas de abstinência ao álcool. * Diferença significativa dos tratamentos (muscimol ou AP7) em relação à salina em cada condição (controle ou álcool) em animais que receberam água ou álcool por 21 dias. Os dados, normalizados, estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de dois fatores seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls, com $p < 0,05$.

Efeitos da Microinjeção Intracollicular de Muscimol ou AP7 sobre os Potenciais Evocados Auditivos Eliciados no Colículo Inferior de Ratos Testados após 96 horas de Abstinência

A figura 7 apresenta os efeitos das microinjeções de muscimol ou de AP7, diretamente no CI, sobre as amplitudes dos potenciais evocados auditivos registrados no CI de ratos dependentes de álcool, testados 96 horas após a interrupção da droga (abstinência). A ANOVA de dois fatores revelou efeito significativo para o fator condição (álcool x água: $F_{1,107} = 7,02$), entre os tratamentos ($F_{3,107} = 44,6$; $p < 0,05$) e interação significativa entre os dois fatores (condição x tratamento: $F_{3,107} = 4,22$; $p < 0,05$). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou um aumento na amplitude dos potenciais evocados no CI durante a abstinência ao álcool em 96 horas quando comparado ao controle. Com as microinjeções de salina e de muscimol no CI, os animais tratados com álcool apresentaram um aumento significativo dos potenciais evocados. O teste revelou que o AP7, quando administrado diretamente no CI, foi eficaz em reduzir a amplitude dos PEAs nos animais do grupo álcool quando abstinentes em 96 horas.

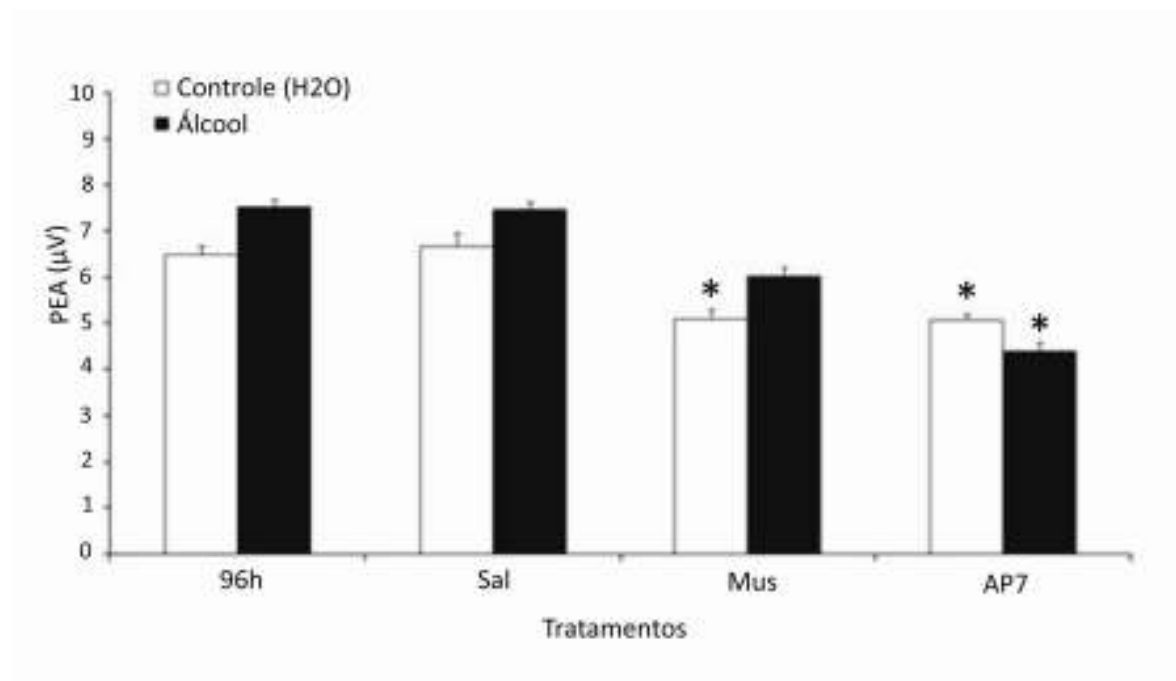


Figura 7. Efeitos da administração local, no núcleo central do colículo inferior, de muscimol ou AP7 sobre as alterações induzidas nos potenciais evocados auditivos de ratos testados após 96 horas de abstinência ao álcool. * Diferença significativa entre os tratamentos (muscimol ou AP7) em relação à salina nos animais que receberam água ou álcool por 21 dias. Os dados, normalizados, estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de dois fatores seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls, com $p < 0,05$.

Influência do Tempo de Abstinência sobre o Efeito das Drogas

As figuras 8 e 9 apresentam as amplitudes dos PEA registrados 48 e 96 horas após a interrupção dos tratamentos juntamente com a influência das microinjeções de muscimol e de AP7, administrados diretamente no CI, sobre essas amplitudes. A ANOVA de dois fatores revelou diferença significativa para o fator condição (álcool x água: $F_{1,196} = 4,80$; $p < 0,05$) e para o fator tratamento (muscimol x AP7: $F_{2,196} = 42,15$; $p < 0,05$) mas não para o fator tempo de abstinência (48 x 96 horas: $F_{1,196} = 1,51$; $p > 0,05$). Foi detectado efeito significativo entre tratamento e tempo de abstinência ($F_{2,196} = 4,19$; $p < 0,05$) assim como interação significativa entre condição, tempo de abstinência e tratamento ($F_{2,196} = 4,61$; $p < 0,05$). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que ambos os tratamentos produzem efeitos similares nos animais do grupo controle, mas efeitos diferenciados nos animais pré-tratados com álcool e testados durante a abstinência. Nesses animais o muscimol produz um efeito depressor pronunciado sobre as amplitudes dos PEAs registrados no CI após 48 horas de abstinência. Por outro lado, o AP7 produziu maior eficácia nos animais testados sob 96 horas de abstinência.

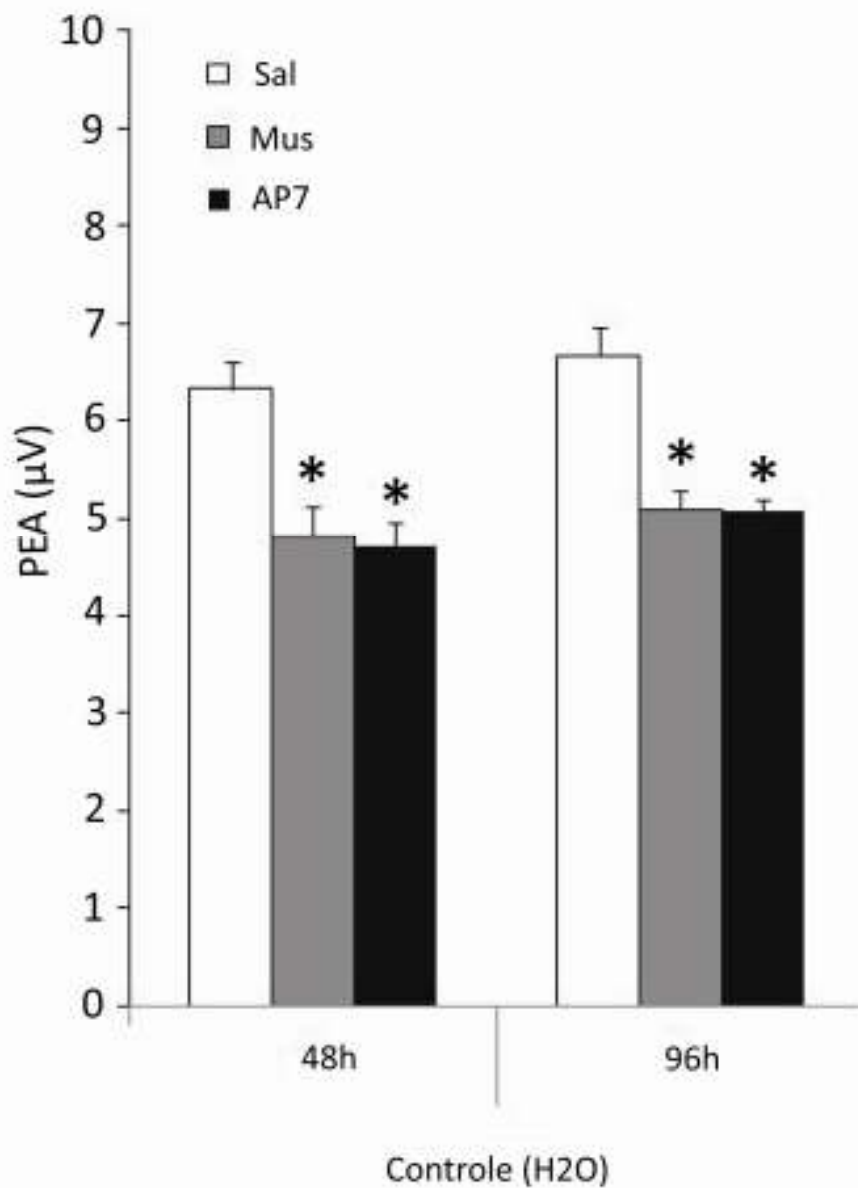


Figura 8. Efeitos da administração local, no núcleo central do colículo inferior, de muscimol ou AP7 sobre as alterações induzidas nos potenciais evocados auditivos de ratos controle (água por 21 dias) testados após 48 ou 96 horas. * Diferença significativa entre muscimol ou AP7 em relação à salina, dentro de cada tempo (48 ou 96 horas). Os dados, normalizados, estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de dois fatores seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls, com $p < 0,05$

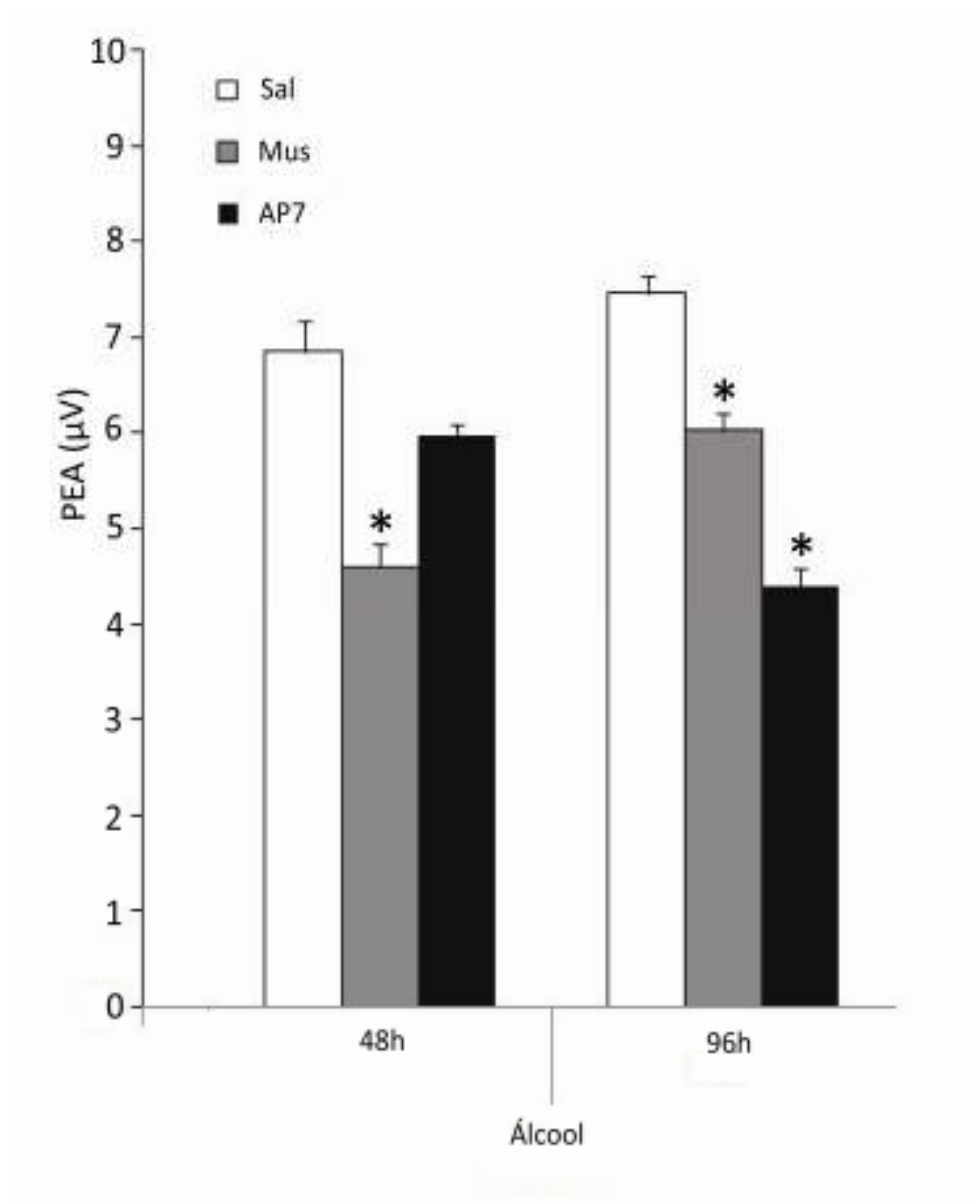
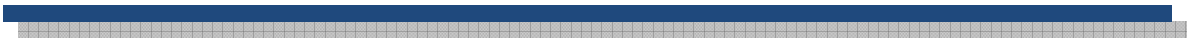


Figura 9. Efeitos da administração local, no núcleo central do colículo inferior, de muscimol ou AP7 sobre as alterações induzidas nos potenciais evocados auditivos de ratos testados após 48 ou 96 horas de abstinência ao álcool. * Diferença significativa entre muscimol ou AP7 em relação à salina, dentro de cada tempo de abstinência (48 ou 96 horas). Os dados, normalizados, estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de dois fatores seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls, com $p < 0,05$.

Discussão



Os fatores que podem contribuir para a iniciação do consumo de álcool e/ou o seu uso crônico são os altos níveis de ansiedade e a ansiedade aumentada associada com a retirada de álcool (Bibb & Chambless, 1986; Breese *et al.*, 2005; Cappell & Herman, 1972; Cornelius *et al.*, 2003; Koob, 2003; Schuckit & Hesselbrock, 1994). Um estudo internacional que investiga modelos de comorbidade entre o uso de substâncias e distúrbios psiquiátricos, sugeriu que a presença de ansiedade pode predispor um indivíduo ao desenvolvimento do uso de álcool (Merikangas *et al.*, 1998).

Em animais previamente classificados como ansiosos, o álcool induz preferência condicionada ao lugar depois de um curto período de condicionamento, fortalecendo a hipótese de que a ansiedade pode contribuir para a vulnerabilidade à ingestão de álcool (Spanagel *et al.*, 1995; Blatt & Takahashi, 1999).

O efeito ansiolítico do álcool pode ser uma motivação importante para o seu consumo, pelo menos em indivíduos que são suscetíveis a esse efeito (Pohorecky, 1981; Spanagel *et al.*, 1995). Sua ingestão diminui rapidamente os níveis de ansiedade, a tensão, assim como a percepção do estresse (Kushner *et al.*, 1990).

Uma série de dados comportamentais, imunoistoquímicos e eletrofisiológicos sugerem o envolvimento do CI na geração e modulação do comportamento defensivo induzido por estímulos aversivos (Brandão *et al.*, 1993; Silveira *et al.*, 1993; Cardoso *et al.*, 1994; Lamprea *et al.*, 2002), já que algumas evidências de conexões anatômicas recíprocas têm sido obtidas entre o CI, o CS e a SCPd, que são estruturas pertencentes ao SEA (Moore & Goldberg, 1963; Carey & Webster, 1971; Kudo & Niimi, 1980; Meininger *et al.*, 1986; Herrera *et al.*, 1988; Olazábal & Moore, 1989).

Evidências obtidas neste laboratório indicam que o substrato neural da aversão no CI está sujeito a influências inibitórias por mecanismos GABAérgicos, serotoninérgicos e opióides, bem como é ativado por mecanismos excitatórios mediados pelo glutamato e aspartato, da mesma forma que são influenciadas as demais estruturas do SEA. Além disso, o CI mantém estreitas conexões anatômicas com a SCP e a AM (Brandão *et al.*, 1999).

Estruturas localizadas no teto mesencefálico possuem altas concentrações do aminoácido gama-aminobutírico (GABA) e da enzima descarboxilase do ácido glutâmico (DAG), particularmente no CI (Shiraishi *et al.*, 2001). A participação do sistema GABAérgico do CI na mediação das respostas aversivas foi primeiramente mostrada em um estudo com a administração do antagonista de receptores GABA_A, bicuculina, nessa estrutura, que levou à hipótese da participação de uma inibição GABAérgica tônica sobre os estados aversivos mediados pelos substratos neurais do CI, além de sugerir ser essa também uma estrutura participante do SEA (Brandão *et al.*, 1988).

A administração, a dependência e a síndrome de abstinência ao álcool associam-se com modificações extensas nas ações de aminoácidos neurotransmissores (Faingold *et al.*, 1998; Mihic, 1999; Wirkner *et al.*, 1999). O GABA desempenha um importante papel na ação do álcool, e as modificações na sua ação em regiões cerebrais específicas durante a abstinência foram observadas (Harris *et al.*, 1997; Mhatre & Ticku, 1992; Peris *et al.*, 1997; Sapp & Yeh, 1998; Tatebayashi *et al.*, 1998; Weiner *et al.*, 1997). Ações do aminoácido glutamato em certos sítios cerebrais contribuem para os efeitos do álcool, e as modificações na neurotransmissão

glutamatérgica durante sua retirada também são bem conhecidas (Blevins *et al.*, 1997; Grover *et al.*, 1998; Hu & Ticku, 1995; Kumari & Ticku, 1998; Nieber *et al.*, 1998; Peoples *et al.*, 1997; Smothers *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1998; Wirkner *et al.*, 1999; Woodward, 1999). Uma síndrome complexa é observada durante a abstinência, que inclui a suscetibilidade a crises em homem e animais (Hauser *et al.*, 1990). No rato, a crise é prontamente provocada por estímulos acústicos (Faingold *et al.*, 1998; Frye *et al.*, 1983; McCown & Breese, 1993; Riaz & Faingold, 1994). Não deve causar surpresa o envolvimento do CI nestes efeitos uma vez que ele desempenha um papel crítico no processamento da informação auditiva (Caird *et al.*, 1991; Palombi & Caspary, 1996).

Várias evidências sugerem que o CI está envolvido na produção de crises audiogênicas (McCown *et al.*, 1984; Millan *et al.*, 1986; Garcia-Cairasco & Sabatini, 1991; Terra & Garcia-Cairasco, 1992; Tsutsui *et al.*, 1992) e que essa região é um local crítico para o início dessas crises durante a abstinência ao álcool (Faingold, 1999; Faingold *et al.*, 1992; Le Gal La Salle & Naquet, 1990; Ribak *et al.*, 1988). Como o CI está primariamente envolvido com o processamento da informação auditiva, isto pode ser importante no processamento da informação acústica de natureza aversiva como, por exemplo, utilizar um som como reforço condicionado negativo (Brandão *et al.*, 1997; Troncoso *et al.*, 1998). Tem sido proposto que neurônios do CI são filtros para sons que precisam de ações imediatas, como certos sons emitidos por presas e predadores (Casseday & Covey, 1996).

Nesse estudo foram registrados os PEAs a partir de quimitrodos situados no CI, que nos permitiu avaliar o nível de ativação desta estrutura, a partir da apresentação de um estímulo sonoro, durante os estados de dependência e abstinência ao álcool,

juntamente com a influência das microinjeções de muscimol (agonista de receptores GABA_A) e de AP7 (antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA). Potenciais evocados sensoriais têm sido usados em estudos sobre os efeitos do álcool no SNC de humanos. Reduções significativas na amplitude dos PEAs são normalmente relatadas após a ingestão de álcool (Gross *et al.*, 1966). Resultados similares têm sido apresentados com animais. Demonstramos que os 21 dias de tratamento crônico com álcool foram eficientes em reduzir o PEA dos animais, e que a abstinência ao álcool, após esse tratamento crônico, induz alterações eletrofisiológicas significativas nos neurônios do CI, como revelado pelo aumento pronunciado na amplitude do potencial evocado por estímulos auditivos nos animais abstinentes.

No uso crônico do álcool ocorre estimulação GABAérgica e na síndrome de abstinência ocorre a redução da resposta inibitória compensatória, ou seja, o GABA deixa de exercer sua atividade inibitória através dos receptores GABA_A. Bagri *et al.* (1989), estudando crises audiogênicas, mostraram que o bloqueio dos receptores GABA_A promoveu um aumento no PEA no CI, enquanto que os agonistas GABA_A atenuaram este potencial, assim como mostrado nesse estudo. Estudos anteriores demonstraram que os PEAs são aumentados pela microinjeção de bicuculina (antagonista dos receptores GABA_A) no CI (Bagri *et al.*, 1989; Brandão *et al.*, 2001; Sandner *et al.*, 2002). Evidências de outros laboratórios sugerem que esta alteração na amplitude dos potenciais evocados pode ser considerada como reflexo de modificações sinápticas no CI (Szczepaniak & Moller, 1995). Gerken *et al.* (1984), demonstraram que o agonista GABAérgico muscimol potencializa o efeito sedativo do etanol e que o antagonista GABAérgico picrotoxina reduz esse efeito.

Faingold *et al.* (2000), apresentaram evidências que a síndrome de abstinência ao álcool reduz a neurotransmissão GABAérgica e acentua a neurotransmissão glutamatérgica no CI de ratos. Os efeitos da abstinência ao álcool na neurotransmissão GABAérgica são consistentes com vários outros estudos que sugerem que esta redução pode ser devida, em parte, à dessensibilização ou ao “down-regulation” do receptor GABA_A após exposição prolongada ao álcool (McDonald, 1995; Mehta & Ticku, 1992; Nevo & Hamon, 1995; Pearson *et al.*, 1997). Receptores GABA_A estão envolvidos nos efeitos agudos e crônicos do álcool, incluindo tolerância, dependência e abstinência. Estudos utilizando modelos animais de dependência ou amostras de tecido cerebral humano *post mortem* têm mostrado que o uso crônico de álcool resulta em alterações nesses receptores em diferentes regiões cerebrais.

Muitos estudos mostram que o GABA tem uma função regulatória nos estados aversivos gerados e elaborados no CI (Brandão *et al.*, 1988; 1993; 1994; 1999). Neste contexto, a semicarbazida, um inibidor da enzima DAG, tem sido usada em estruturas relacionadas a comportamentos de defesa, pois produz uma redução lenta e gradual nos níveis de GABA, que resulta no aparecimento progressivo de comportamentos defensivos (Aguiar & Brandão, 1994; Brandão *et al.*, 1986; Nobre *et al.*, 2003). As injeções de semicarbazida no CI produzem um comportamento de congelamento, com aumento da amplitude dos PEAs, indicando que, no CI, mecanismos GABAérgicos estão envolvidos na interface sensório-motora (Aguiar & Brandão, 1994; Brandão *et al.*, 1986; Nobre *et al.*, 2003).

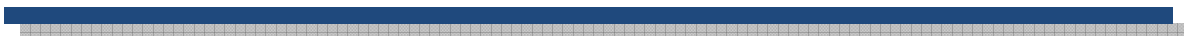
A administração crônica de álcool também induz alterações eletrofisiológicas e comportamentais mediadas por aminoácidos excitatórios, na qual os receptores

NMDA possuem um importante papel. O glutamato é fortemente implicado como o maior neurotransmissor excitatório do CI (Faingold *et al.*, 1989; Caspary *et al.*, 1990; Najlerahim *et al.*, 1990; Oliver *et al.*, 1995; Feliciano & Potashner, 1995; Goldsmith *et al.*, 1995). Para a neurotransmissão glutamatérgica, tem sido relatado que a abstinência ao álcool resulta em aumento da ativação dos receptores glutamatérgicos, provocando um “up-regulation” (Grant *et al.*, 1990; Mirshahi & Woodward, 1995; Morrisett, 1994; Nie *et al.*, 1993) associado com um aumento da ligação desses receptores (Hu & Ticku, 1995; Spuhler-Phillips *et al.*, 1995). O “up-regulation” dos receptores NMDA é considerado uma grande resposta neuroadaptativa em função de seu bloqueio pelo uso crônico do álcool (Fadda & Rossetti, 1998). Administração de antagonistas glutamatérgicos NMDA reduz o comportamento e os sintomas da abstinência ao álcool (Grant *et al.*, 1990; Liljequist, 1991; Morrisett *et al.*, 1990; Rossetti & Carboni, 1995), enquanto o agonista NMDA piora isto (Danysz *et al.*, 1992; Davidson *et al.*, 1995; Morrisett *et al.*, 1990; Sanna *et al.*, 1993). Portanto, a administração de agonistas NMDA em animais abstinentes ao álcool provoca hiperatividade (Grant *et al.*, 1990; Sanna *et al.*, 1993; Hu & Ticku, 1995), mortalidade (Davidson *et al.*, 1993; Sanna *et al.*, 1993) e danos morfológicos (Davidson *et al.*, 1995) quando comparados a animais controle.

Brandão *et al.* (2001), mostraram claramente que microinjeções de glutamato no CI aumentam a amplitude do PEA, de forma que as respostas dos neurônios do CI que são responsáveis pelo processamento da informação auditiva são potencializadas. Estes dados sugerem um balanço envolvendo o glutamato no processamento da informação acústica e na geração de respostas aversivas por estimulação auditiva.

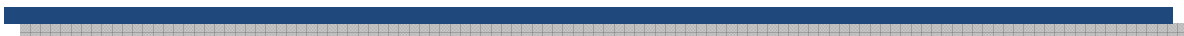
Neste contexto, nossos resultados mostram que a abstinência ao álcool produz um estado aversivo através da ativação de substratos neurais de medo no CI com o aumento do PEA nos ratos abstinentes, sendo os mecanismos mediados por aminoácidos excitatórios nesta estrutura mesencefálica os que são mais ativados após a retirada do álcool.

Conclusões



1. O consumo crônico de álcool determinou uma redução no processamento de informação auditiva no colículo inferior.
2. A síndrome de abstinência ao álcool causa um aumento da sensibilidade do colículo inferior ao som. Estes efeitos são tardios, aparecem somente após 96 horas da retirada do álcool.
3. Mecanismos GABAérgicos e mediados por aminoácidos excitatórios modulam a transmissão de sinais auditivos pelo colículo inferior: GABA inibe e o NMDA ativa esta via.
4. Na abstinência os mecanismos mediados por NMDA são prevalentes em relação aos mecanismos GABAérgicos na medida que os efeitos do AP7 são mais intensos após 96 horas de abstinência, enquanto que o muscimol produz efeitos apenas moderados nessa condição.

Referências Bibliográficas



Adams, J.C. 1979. Ascending projections to the inferior colliculus. *J. Comp. Neurol.*, 183: 519-538.

Adams, J.C. & Wenthold, R.J. 1979. Distribution of putative amino acid transmitters, choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase in the inferior colliculus. *Neuroscience*, 4: 1947-1951.

Adams, J.C. 1980. Crossed and descending projections to the inferior colliculus. *Neurosci. Lett.*, 19: 1-5.

Aguiar, M.S. & Brandão, M.L. 1994. Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. *Behav. Pharmacol.*, 5: 369-373.

Aitkin, L. 1983. *The Auditory Midbrain*. New Jersey: Humana Press.

Allan, C.A. 1995. Alcohol problems and anxiety disorders--a critical review. *Alcohol Alcohol.*, 30: 145-151.

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. 1994. Washington DC, American Psychiatric Press.

Audi, E.A. & Graeff, F.G. 1987. GABAA receptors in the midbrain central grey mediate the antiaversive action of GABA. *Eur. J. Pharmacol.*, 135: 225-229.

Avila, M.A., Ruggiero, R.N., Cabral, A., Brandão, M.L., Nobre, M.J. & Castilho VM. 2008. Involvement of the midbrain tectum in the unconditioned fear promoted by morphine withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.*, 590: 217-223.

Bagri, A., Sandner, G. & Di Scala, G. 1989. Effects of unilateral microinjections of GABAergic drugs into the inferior colliculus on auditory evoked potentials and on audiogenic seizure susceptibility. *Exp. Neurol.*, 104: 82-87.

Biacabe, B., Chevallier, J.M., Avan, P. & Bonfils, P. 2001. Functional anatomy of auditory brainstem nuclei: application to the anatomical basis of brainstem auditory evoked potentials. *Auris Nasus Larynx*, 28: 85-94.

Bibb, J.L. & Chambless, D.L. 1986. Alcohol use and abuse among diagnosed agoraphobics. *Behav. Res. Ther.*, 24: 49-58.

Blanchard, D.C. & Blanchard, R.J. 1988. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu. Rev. Psychol.*, 39: 43-68.

Blatt, S.L. & Takahashi, R.N. 1999. Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 457-461.

Blevins, T., Mirshahi, T., Chandler, L.J. & Woodward, J.J. 1997. Effects of acute and chronic ethanol exposure on heteromeric N-methyl-D-aspartate receptors expressed in HEK 293 cells. *J. Neurochem.*, 69: 2345-2354.

Borlikova, G.G., Le Merrer, J. & Stephens, D.N. 2006. Previous experience of ethanol withdrawal increases withdrawal-induced c-fos expression in limbic areas, but not withdrawal-induced anxiety and prevents withdrawal-induced elevations in plasma corticosterone. *Psychopharmacology (Berl)*, 185: 188-200.

Bormann, J. 2000. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21: 16-19.

Bovier, P., Broekkamp, C.L. & Lloyd, K.G. 1982. Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats induced by electrical stimulation of the periaqueductal grey region. *Brain Res.*, 248: 313-320.

Bowery, N.G., Hudson, A.L. & Price, G.W. 1987. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 20: 365-383.

Brandão, M.L., Fontes, J.C. & Graeff, F.G. 1980. Facilitatory effect of ketamine on punished behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13: 1-4.

Brandão, M.L., De Aguiar, J.C. & Graeff, F.G. 1982. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 16: 397-402.

Brandão, M.L., Vasquez, E.C., Cabral, A.M. & Schmitt, P. 1985. Chlordiazepoxide and morphine reduce pressor response to brain stimulation in awake rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 23: 1069-1071.

Brandão, M.L., Di Scala, G., Bouchet, M.J. & Schmitt, P. 1986. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24: 497-501.

Brandão, M.L., Tomaz, C., Borges, P.C., Coimbra, N.C. & Bagri, A. 1988. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiol. Behav.*, 44: 361-365.

Brandão, M.L., Coimbra, N.C. & Borges, P.C. 1990. Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 14: 495-499.

Brandão, M.L., Melo, L.L. & Cardoso, S.H. 1993. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Behav Brain Res.* 58: 49-55.

Brandão, M. L., Cardoso, S. H., Melo, L. L., Motta, V., & Coimbra, N. C. 1994. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 18: 339–346.

Brandão, M.L., Troncoso, A.C, Melo, L.L. & Sandner, G. 1997. Active avoidance learning using brain stimulation applied to the inferior colliculus as negative reinforcement in rats: evidence for latent inhibition. *Neuropsychobiology*, 35: 30–35.

Brandão, M.L., Anseloni, V.Z., Pandossio, J.E., DeAraujo, J.E. & Castilho, V.M. 1999. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23: 863-875.

Brandão, M.L., Coimbra, N.C. & Osaki, M.Y. 2001. Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. *Physiol. Behav.*, 72: 365-372.

Brandão, M.L., Borelli, K.G., Nobre, M.J., Santos, J.M., Albrechet-Souza, L., Oliveira, A.R. & Martinez, R.C. 2005. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29: 1299-1311.

Breese, G.R., Criswell, H.E., Carta, M., Dodson, P.D., Hanchar, H.J., Khisti, R.T., Marni, M., Ming, Z., Morrow, A.L., Olsen, R.W., Otis, T.S., Parsons, L.H., Penland, S.N.,

Roberto, M., Siggins, G.R., Valenzuela, C.F. & Wallner, M. 2005. Basis of the gabamimetic profile of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 30: 731-744.

Buck, K.J. & Harris, R.A. 1991. Neuroadaptive responses to chronic ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 15: 460-470.

Cabral, A., Isoardi, N., Salum, C., Macedo, C.E., Nobre, M.J., Molina, V.A. & Brandão, M.L. 2006. Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG. *Exp. Neurol.*, 200: 200-208.

Cabral, A., De Ross, J., Castilho, V.M., Brandão, M.L. & Nobre, M.J. 2009. Glutamate receptor antagonism in inferior colliculus attenuates elevated startle response of high-anxiety diazepam-withdrawn rats. *Neuroscience*, 161: 707-17.

Caird, D.M., Palmer, A.R. & Rees, A. 1991. Binaural masking level difference effects in single units of the guinea pig inferior colliculus. *Hear. Res.*, 57: 91-106.

Cappell, H. & Herman, C.P. 1972. Alcohol and tension reduction. A review. *Q. J. Stud. Alcohol.*, 33: 33-64.

Carboni, S., Isola, R., Gessa, G.L. & Rossetti, Z.L. 1990. Ethanol prevents the glutamate release induced by N-methyl-D-aspartate in the rat striatum. *Neurosci. Lett.*, 152: 133-136.

Cardoso, S.H., Coimbra, N.C. & Brandão, M.L. 1994. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behav. Brain Res.*, 63: 17-24.

Carey, C.L. & Webster, D.B. 1971. Ascending and descending projections of the inferior colliculus in the Kangaroo rat (*Dipodomys merriami*). *Brain Behav. Evol.*, 4: 401-412.

Caspary, D.M., Raza, A., Lawhorn-Armour, B.A., Pippin, J. & Arneric, S.P. 1990. Immunocytochemical and neurochemical evidence for age-related loss of GABA in the inferior colliculus: implications for neural presbycusis. *J. Neurosci.*, 10: 2363-2372.

Casseday, J.H. & Covey, E. 1996. A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. *Brain Behav. Evol.*, 47: 311-336.

Castilho, V.M. & Brandão, M.L. 2001. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, 155: 154-162.

Castilho, V.M., Borelli, K.G., Brandão, M.L. & Nobre, M.J. 2008. Anxiety-like symptoms induced by morphine withdrawal may be due to the sensitization of the dorsal periaqueductal grey. *Physiol. Behav.*, 94: 552-562.

Chastain, G. 2006. Alcohol, neurotransmitter systems, and behavior. *J. Gen. Psychol.*, 133: 329-335.

Chu, N.C., Squires, K.C. & Starr, A. 1978. Auditory Brain Stem Potentials in Chronic Alcohol Intoxication and Alcohol Withdrawal. *Arch. Neurol.*, 35(9): 596-602.

Chu, D.C., Albin, R.L., Young, A.B. & Penney, J.B. 1990. Distribution and kinetics of GABA_B binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience*, 34: 341-357.

Coimbra, N.C., Leão-Borges, P.C. & Brandão, M.L. 1989. GABAergic fibers from substantia nigra pars reticulata modulate escape behavior induced by midbrain central gray stimulation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22: 111-114.

Coimbra, N.C., Tomaz, C. & Brandão, M.L. 1992. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. *Behav. Brain. Res.*, 50: 77-83.

Coimbra, N.C. & Brandão, M.L. 1993. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. *Behav. Brain. Res.*, 59: 131-139.

Coimbra, N.C. & Brandão, M.L. 1997. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behav. Brain Res.*, 87: 97-103.

Coleman, J.R. & Clerici, W.J. 1987. Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 262: 215-226.

Contreras, N.E. & Bachelard, H.S. 1979. Some neurochemical studies on auditory regions of mouse brain. *Exp. Brain Res.*, 36: 573-584.

Cornelius, J.R., Bukstein, O., Salloum, I. & Clark, D. 2003. Alcohol and psychiatric comorbidity. *Recent Dev. Alcohol.*, 16: 361-374.

Cuadra, G., Zurita, A., Macedo, C.E., Molina, V.A. & Brandão M.L. 2000. Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex. *Brain Res. Bull.*, 52: 413-418.

Danysz, W., Dyr, W., Jankowska, E., Glazewski, S. & Kostowski, W. 1992. The involvement of NMDA receptors in acute and chronic effects of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 16: 499-504.

Davidson, M.D., Wilce, P. & Shanley, B.C. 1993. Increased sensitivity of the hippocampus in ethanol-dependent rats to toxic effect of NMDA in vivo. *Brain Res.*, 606: 5-9.

Davidson, M.D., Shanley, B.C. & Wilce, P. 1995. Increased NMDA-induced excitability during ethanol withdrawal: a behavioural and histological study. *Brain Res.*, 674: 91-96.

Engel, J.A., Fahlke, C., Hard, E., Johannessen, K., Svensson, L. & Soderpalm, B. 1992. Serotonergic and dopaminergic involvement in ethanol intake. *Clin. Neuropharmacol.*, 15: 64-65.

Fadda, F. & Rossetti, Z.L. 1998. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.*, 56: 385-431.

Faingold, C.L, Hoffmann, W.E. & Caspary, D.M. 1989. Effects of excitant amino acids on acoustic responses of inferior colliculus neurons. *Hearing Res.*, 40: 127-136.

Faingold, C.L., Naritoku, D.K., Copley, C.A., Randall, M.E., Riaz, A.; Boersma Anderson, C.A. & Arneric, S.P. 1992. Glutamate in the inferior colliculus plays a critical role in audiogenic seizure initiation. *Epilepsy Res.*, 13: 95-105.

Faingold, C.L., N’Gouemo, P. & Riaz, A. 1998. Ethanol and neurotransmitter interactions – from molecular to integrative effects. *Prog. Neurobiol.*, 55: 509-535.

Faingold, C.L. 1999. Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. In *Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 311-321, Lippincott-Raven, New York.

Faingold, C., Yang, L. & Evans, M.S. 2000. Decreased GABA and increased glutamate receptor-mediated activity on inferior colliculus neurons in vitro are associated with susceptibility to ethanol withdrawal seizures. *Brain Research.*, 868: 287-295.

Fay, R.R. & Popper, A.N. 2000. Evolution of hearing in vertebrates: the inner ears and processing. *Hear. Res.*, 149: 1-10.

Faye-Lund, H. & Osen, K.K. 1985. Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 171: 1-20.

Feliciano, M. & Potashner, S.J. 1995. Evidence for a glutamatergic pathway from the guinea pig auditory cortex to the inferior colliculus. *J. Neurochem.*, 65: 1348-1357.

Fisher, S.K. & Davies, W.E. 1976. GABA and its related enzymes in the lower auditory system of the guinea pig. *J. Neurochem.*, 27: 1145-1155.

Fontanesi, L.B., Ferreira, R., Cabral, A., Castilho, V.M., Brandão, M.L. & Nobre, M.J. 2007. Brainstem areas activated by diazepam withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain Res.*, 1166: 35–46.

Frye, G.D., McCown, T.J. & Breese, G.R. 1983. Characterization of susceptibility to audiogenic seizures in ethanol-dependent rats after microinjection of gamma-

aminobutyric acid (GABA) agonists into the inferior colliculus, substantia nigra or medial septum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 227: 663-670, 1983.

Gans, C. 1992. An overview of the evolutionary biology of hearing. (Webster DB, Popper AN, eds).

Garcia-Cairasco, N. & Sabbatini, R.M. 1991. Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in Wistar rats. *Physiol. Behav.*, 50: 421-427.

Garcia-Cairasco, N. 2002 A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear. Res.*, 168: 208-222.

Gerken, G.M., Saunders, S.S. & Paul, R.E. 1984. Hypersensitivity to electrical stimulation of auditory nuclei follows hearing loss in cats. *Hear. Res.*, 13: 249-259.

Glendenning, K.K. & Baker, B.N. 1988. Neuroanatomical distribution of receptors for three potential inhibitory neurotransmitters in the brainstem auditory nuclei of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 275: 288-308.

Goldsmith, J.D., Kujawa, S.G., McLaren, J.D. & Bledsoe, S.C.Jr. 1995. In vivo release of neuroactive amino acids from the inferior colliculus of the guinea pig using brain microdialysis. *Hearing Res.*, 83: 80-88.

Golovko, A.I., Golovko, S.I., Leontieva, L.V. & Zefirov, S.Y. 2002. The influence of ethanol on the functional status of GABA(A) receptors. *Biochemistry (Mosc.)*, 67: 719-729.

Graeff, F.G. 1981. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 14: 239-265.

Graeff, F.G., Brandão, M.L., Audi, E.A. & Milani, H. 1986. Role of GABA in the anti-aversive action of anxiolytics. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 42: 79-86.

Graeff, F.G. 1989. Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. São Paulo, EPU.

Graeff, F.G. 1990. Brain defense systems and anxiety. In: Roth, M.; Burrow, G.D.; Noyes, R. (eds). *Handbook of Anxiety*, vol.3. New York, Elsevier. pp: 307-354.

Graeff, F.G., Silveira, M.C., Nogueira, R.L., Audi, E.A. & Oliveira, R.M. 1993. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav. Brain Res.*, 58: 123-131.

Grant, K., Valverius, P., Hudspith, M. & Tabakoff, B. 1990. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *European J. Psych.*, 176: 289-296.

Gross, M.M., Begleiter, H., Tobin, M. & Kissin, B. 1966. Changes in auditory evoked response induced by alcohol. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 143: 152.

Grover, C.A., Wallace, K.A., Lindberg, S.A. & Frye, G.D. 1998. Ethanol inhibition of NMDA currents in acutely dissociated medial septum/diagonal band neurons from ethanol dependent rats. *Brain Res.*, 782: 43-52.

Haefely, W. 1985. Pharmacology of benzodiazepine antagonists. *Pharmacopsychiatry*, 18: 163-166.

Harris, R.A., Mihic, S.J., Brozowski, S., Hadingham, K. & Whiting, P.J. 1997. Ethanol, flunitrazepam, and pentobarbital modulation of GABAA receptors expressed in mammalian cells and *Xenopus* oocytes. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21: 444-451.

Hauser, W.A., Rich, S.S., Annegers, J.F. & Anderson, V.E. 1990. Seizure recurrence after a 1st unprovoked seizure: an extended follow-up. *Neurology*, 40: 1163-1170.

Herrera, M., Sánchez del Campo, F., Ruiz, A. & Smith Agreda, V. 1988. Neuronal relationships between the dorsal periaqueductal nucleus and the inferior colliculus (nucleus commissuralis) in the cat. A Golgi study. *J. Anat.*, 158: 137-145.

Hilton, S.M. & Redfern, W.S. 1986. A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. *J. Physiol.*, 378: 213-228.

Hu, X. & Ticku, M.K. 1995. Chronic ethanol treatment upregulates the NMDA receptor function and binding in mammalian cortical neurons. *Molecular Brain Res.*, 30: 347-356.

Huffman, R.F. & Henson, O.W. 1990. The descending auditory pathway and acoustic-motor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain Res. Rev.*, 15: 295-323.

Huxley, A. 1956. *As Portas da Percepção e Céu e Inferno*. Editora Globo S.A.

Jane, J.A., Masterton, R.B. & Diamond, I.T. 1965. The function of the tectum for attention to auditory stimuli in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 125: 165-191.

Kawamura, S., Sprague, J.M. & Niimi, K. 1974. Corticofugal projections from the visual cortices to the thalamus, pretectum and superior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 158: 339-362.

Kessler, R.C., Crum, R.M., Warner, L.A., Nelson, C.B., Schulenberg, J. & Anthony, J.C. 1997. Lifetime co-occurrence of DSM-III-R alcohol abuse and dependence with other psychiatric disorders in the National Comorbidity Survey. *Arch. Gen. Psychiatry*, 54: 313-321.

Kiser, R.S. & Lebovitz, R.M. 1975. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiol. Behav.*, 15: 47-53.

Koob, G.F., Stinus, L., Le, M.M. & Bloom, F.E. 1989. Opponent process theory of motivation: neurobiological evidence from studies of opiate dependence. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 13: 134-140.

Koob, G.F. & Le Moal, M. 2001. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24: 97-129.

Koob, G.F. 2003. Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 13: 442-452.

Kudo, M. & Niimi, K. 1980. Ascending projections of the inferior colliculus in the cat: an autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.*, 191: 545-556.

Kumari, M. & Ticku, M.K. 1998. Ethanol and regulation of the NMDA receptor subunits in fetal cortical neurons. *J. Neurochem.*, 70: 1467-1473.

Kushner, M.G., Sher, K.J. & Beitman, B.D. 1990. The relation between alcohol problems and the anxiety disorders. *Am. J. Psychiatry*, 147: 685-695.

Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Vianna, D.M., Castilho, V.M., Cruz-Morales, S.E. & Brandão, M.L. 2002. The distribution of immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res.*, 950: 186-194.

Lang P.J., Bradley, M.M. & Cuthbert, B.N. 1998. Emotion, motivation, and anxiety: brain mechanisms and psychophysiology. *Biol. Psychiatry*, 44: 1248-1263.

Langen, B. & Fink, H. 2004. Anxiety as a predictor of alcohol preference in rats? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 28: 961-968.

Laranjeira, R., Nicastri, S., Jerônimo, C. & Marques, A.C. 2000. Consenso sobre a síndrome de abstinência do álcool (SAA) e o seu tratamento. *Rev. Bras. Psiq.*, 22: 62-71.

Le, A.D., Kiiama, K., Cunningham, C.L., Engel, J.A., Ericson, M., Soderpalm, B., Koob, G.F., Roberts, A.J., Weiss, F., Hyttia, P., Janhunen, S., Mikkola, J., Backstrom, P., Ponomarev, I. & Crabbe, J.C. 2001. Neurobiological processes in alcohol addiction. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 25: 144S-151S.

Leão-Borges, P.C., Coimbra, N.C. & Brandão, M.L. 1988. Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 21: 1027-1031.

LeDoux, J.E., Iwata, J. & Reis, D.J. 1985. Projections to the amygdala from the medial geniculate-body mediate arterial-pressure conditioning in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 72: 244-244.

LeDoux, J.E., Ruggiero, D.A., Forest, R., Stornetta, R. & Reis, D.J. 1987. Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 264: 123-146.

LeDoux, J.E., Cicchetti, P., Xagoraris, A. & Romanski, L. M. 1990. The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J. Neurosci.*, 10: 1062–1069.

Lejoyeux, M., Boulanguiez, S., Fichelle, A., McLoughlin, M., Claudon, M. & Adès, J. 2000. Alcohol dependence among patients admitted to psychiatric emergency services. *Gen. Hosp. Psychiatry*, 22: 206-212.

Li, L., Korngut, L.M., Frost, B.J. & Beninger, R.J. 1998a. Prepulse inhibition following lesions of the inferior colliculus: prepulse intensity functions. *Physiol. Behav.*, 65: 133-139.

Li, L., Priebe, R.P. & Yeomans, J.S. 1998b. Prepulse inhibition of acoustic or trigeminal startle of rats by unilateral electrical stimulation of the inferior colliculus. *Behav. Neurosci.*, 112: 1187-1198.

Liljequist, S. 1991. NMDA receptor antagonists inhibit ethanol-produced locomotor stimulation in NMRI mice. *Alcohol.*, 8: 309-312.

Lingford-Hughes, A. & Nutt, D. 2003. Neurobiology of addiction and implications for treatment. *Br. J. Psychiatry*, 182: 97-100.

Lingford-Hughes, A.R., Davies, S.J., Mclver, S., Williams, T.M., Daglish, M.R. & Nutt, D.J. 2003. *Addiction. Br. Med. Bull.*, 65: 209-222.

Macedo, C.E., Castilho, V.M., DeSouza e Silva, M.A. & Brandão, M.L. 2002. Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdala in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research Bulletin*, 59: 189–195.

Maisonnette, S.S., Kawasaki, M.C., Coimbra, N.C. & Brandão, M.L. 1996. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res. Bull.*, 40: 93–98.

Matsumoto, I., Davidson, M., Otsuki, M. & Wilce, P.A. 1996. Decreased severity of ethanol withdrawal behaviors in kainic acid-treated rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 55: 371-378.

McCown, T.J., Greenwood, R.S., Frye, G.D. & Breese, G.R. 1984. Electrically elicited seizures from the inferior colliculus: a potential site for the genesis of epilepsy? *Exp. Neurol.*, 86: 527-542.

McCown, T.J. & Breese, G.R. 1993. A potential contribution to ethanol withdrawal kindling: reduced GABA function in the inferior collicular cortex. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 17: 1290-1294.

McDonald, R.L. 1995. Ethanol, gamma-aminobutyrate type A receptors and protein kinase C phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3633-3635.

Mehta, A.K. & Ticku, M.K. 1992. Chronic GABA exposure down-regulates GABA-benzodiazepine receptor-ionophore complex in cultured cerebral cortical neurons. *Mol. Brain Res.*, 16: 29-36.

Meininger, V., Pol, D. & Derer, P. 1986. The inferior colliculus of the mouse. A Nissl and Golgi study. *Neuroscience*, 17: 1159-1179.

Melichar, J.K., Daglish, M.R. & Nutt, D.J. 2001. Addiction and withdrawal--current views. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1, 84-90.

Melo, L.L., Cardoso, S.H. & Brandão, M.L. 1992. Antiaversive action of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Physiol. Behav.*, 51: 557-562.

Melo, L.L. & Brandão, M.L. 1995b. Role of 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the aversion induced by electrical stimulation of inferior colliculus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 51: 317-321.

Merikangas, K.R., Mehta, R.L., Molnar, B.E., Walters, E.E., Swendsen, J.D., Aguilar-Gaziola, S., Bijl, R., Borges, G., Caraveo-Anduaga, J.J., DeWit, D.J., Kolody, B., Vega, W.A., Wittchen, H.U. & Kessler, R.C. 1998. Comorbidity of substance use disorders with mood and anxiety disorders: results of the International Consortium in Psychiatric Epidemiology. *Addict. Behav.*, 23: 893-907.

Mhatre, M.C. & Ticku, M.K. 1992. Chronic ethanol administration alters gamma-aminobutyric acid receptor gene expression. *Mol. Pharmacol.*, 42: 415-422.

Mihic, S.J. 1999. Acute effects of ethanol on GABAA and glycine receptor function. *Neurochem. Int.*, 35: 115-123.

Millan, M.H., Meldrum, B.S. & Faingold, C.L. 1986. Induction of audiogenic seizure susceptibility by focal infusion of excitant amino acid or bicuculline into the inferior colliculus of normal rats. *Exp. Neurol.*, 91: 634-639.

Mirshahi, T. & Woodward, J.J. 1995. Ethanol sensitivity of heteromeric NMDA receptors: effects of subunit assembly, glycine and NMDAR1 Mg insensitive mutants. *Neuropharmacology*, 34: 347-355.

Monteiro, M.G., Schuckit, M.A. & Irwin, M. 1990. Subjective feelings of anxiety in young men after ethanol and diazepam infusions. *J. Clin Psychiatry*, 51: 12-16.

Moore, R.Y. & Goldberg, J.M. 1963. Ascending projections of the inferior colliculus in the monkeys. *Experimental Neurology*, 121: 109-136.

Moore, J.K., Karapas, F. & Moore, R.Y. 1977. Projections of the inferior colliculus in insectivores and primates. *Brain Behav. Evol.*, 14: 301-327.

Morest, D.K. & Oliver, D.L. 1984. The neuronal architecture of the inferior colliculus in the cat: defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *J. Comp. Neurol.*, 222: 209-236.

Moriizumi, T. & Hattori, T. 1991. Pallidotectal projection to the inferior colliculus of the rat. *Exp. Brain Res.*, 87: 223-226.

Morrisett, R.A., Rezvani, A.H., Overstreet, D., Janowsky, D.S., Wilson, W.A. & Swartzwelder, H.S. 1990. MK-801 potently inhibits alcohol withdrawal seizures in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 176: 103-105.

Morrisett, R.A. 1994. Potentiation of NMDA receptor-dependent afterdischarges in rat dentate gyrus following in vitro ethanol withdrawal. *Neurosci. Lett.*, 167: 175-178.

Möller, C., Wiklund, L., Sommer, W., Thorsell, A. & Heilig, M. 1997. Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. *Brain Res.*, 760: 94-101.

Najlerahim, A., Harrison, P.J., Barton, A.J.L., Hefferman, J. & Pearson, R.C.A. 1990. Distribution of messenger RNAs encoding the enzymes glutaminase, aspartate, aminotransferase and glutamic acid decarboxylase in rat brain. *Molec. Brain Res.*, 7: 317-333.

Nathan, P.E. 1990. Integration of biological and psychosocial research on alcoholism. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 14: 368-374.

Nestler, E.J. & Aghajanian, G.K. 1997. Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278: 58-63.

Nevo, I. & Hamon, M. 1995. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem. Int.*, 26: 305-336.

Nie, Z., Yuan, X., Madamba, S.G. & Siggins, G.R. 1993. Etanol decreases glutamatergic synaptic transmission in rat nucleus accumbens in vitro: naloxone reversal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266: 1705-1712.

Nieber, K., Poelchen, W., Sieler, D. & Illes, P. 1998. Inhibition by ethanol of excitatory amino acid receptors in rat locus coeruleus neurons in vitro. *Naunyn. Schmiederbergs Arch. Pharmacol.*, 357: 299-308.

Nobre, M.J., Sandner, G. & Brandão, M.L. 2003. Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. *Hear. Res.*, 184: 82-90.

Okada, Y. 1974. Distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the layers of the superior colliculus of the rabbit. *Brain Research.*, 75: 362–366.

Olazábal, U.E. & Moore, J.K. 1989. Nigrotectal projection to the inferior colliculus: horseradish peroxidase transport and tyrosine hydroxylase immunohistochemical studies in rats, cats, and bats. *J. Comp. Neurol.*, 282: 98-118.

Oliver, D.L. & Morest, D.K. 1984. The central nucleus of the inferior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 222: 237-264.

Oliver, D.L., Beckius, G.E. & Shneiderman, A. 1995. Axonal projections from the lateral and medial superior olive to the inferior colliculus of the cat: a study using electron microscopic autoradiography. *J. Comp. Neurol.*, 360: 17-32.

Olsen, R.W. 1982. Drug interactions at the GABA receptor-ionophore complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22: 245-77.

Osen, K. 1973. Organization of cat cochlear nuclei and projection of inferior colliculus. *Arch. Otolaryngol.*, 98: 401-404.

Palombi, P.S. & Caspary, D.M. 1996. GABA inputs control discharge rate primarily within frequency receptive fields of inferior colliculus neurons. *J. Neurophysiol.*, 75: 2211-2219.

Pandóssio, J.E. & Brandão M.L. 1999. Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate receptors in the inferior colliculus of rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, 142: 360-368.

Pandóssio, J.E., Molina, V.A. & Brandão, M.L. 2000. Prior electrical stimulation of the inferior colliculus sensitizes rats to the stress of the elevated plus-maze test. *Behav. Brain Res.*, 109: 19-25.

Paxinos, G. & Watson, C. 2003. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Third edn. New York: Academic Press.

Pearson, B.J., Donatelli, D.P., Freund, R.K. & Palmer, M.R. 1997. Differential development and characterization of rapid acute neuronal tolerance to the depressant effects of ethanol on cerebellar Purkinje neurons of low-alcohol-sensitive and high-alcohol-sensitive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280: 739-746.

Peoples, R.W., White, G., Lovinger, D.M. & Weight, F.F. 1997. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate-activated current in mouse hippocampal neurones: whole-cell patch-clamp analysis. *Br. J. Pharmacol.*, 122: 1035-1042.

Peris, J., Eppler, B., Hu, M., Walker, D.W., Hunter, B.E., Mason, K. & Anderson, K.J. 1997. Effects of chronic ethanol exposure on GABA receptors and GABAB receptor modulation of 3H-GABA release in the hippocampus. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21: 1047-1052.

Pohorecky, L.A. 1981. The interaction of alcohol and stress. A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 5: 209-229.

Pollak, G.D., Burger, R.M. & Klug, A. 2003. Dissecting the circuitry of the auditory system. *Trends Neurosci.*, 26: 33-39.

Popper, A.N. & Fay, R.R. 1997. Evolution of the ear and hearing: issues and questions. *Brain Behav. Evol.*, 50: 213-221.

Ramon Y Cajal, S. 1909. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris.

Regier, D.A., Farmer, M.E., Rae, D.S., Locke, B.Z., Keith, S.J., Judd, L.L. & Goodwin, F.K. 1990. Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA*, 264: 2511-2518.

Riaz, A & Faingold, C.L. 1994. Seizures during ethanol withdrawal are blocked by focal microinjection of excitant amino acid antagonists into the inferior colliculus and pontine reticular formation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 18: 1456-1462.

Ribak, C.E., Byun, M.Y., Ruiz, G.T. & Reiffenstein, R.J. 1988. Increased levels of amino acid neurotransmitters in the inferior colliculus of the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsy Res.*, 2: 9-13.

Rossetti, Z.L. & Carboni, S. 1995. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.*, 283: 177-183.

Roth, G.L., Aitkin, L.M., Andersen, R.A. & Merzenich, M.M. 1978. Some features of the spatial organization of the central nucleus of the inferior colliculus of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 182: 661-680.

Sandner, G., Dessort, D., Schmitt, P. & Karli, P. 1981. Distribution of GABA in the periaqueductal gray matter. Effects of medial hypothalamic lesions. *Brain Res.*, 224: 279-290.

Sandner, G., Canal, N.M. & Brandão, M.L. 2002. Effects of ketamine and apomorphine on inferior colliculus and caudal pontine reticular nucleus evoked potentials during prepulse inhibition of the startle reflex in rats. *Behav. Brain Res.*, 128: 161-168.

Sanna, E., Serra, M., Cossu, A., Colombo, G., Follesa, P., Cuccheddu, T., Concas, A. & Biggio, G. 1993. Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA_A and NMDA receptor function in the rat brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 17: 115-123.

Santos, N.R., Husto, J.P. & Brandão, M.L. 2002. Further evidence for the involvement of histamine H2 receptors in the control of defensive behaviour generated in the midbrain tectum. *Behav. Pharmacol.*, 13: 73-80.

Schenberg, L.C. & Graeff, F.G. 1978. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 9: 287-295.

Schuckit, M.A. & Hesselbrock, V. 1994. Alcohol dependence and anxiety disorders: what is the relationship? *Am. J. Psychiatry*, 151: 1723-1734.

Schultheis, G., Heyser, C.J. & Koob, G.F. 1997. Opiate withdrawal signs precipitated by naloxone following a single exposure to morphine: potentiation with a second morphine exposure. *Psychopharmacology (Berl.)*, 129, 56-65.

Shiraishi, S., Shiraishi, Y., Oliver, D.L. & Altschuler, R.A. 2001. Expression of GABA(A) receptor subunits in the rat central nucleus of the inferior colliculus. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 96: 122-132.

Sieghart, W. 1986. Comparison of benzodiazepine receptors in cerebellum and inferior colliculus. *J. Neurochem.*, 47: 920-923.

Silveira, M.C., Sandner, G. & Graeff, F.G. 1993. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*, 56: 115-118.

Smothers, C.T., Mrotek, J.J. & Lovinger, D.M. 1997. Chronic ethanol exposure leads to a selective enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor function in cultured hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283: 1214-1222.

Spanagel, R., Montkowski, A., Allingham, K., Stohr, T., Shoaib, M., Holsboer, F. & Landgraf, R. 1995. Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, 122, 369-373.

Spuhler-Phillips, K., Gonzalez, J., Randall, P.K. & Leslie, S.W. 1995. Alteration of [H]MK-801 binding associated with the NMDA receptor complex by acute ethanol in rat cortex and hippocampus in vitro. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 19: 305-313.

Squires, K.C., Chu, N.S. & Starr, A. 1978. Acute effects of alcohol on auditory brainstem potentials in humans. *Science*, 201: 174-176.

Szczepaniak, W.S. & Moller, A.R. 1995. Evidence of decreased GABAergic influence on temporal integration in the inferior colliculus following acute noise exposure: a study of evoked potentials in the rat. *Neurosci. Lett.*, 196: 77-80.

Tachibana, M. & Kuriyama, K. 1974. Gamma-aminobutyric acid in the lower auditory pathway of the guinea pig. *Brain Res.*, 69: 370-374.

Tatebayashi, H., Motomura, H. & Narahashi, T. 1998. Alcohol modulation of single GABA(A) receptor-channel kinetics. *Neuroreport.*, 9: 1769-1775.

Terra, V.C. & Garcia-Cairasco, N. 1992. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. II. Effects of nigral clobazam microinjections. *Behav. Brain Res.*, 52: 19-28.

Thompson, G.C., Cortez, A.M. & Lam, D.M. 1985. Localization of GABA immunoreactivity in the auditory brainstem of guinea pigs. *Brain Res.*, 339: 119–22.

Tokunaga, A., Sugita, S. & Otani, K. 1984. Auditory and non-auditory subcortical afferents to the inferior colliculus in the rat. *J. Hirnforsch.*, 25: 461-472.

Troncoso, A.C., Cirilo-Junior, G., Sandner, G. & Brandão, M.L. 1998. Signaled two-way avoidance learning using electrical stimulation of the inferior colliculus as negative reinforcement: effects of visual and auditory cues as warning stimuli. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31: 391-398.

Tsai, G.E., Ragan, P., Chang, R., Chen, S., Linnoila, V.M. & Coyle, J.T. 1998. Increased glutamatergic neurotransmission and oxidative stress after alcohol withdrawal. *Am. J. Psychiatry*, 155: 726-732.

Tsutsui, J., Terra, V.C., Oliveira, J.A. & Garcia-Cairasco, N. 1992. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus: effects of midcollicular knife cuts. *Behav. Brain Res.*, 52: 7-17.

Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A. & Spanagel, R. 2008. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br. J. Pharmacol.*, 154, 299-315.

Walker, E.A., Zernig, G. & Woods, J.H. 1995. Buprenorphine antagonism of mu opioids in the rhesus monkey tail-withdrawal procedure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273: 1345-1352.

Webster, W.R. 1995. Auditory System. In: Paxinos, R. *Rat Nervous System*. Academic Press, New York, pp. 797-832.

Weiner, J.L., Gu, C. & Dunwiddie, T.V. 1997. Differential ethanol sensitivity of subpopulations of GABAA synapses onto rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, 77: 1306-1312.

Wirkner, K., Poelchen, W., Köles, L., Mühlberg, K., Scheibler, P., Allgaier, C. & Illes, P. 1999. Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels. *Neurochem. Int.*, 35: 153-162.

Woods, J.H. & Winger, G. 1995. Current benzodiazepine issues. *Psychopharmacology (Berl.)*, 118: 107-115.

Woodward, J.J. 1999. Overview of the effects of alcohol on the cerebral nervous system. *Neurochem. Int.*, 35: 93-94.

Woolard, H.H. & Harpman, J.A. 1940. The Connections of the inferior colliculus and the dorsal nucleus of lateral lemniscus. *Journal of Anatomy*, 74: 458.

World Health Organization: International Statistical Classification of Diseases and Related Problems, 10th ed. 1992. Geneva, World Health Organization.

Yardley, C.P. & Hilton, S.M. 1986. The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 15: 227-244.

Zaleski, M., Morato, G.S., Silva, V.A. & Lemos, T. Neuropharmacological aspects of chronic alcohol use and withdrawal syndrome. *Revista Brasileira Psiquiatria*, 26: 40-42, 2004.

Zeldin, T. 1994. Uma História Íntima da Humanidade. *Editora Record*.