



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



VÍVIAN TACIANY BONASSOLI

**Avaliação da ativação de neurônios nitrérgicos no
sistema nervoso central de ratos submetidos à
abstinência ao etanol**

MARINGÁ

2010

VIVIAN TACIANY BONASSOLI

**Avaliação da ativação de neurônios nitrérgicos no
sistema nervoso central de ratos submetidos à
abstinência ao etanol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rúbia Maria
Monteiro Weffort de Oliveira

MARINGÁ

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B699a Bonassoli, Vívian Taciany
Avaliação da ativação de neurônios nitrérgicos no sistema nervoso central de ratos submetidos à abstinência ao etanol / Vivian Taciany Bonassoli. -- Maringá, 2010.
70 f. : figs. col., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2010.

1. Síndrome de abstinência - Etanol. 2. Etanol - Consumo crônico - Abstinência. 3. Ansiedade - Abstinência ao etanol. 4. Óxido nítrico - Abstinência ao etanol. 5. Neurônios nitrérgicos - Ativação. 6. Proteína Fos - Imunohistoquímica. I. Oliveira, Rúbia Maria Monteiro Weffort de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 21.ed.615.7828

VIVIAN TACIANY BONASSOLI

Avaliação da ativação de neurônios nitrérgicos no sistema nervoso central de ratos submetidos à abstinência ao etanol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, e aprovada pela Banca Examinadora de defesa de dissertação em 22 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Silvana Regina de Melo
Departamento de Ciências Morfológicas – UEM

Prof^º. Dr. Nilton de Almeida Brito
Departamento de Ciências Fisiológicas – UEM

Prof^ª. Dr^ª. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira
Orientadora
Departamento de Farmácia e Farmacologia – UEM

Dedico este trabalho

À minha mãe e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por iluminar meu caminho, colocando nele as pessoas certas e por me guiar com todas as ferramentas necessárias ao meu desenvolvimento acadêmico e científico.

A meus pais Fátima Helena Celloti Bonassoli e Edison Bonassoli, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que se doaram inteiros e, muitas vezes, renunciaram aos seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

A meu irmão Edson Thiago Bonassoli, por sua constante amizade e companheirismo, auxiliando, sempre que podia na realização deste sonho.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Marcelo Boveto Shima, que sempre me auxilia e me conforta com sua paciência, sabedoria e afeto, me apoiando em todas as minhas decisões.

À professora Dra. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira, por ter confiado em mim, por seus valiosos ensinamentos científicos e paciência ao compartilhar comigo um pouco do seu conhecimento, por toda sua atenção e esforço, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Humberto Milani, pelos ensinamentos que me auxiliaram durante a realização deste trabalho.

À minha amiga Andressa Blainski, por seu incentivo desde a entrada no mestrado, por sua amizade sincera e presença em minha vida.

A todos os amigos pós-graduandos e graduandos do laboratório: Angélica, Cássia, Marco Aurélio, Francine, Rogério, Camila, Emilene, Janaíne, Lourielthon, Beatriz e Guilherme, pelos bons momentos que passamos juntos e pelo ótimo convívio durante este tempo.

Ao técnico Marcos Alberto Trombelli e a auxiliar Solidalva Caruso Fernandes de Oliveira, pelo apoio técnico e pela amizade.

Às secretárias Francisca Helena Mesquita de Carvalho e Érika Gobi dos Santos, por toda atenção disponibilizada, dedicação e trabalho exemplar.

Aos Professores Dr. Nilton de Almeida Brito e Dra. Silvana Regina de Melo, que aceitaram, gentilmente, compor a banca de defesa desta dissertação.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

RESUMO

O consumo crônico de etanol pode levar a dependência, e a descontinuação de seu uso está relacionada ao aparecimento da síndrome de abstinência. Embora a síndrome de abstinência ao etanol em humanos e em ratos seja bem descrita, os mecanismos neurobiológicos moleculares envolvidos ainda são pouco compreendidos. Muitos trabalhos têm sugerido a participação do óxido nítrico do desenvolvimento desta síndrome. O objetivo deste estudo foi observar o comportamento de ratos durante a abstinência ao etanol de 24 e 48h, bem como avaliar a ativação neuronal em diferentes regiões do SNC, utilizando a imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos. Além disso, também foi avaliada a ativação de neurônios nitrérgicos combinando a marcação para proteína Fos com a histoquímica para NADPH-diaforase. Ratos Wistar machos foram divididos em três grupos (n=11/grupo): o primeiro recebeu uma dieta nutricionalmente balanceada, composta por Sustagen M® acrescida de 8% de etanol, como única fonte de alimento por um período de 21 dias, seguida de descontinuação abrupta do etanol após 24h; o segundo grupo recebeu o mesmo tratamento seguido de descontinuação abrupta após 48h e o terceiro grupo foi o controle e recebeu a mesma base dietética sem etanol, mas adicionada de sacarose para o balanço energético. Os animais dos diferentes grupos experimentais foram submetidos ao teste do campo aberto por 10 min. Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados e seus cérebros removidos e processados para a detecção da proteína Fos e histoquímica para NADPH-diaforase. Uma diminuição significativa da atividade exploratória foi observada nos animais submetidos à abstinência de 24h, caracterizada por uma menor distância percorrida no campo aberto. Um aumento na expressão de Fos foi detectado em estruturas como córtex cingulado (CG), córtex piriforme (CP), núcleo paraventricular do tálamo (PVA), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), hipotálamo lateral (LH), amígdala medial (AmMe), substância nigra (SN), substância cinzenta periaquedutal dorsomedial (DMPAG), dorsolateral (DLPAG) e ventrolateral (VLPAG), após 24 ou 48h de abstinência. Hipotálamo dorsomedial (DMD) e hipotálamo anterior (AHA) foram ativados após 24h de abstinência, enquanto o NDR após 48h de abstinência de etanol. Neurônios nitrérgicos foram ativados na DLPAG, PVH e parte dorsal do NDR

após abstinência de 24h. No tempo de 48h foi observado aumento significativo da ativação de neurônios nitrérgicos apenas na DLPAG, quando comparado ao grupo controle. A ativação de neurônios nitrérgicos na DLPAG, PVH e parte dorsal do NDR sugere o envolvimento da neurotransmissão nitrérgica e reforça a participação destas estruturas na síndrome de abstinência ao etanol.

Palavras-chave: Abstinência. Etanol. Óxido nítrico. Ansiedade. Fos.

ABSTRACT

Ethanol chronic consumption can lead to dependence, and its discontinuation has been related to the onset of withdrawal syndrome. Although the ethanol withdrawal syndrome in humans and rats is well described, the neurobiological molecular mechanisms underlining it is still poorly understood. Many studies have suggested the involvement of nitric oxide in the development of this syndrome. The objective of this study was to observe the rats behavior during ethanol withdrawal for 24 and 48 h, as well to evaluate the neuronal activation in different regions of the CNS, using immunohistochemistry to detect Fos protein. In addition, we also evaluated nitrenergic neurons activation combining Fos immunohistochemistry and NADPH-diaphorase. Male Wistar rats were divided into three groups (n = 11/grup): the first one received a balanced nutritionally diet, consisting of Sustagen M® added ethanol 8%, as the only source of food for a period of 21 days followed by abrupt ethanol discontinuation after 24h, the second group received the same treatment followed by abrupt discontinuation after 48h and the third group was the control and received the same basic diet without ethanol, but added sucrose to energetic balance. The animals were tested in the open field apparatus for ten minutes. After the behavioral tests, animals were sacrificed and their brains removed and processed to Fos protein detection and histochemistry to NADPH-diaphorase. Decreased exploratory activity was observed in animals subjected to 24h withdrawal, characterized by shorter moved distance in the open field. Increased Fos expression was detected in brain areas such as cingulated cortex (CG), piriform cortex (CP), paraventricular thalamus nucleus (PVA), paraventricular hypothalamus nucleus (PVH), lateral hypothalamus (LH), medial amigdala (AmMe), substantia nigra (SN), dorsomedial periaqueductal grey (DLPAG), dorsolateral (DLPAG) and ventrolateral (VLPAG) after 24 or 48h withdrawal. Dorsomedial hypothalamus (DMD) and anterior hypothalamus (AHA) were activated after 24h and dorsal raphe nucleus (NDR) after 48h ethanol withdrawal. Nitrenergic neurons were activated in PVH, DLPAG and the dorsal part NDR after 24h ethanol withdrawal. 48h withdrawal led nitrenergic neurons activation only in DLPAG. Nitrenergic neurons activation in DLPAG, PVH e dorsal part NDR suggests the nitrenergic neurotransmission involvement and support the participation of such areas in ethanol withdrawal syndrome. Keywords: Withdrawal. Ethanol. Nitric oxide. Anxiety. Fos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via dopaminérgica mesolímbica.....	18
Figura 2	Biossíntese de NO.....	20
Figura 3	Neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica.....	23
Figura 4	Fotografia representativa do campo aberto.....	34
Figura 5	Perfusão transcárdica.....	35
Figura 6	Diagramas representativos das estruturas quantificadas.....	39
Figura 7	Diagramas representativos das estruturas quantificadas.....	40
Figura 8	Efeito da abstinência de etanol sobre a atividade locomotora dos animais no campo aberto.....	42
Figura 9	Consumo de etanol durante o tratamento.....	42
Figura 10	Efeito da abstinência de etanol sobre o peso dos animais.....	43
Figura 11	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR no CG e CP.....	46
Figura 12	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR no VDB e AHA.....	47
Figura 13	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR no PVA e PVH.....	48
Figura 14	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR no LH e DMD.....	49
Figura 15	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR no VMH e AmMe.....	50
Figura 16	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR na SN e MGv.....	51
Figura 17	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR na DMPAG e DLPAG.....	52
Figura 18	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR na VLPAG e NDR.....	53
Figura 19	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR em neurônios NADPH-d positivos no VDB e PVH.....	56
Figura 20	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR em neurônios NADPH-d positivos no LH e DLPAG.....	57

Figura 21	Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR em neurônios NADPH-d positivos no NDRd e NDRv.....	58
-----------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre as diferentes isoformas da enzima NOS.....	21
Tabela 2	Estudos que sugerem a participação do NO na síndrome de abstinência de substâncias de abuso.....	26
Tabela 3	Resultados da quantificação da expressão de Fos-IR em cérebros de ratos submetidos à abstinência de etanol.....	45
Tabela 4	Expressão de Fos-IR em neurônios NADPH-d positivos em cérebros de ratos submetidos à abstinência de etanol.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

7-NI	7-Nitroindazol
ABC	Avidina biotina peroxidase
AHA	Hipotálamo anterio
AmMe	Amídala medial
Ca/M	Cálcio/Calmodulina
CG	Córtex cingulado
CP	Córtex piriforme
DMD	Hipotálamo dorsomedial
DMPAG	Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial
DLPAG	Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais - Quarta Edição
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
Fos-IR	imunorreatividade à proteína Fos
IGEs	<i>Immediate early genes</i>
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LCE	Labirinto em cruz elevado
LH	Hipotálamo lateral
L-NAME	N(g)-nitroarginina metil éster
MGV	Núcleo medial geniculado ventral
NADPH-d	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – diaforase
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NDRd	Núcleo dorsal da rafe parte dorsal
NDRv	Núcleo dorsal da rafe parte ventral
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PVA	Núcleo paraventricular do tálamo
PVH	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SN	Substância negra

SNC	Sistema nervoso central
VDB	Banda diagonal ventral límbica
VLPAG	Substância cinzenta periaquedutal ventrolateral
VMH	Hipotálamo ventromedial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ASPECTOS GERAIS	15
1.2	ÓXIDO NÍTRICO	19
1.2.1	A síntese do óxido nítrico	20
1.2.2	NO no SNC	22
1.2.3	NO e dependência de substâncias de abuso	23
1.2.4	NO e etanol	24
1.3	<i>c-fos</i>	27
1.4	NADPH-DIAFORASE	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3	MATERIAIS E MÉTODO	32
3.1	ANIMAIS	32
3.2	ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL	32
3.3	ANÁLISE COMPORTAMENTAL	33
3.4	PERFUSÃO	34
3.5	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PROTEÍNA FOS	35
3.6	HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE	36
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA	36
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4	RESULTADOS	42
4.1	ANÁLISE COM CONSUMO DE ETANOL	42
4.2	ANÁLISE DO PESO DOS ANIMAIS	42
4.3	ANÁLISE COMPORTAMENTAL	43
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA	44
4.4.1	Quantificação da expressão de Fos-IR	44
4.4.2	Expressão de Fos-IR em neurônios NADPH-d positivos	54
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

O consumo de bebidas contendo álcool etílico (etanol) advém desde o início da História, com os primeiros registros datados, aproximadamente, há 6.000 anos no Egito antigo e na Babilônia (BERMOND II; TOSE, 2000). Segundo os egípcios, o deus Osíris teria ensinado os homens a cultivar uvas e cevada para a fabricação de bebidas capazes de “inspirar a alma” (FERNANDES; FERNANDES, 2002).

Desde o início de seu consumo, os efeitos do álcool sobre o indivíduo e a sua capacidade de alterar o comportamento já eram conhecidos por todas as diferentes populações que o utilizavam. Hoje, ainda que aceito socialmente, o consumo de álcool sofre restrições que tentam controlar ou prevenir o seu uso indevido. No Brasil, calcula-se que, aproximadamente, uma em cada dez pessoas tenha problemas com o uso indevido do álcool, o que representa um custo substancial para o Estado, além de prejuízos para o próprio indivíduo e a sociedade (BERMOND II; TOSE, 2000).

Os efeitos do álcool dependem de uma série de fatores, como quantidade consumida num determinado período de tempo, tipo de bebida, sexo, idade, peso, condições físicas e psíquicas, quantidade e tipo de alimentos no estômago, combinação com outras substâncias e desenvolvimento de tolerância (VIEIRA, 2009). O consumo excessivo e prolongado de bebidas alcoólicas leva ao estado de dependência conhecida como alcoolismo ou etilismo, caracterizado pelo uso continuado do álcool apesar dos problemas psicológicos, interpessoais e físicos relacionados (LEITE, 2009).

A dependência de substâncias se caracteriza como um estado fisiológico de neuroapadatação produzido pela administração repetida, exigindo administração contínua da droga para evitar a ocorrência de síndrome de abstinência (STAHL, 2006). Segundo a *American Psychiatry Association* (2002), conforme Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais - Quarta Edição (DSM-IV), o indivíduo

que apresentar três ou mais dos sete sintomas apresentados no quadro 1, em um período de 12 meses, pode ser diagnosticado como dependente.

1.	<i>Tolerância definida pela necessidade de doses cada vez maiores para se obter os efeitos observados com a dose usada originalmente.</i>
2.	<i>Síndrome de abstinência característica da substância após descontinuação do uso, ou consumo da mesma substância (ou outra bastante parecida) para aliviar ou evitar sintomas de abstinência.</i>
3.	<i>Consumo da substância freqüentemente em grandes quantidades, ou por período maior do que o intencionado.</i>
4.	<i>Um desejo persistente ou esforço sem sucesso de diminuir ou controlar o uso da substância.</i>
5.	<i>Grandes períodos de tempo utilizados em atividades necessárias para obter a substância, usá-la ou recuperar-se de seus efeitos.</i>
6.	<i>Redução ou abandono atividades sociais, recreacionais ou ocupacionais por causa do uso da substância.</i>
7.	<i>Uso continuado da substância, apesar do conhecimento de ter um problema físico ou psicológico ou recorrente que tenha sido causado ou exacerbado pela substância.</i>

Quadro 1: Critérios do DSM-IV (2000) para Dependência de Substância de abuso.

Sendo o etanol uma droga capaz de causar dependência, a descontinuação de seu uso crônico está associada à síndrome de abstinência, decorrente de alterações neurobiológicas nos mesmos sistemas neurotransmissores envolvidos na dependência (KOOB; LE MOAL, 1997; UZBAY et al., 1997). A síndrome de abstinência alcoólica é caracterizada pelo anseio pela substância ou “*fissura*”, além de sintomas como ansiedade, tremor, irritabilidade, náuseas, taquicardia, distorções da percepção, agitação, alucinações, convulsões e *delirium tremens*, sintomas estes que podem ser um grande obstáculo no tratamento clínico do alcoolismo, estando associados à recaída de etilistas abstêmios (POHORECH; BRICK, 1990; WEISS et al., 1996).

O etanol potencializa a neurotransmissão inibitória do ácido gama-amino butírico (GABA) mediada por receptores do tipo GABA_A, acoplados à canais de cloro (Cl⁻), aumentando a condutância de Cl⁻, o que provoca inibição pós-sináptica por meio da diminuição transitória do potencial de membrana. O efeito do álcool sobre a neurotransmissão excitatória ocorre pela inibição de receptores de glutamato (GLU) do tipo N-metil-*D*-aspartato (NMDA), e cainato, bem como dos canais de Ca²⁺ voltagem dependentes. A ativação de receptores GABA_A e inibição de receptores de GLU resulta em sintomas como sedação e diminuição do tônus muscular observados na intoxicação alcoólica (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997).

É esperado que os efeitos do álcool reduzam a excitabilidade neuronal no consumo agudo, entretanto, o consumo crônico de álcool aumenta a densidade de receptores NMDA e canais de Ca²⁺, além de diminuir a função dos receptores GABA_A. Assim, essas mudanças levam ao aumento da excitabilidade quando a administração da substância é interrompida, ocorrendo a síndrome de abstinência, que contribui para a dependência (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997).

Estudos têm mostrado que tanto o efeito sobre a neurotransmissão gabaérgica quanto sobre a glutamatérgica não são uniformes em todas as regiões do cérebro. Sabe-se que o etanol aumenta a neurotransmissão inibitória de GABA, principalmente no córtex cerebral e certos neurônios hipotalâmicos (FAINGOLD et al., 1998); e diminui a neurotransmissão de GLU em neurônios corticais, células granulares e em neurônios mesencefálicos (BHAVE; HOFFMAN, 1997).

Em doses baixas, o álcool provoca desinibição, euforia, bem-estar e sensação de relaxamento. Esses efeitos sugerem que o etanol possa interagir com múltiplos sistemas de neurotransmissores, contribuindo para o reforço positivo para seu consumo (KOOB; LE MOAL, 1997). O reforço é teoricamente mediado pelo aumento que as mudanças nos sistemas GABA e GLU exercem aumentando a liberação de dopamina (DA) na via mesolímbica, que se projeta da área tegmentar ventral para o núcleo acumbens entre outras estruturas (Figura 1). A liberação de dopamina nesta via tem sido relacionada à sensação de prazer obtida com o consumo de etanol e outras drogas de abuso (KOOB; NESTLER, 1997; STAHL, 2006).

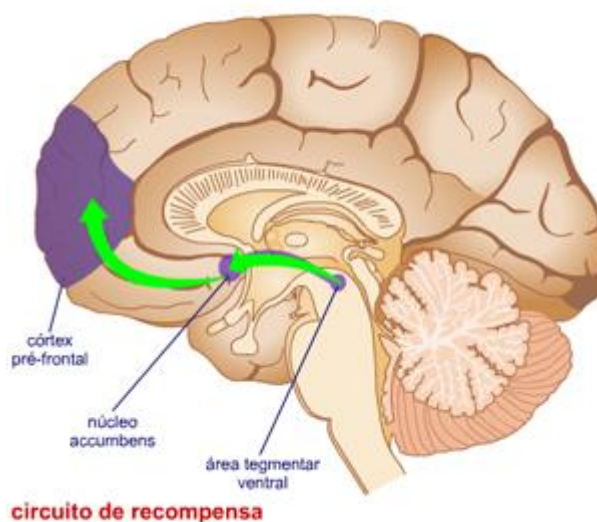


Figura 1: Via dopaminérgica mesolímbica (SILVA; GARBE, 2009)

Estudos demonstram que a serotonina (5-HT) exerce ação moduladora da atividade de neurônios dopaminérgicos que fazem sinapse com o núcleo accumbens. Sabe-se que o consumo repetido de álcool causa mudanças no metabolismo da 5-HT interpretadas como estimulação da atividade serotoninérgica. Neste sentido, outros trabalhos ainda demonstram que a inibição da recaptação da 5-HT pela fluoxetina leva a uma diminuição no consumo voluntário de etanol, enquanto que a destruição de neurônios 5-HT pela 5-7-diidroxitriptamina aumenta o consumo de álcool, reforçando a hipótese do envolvimento da 5-HT no efeito motivacional de consumo de álcool (DIANA et al., 1993; NEVO; HAMON, 1995; WEISS et al., 1996; STAHL, 2006).

O reforço positivo obtido com o uso do álcool também parece envolver a liberação de opióides. O álcool induz a formação de opióides como a tetraidro-papaverina, um intermediário da biossíntese da morfina, a partir da dopamina (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997). O bloqueio de receptores opióides com naltrexona em humanos dependentes faz com que o opióide liberado não resulte em prazer, e assim diminui a “fissura” pelo álcool (STAHL, 2006).

A norepinefrina (NE) também parece estar envolvida na dependência e abstinência alcoólica. O consumo agudo de álcool leva a um aumento na síntese de NE e conversão à epinefrina, sendo este efeito induzido diretamente pelo álcool, ou mediado pelo efeito estressor geral causado pelo consumo desta substância. O

consumo crônico leva à hipoatividade de NE devido à neuroadaptação de receptores β -adrenérgicos, e parece estar relacionada ao desejo pelo álcool. Durante a abstinência se observa a hiperatividade destes receptores acompanhada de manifestações características da atividade simpática, como tremores e taquicardia (NUTT et al., 1988, FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997).

As alterações neurobiológicas ocorridas durante a abstinência de álcool incluem ações contrárias às observadas com o consumo crônico (dependência), como diminuição de atividade gabaérgica, o aumento de atividade glutamatérgica, e hiperatividade de receptores adrenérgicos, relacionadas aos sintomas excitatórios. Além disso, uma diminuição de DA e 5HT no núcleo acumbens também foi observada, o que possivelmente está relacionado a sintomas como disforia e aumento da ansiedade, observados durante a abstinência (WEISS et al., 1996; KOOB; LE MOAL, 1997; TSAI et al., 1998).

Além da participação de neurotransmissores clássicos, o Óxido Nítrico (NO), um neurotransmissor atípico, também parece estar envolvido no processo de abstinência ao etanol e a outras drogas capazes de causar dependência. Estudos experimentais utilizando precursores, doadores e/ou inibidores de sua enzima de síntese têm reforçado esta hipótese (ADAMS; CÍCERO, 1997; UZBAY et al., 1997; UZBAY; OGLESBY, 2001; UZABY; ERDEN, 2003; TODA et al., 2009).

1.2 ÓXIDO NÍTRICO

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. No SNC é considerado um neurotransmissor atípico, desempenhando funções tanto fisiológicas quanto tóxicas (OVTSCHAROFF et al., 2002). Essa molécula é encontrada na forma gasosa a temperatura ambiente, e possui um elétron desemparelhado, facilitando sua reação com o oxigênio molecular (O_2), radical superóxido, ou metais de transição (CERQUEIRA; YOSHIDA; 2002). Por ser pouco solúvel em água e muito solúvel em solventes polares, esta molécula tende a dissolver-se nas membranas e fases lipídicas das células e se encontra dissolvida em solução na maioria dos sistemas biológicos (LUNDBERG et al., 1995).

O NO está envolvido em muitos processos fisiológicos no homem, sendo sintetizado pelas células endoteliais, macrófagos e certos grupos neuronais. É um composto extremamente lábil, apresentando meia vida de 6 ± 10 segundos antes de ser convertido a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) pela ação do oxigênio e da água (SNYDER; BREDT, 1992).

No sistema nervoso periférico, o NO regula a motilidade gastrointestinal, o fluxo sangüíneo regional e funções neuroendócrinas, enquanto no SNC, ele controla atividade comportamental, influencia a formação da memória e intensifica respostas a estímulos de dor (INEC, 2009).

1.2.1 A Síntese do NO

A síntese de NO consiste em duas etapas: na primeira, seu precursor, L-arginina sofre oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino, sendo convertido em Ng-hidróxido-arginina, em uma reação catalisada pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS); em seguida, a hidróxi-arginina é convertida em NO e citrulina com a participação da Cálcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) e oxigênio. A nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfatase (NADPH) atua como doador de elétrons nesta reação (MAYER et al., 1991, UZABAY et al., 2001)(Figura 2).

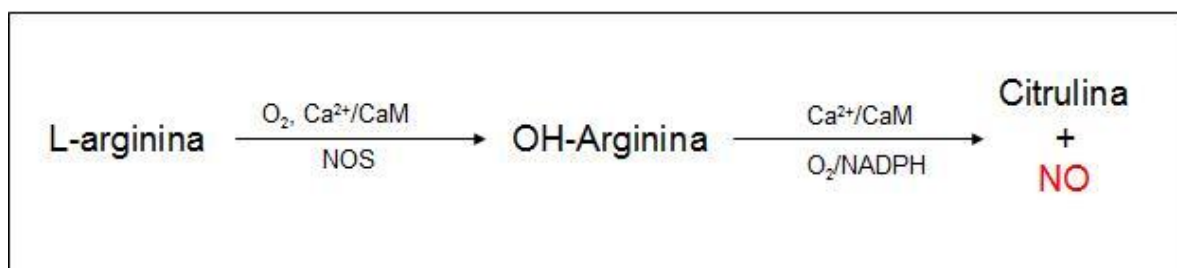


Figura 2 Biossíntese de NO (Ca/CaM= cálcio/calmodulina; NADPH= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NOS= óxido nítrico sintase; NO= óxido nítrico). Modificado de Uzbay; Oglesby, 2001.

A enzima NOS apresenta três isoformas conhecidas, sendo duas constitutivas e uma induzida por estímulo imunológico. A primeira NOS constitutiva foi descoberta no endotélio vascular, sendo chamada de NOS endotelial (eNOS), ao

passo que a isoforma encontrada no SNC e no sistema nervoso periférico passou a ser chamada de NOS neuronal (nNOS). A forma induzida por estímulo imunológico ou inflamatório é conhecida como NOS induzida (iNOS) (BREDT, 1991; QUEIROZ; BATISTA, 1999).

A atividade das NOSs constitutivas está estreitamente relacionada ao cofator $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Na presença de altas concentrações de Ca^{2+} , a CaM se liga às NOSs constitutivas ativando-as. Por outro lado, a atividade da iNOS não depende de Ca^{2+} nem de CaM, sendo induzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO; 2003). Além da diferença na ativação, a iNOS também difere das NOSs constitutivas por produzir quantidades muito maiores de NO (QUEIROZ; BATISTA, 1999) (Tabela 1).

Tabela 1: Comparações entre as diferentes isoformas da enzima NOS (QUEIROZ; BATISTA, 1999).

	<i>eNOS</i>	<i>nNOS</i>	<i>iNOS</i>
Controle Primário	$\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulina}$	$\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulina}$	Expressão Gênica
Localização na célula	Membrana ≥ citossol	Citossol	Citossol ≥ membrana
Liberação de NO	Baixa (pmolar)	Baixa (pmolar)	Alta (mmolar)

O NO resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do NO consiste na sua reação com metais, especialmente o ferro, presentes nas enzimas do seu alvo (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

O NO produzido no endotélio vascular difunde-se rapidamente até a musculatura lisa adjacente, ativando a guanilato ciclase e levando ao aumento de produção de guanidina monofosfato cíclico (GMPc) (RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1983)

A formação do GMPc promove a ativação da bomba de Ca^{2+} dentro da célula muscular lisa, diminuindo as concentrações de Ca^{2+} intracelular que promoverá a redução do tônus vascular (MOLLACE, et al., 1991). O relaxamento do músculo liso

da parede do vaso, faz com que ele dilate, aumentando, assim, o fluxo sanguíneo e diminuindo a pressão arterial. Ao se difundir até ao espaço intravascular o NO é inativado através da combinação com a hemoglobina, originando a metemoglobina, que por sua vez no indivíduo normal é reduzida pela redutase da metemoglobina (MONCADA et al., 1998; FILHO; ZILBERSTEIN, 2000, DUSSE; VIEIRA; CARVALHO; 2003).

Sabe-se que as três isoformas de NOS podem existir concomitantemente em um mesmo tecido. Por exemplo, a nNOS constitui a isoforma mais amplamente expressa no SNC, porém o fluxo sanguíneo cerebral parece ser criticamente regulado pela eNOS presente nos vasos (RADI et al., 1991), enquanto que a iNOS pode ser induzida em astrócitos e micróglia após processos infecciosos (KOPROWSKI et al., 1993).

1.2.2 NO no SNC

O NO é um poderoso vasodilatador cerebral mantendo o fluxo sanguíneo cerebral basal e levando a aumento desse fluxo sob atividade neuronal intensa. No SNC, é considerado um neurotransmissor atípico, uma vez que se difunde para fora de um neurônio e para dentro de outro, e um candidato a receptor tem sido identificado, o Ferro no sítio ativo da guanilato ciclase. Por outro lado, o NO difere dos demais neurotransmissores pois não é armazenado em vesículas, não é liberado por exocitose e não age sobre receptores protéicos nas membranas neuronais (UZBAY; OGLESBY, 2001).

A ação do NO ocorre em nível de sinapse neuronal, dessa forma após estímulo do neurônio pré-sináptico, ocorre liberação de glutamato que vai se ligar aos receptores NMDA pós-sinápticos. Enquanto persistir esta união (glutamato/receptor NMDA), o Ca^{2+} será capaz de entrar no citoplasma do neurônio pós-sináptico se ligando à CaM, o que gera a ativação da nNOS e a produção de NO. Assim, o NO é liberado na fenda sináptica após estímulo pré-sináptico, funcionando como mensageiro retrógrado, onde estimula a produção de GMPc, que poderá promover a fosforilação de proteínas, abertura de canais iônicos e/ou liberação de outros neurotransmissores (Figura 3).

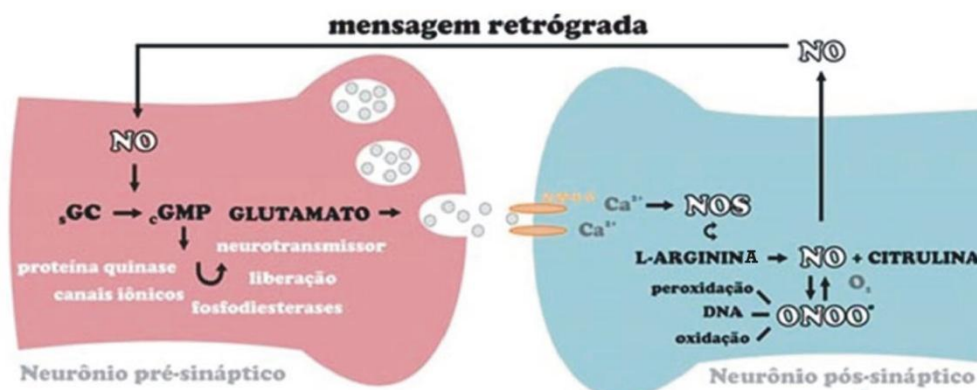


Figura 3: Neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica. Fonte: INEC, 2009.

1.2.3 NO e dependência de substâncias de abuso

Substâncias de abuso como anfetaminas, cocaína e outros psicoestimulantes são utilizadas por sua capacidade de causar estimulação psicomotora e euforia. Vários trabalhos têm mostrado que a administração de inibidores de NOS N(G)-nitroarginina metil éster (L-NAME) e 7-Nitraindazol (7NI) por si só afetam a atividade locomotora de camundongos e ratos (ÇELIK; ZAGLY; UZBAY, 1999). Estes inibidores, quando administrados durante o tratamento com psicoestimulantes, parecem reduzir a atividade locomotora provocada pelos últimos. Por outro lado, a administração de doadores de NO parece potencializar essa atividade (PRZEGALINSKI; FILIP, 1997; ÇELIK; ZAGLY; UZBAY; OGLESBY, 2001).

Além da participação na atividade locomotora, o NO também parece estar envolvido na síndrome de abstinência provocada pela interrupção do uso de psicoestimulantes. Em 2000, Loftis e Janowsky demonstraram uma supra-regulação momentânea da nNOS em regiões corticais evidenciada durante a abstinência de cocaína de 24h, utilizando a técnica de imunohistoquímica para detecção da nNOS.

O NO também parece estar envolvido na dependência de opióides. A ativação de receptores opióides μ induz mudanças em várias cascatas intracelulares que poderiam explicar este fenômeno (GUTSTEIN et al., 1998). Um dos eventos causados pela ativação destes receptores é a indução da nNOS, mediada por

canais NMDA via influxo de Ca^{2+} intracelular (SCHUMAN; MADISON, 1994). Além disto, inibidores da nNOS bloqueiam o desenvolvimento de tolerância e dependência a morfina (BHARGAVA; THORAT, 1996; CUELLAR et al., 2000). Tratamento com os inibidores NO-MICRON-nitro-L-arginina-p-nitroanilina (L-NAPNA) ou 7-NI, no *locus coeruleus*, também resulta na redução dos sinais de abstinência, reforçando a participação do NO neste processo (JAVELLE et al., 2002).

Como o mecanismo de dependência da nicotina parece estar envolvido com a atividade dos receptores opióides, o papel do NO nos processos de abstinência destas substâncias parece ser semelhante. Vários estudos têm mostrado que o uso de inibidores de nNOS atenua os sinais de abstinência de nicotina, sugerindo a possível utilização destes inibidores no tratamento do tabagismo (LEZA et al., 1996; MALIN et al., 1998; JAIN; MUKHERJEE; MOHAN, 2008).

1.2.4 NO e etanol

Assim como acontece com os opióides, a nicotina e os psicoestimulantes, a síndrome de abstinência ao etanol também parece ser influenciada pela ação do NO (Tabela 2). Estudos utilizando o doador de NO, dinitrato de isosorbida e o inibidor da NOS, L-NAME, demonstraram este envolvimento no teste de reflexo de endireitamento, evidenciado pelo aumento do tempo de duração e diminuição da perda de reflexo induzida pelo álcool com o uso do inibidor, e uma diminuição do tempo de duração do reflexo quando administrado o doador (ADAMS et al., 1994). Outros resultados mostram uma diminuição de alguns sinais de abstinência como tremor, rigidez e hiperatividade, após administração do L-NAME em ratos. Além disso, a administração do doador de NO parece aumentar a severidade de alguns sinais da síndrome de abstinência. Entretanto, nem todos os sinais parecem ser alterados, sendo que as convulsões provocadas pela abstinência não foram afetadas (ADAMS, 1993; LEZA et al., 1996; BHARGAVA; THORAT, 1996; ADAMS; CÍCERO, 1997).

Na tentativa de se obter mais evidências a respeito do envolvimento de NO no processo de abstinência, Uzbay e colaboradores (1997) testaram os efeitos de

um precursor de NO, L-Arginina (100 mg/Kg), além do inibidor de NOS, L- NAME, em ratos, utilizando uma escala de parâmetros comportamentais relacionados à abstinência. Porém, o precursor, na concentração utilizada, não apresentou diferença significativa em relação ao controle. O mesmo grupo, em 2001 demonstrou um aumento na incidência e intensidade de catatonia, induzidos por L- NAME, durante a abstinência. Em 2003, Uzbay e Erder testaram o precursor L- arginina em doses bem maiores, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg e 1000 mg/Kg. Os resultados obtidos, desta vez, foram significativos. A L-arginina resultou em aumento dos sinais de abstinência quando administrada na dose de 250 mg/Kg, e alívio dos sinais de síndrome de abstinência de etanol, em ratos, quando administradas nas doses de 500 e 1000 mg/Kg.

Vários trabalhos também mostram a participação do NO na abstinência de etanol através de técnicas indiretas de medição dos níveis de NO. Em 2001, Gören e colaboradores mostraram um aumento na concentração de L-citrulina no corpo estriado de ratos submetidos à abstinência de etanol, a partir da primeira hora de retirada do álcool. Estudos em humanos também mostraram o possível aumento do NO durante a abstinência alcoólica, evidenciado pelo aumento de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ no sangue de pacientes alcoólicos em abstinência, comparado com o controle, não alcóolicos (YUKSEL et al., 2005). Além de trabalhos que demonstram o aumento do NO durante a abstinência de etanol, Saglam e colaboradores, em 2008, descrevem uma diminuição da expressão de iNOS no cérebro de ratos abstinente, evidenciada por técnica imunohistoquímica para esta enzima.

Tabela 2: Estudos que sugerem a participação do NO na síndrome de abstinência de substâncias de abuso. N(G)-nitroarginina metil ester (L- NAME) , Dinitrato de isosorbida (ISDN), Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - diaforase (NADPH-d), 7-Nitroindazol (7NI), Nitro-L-arginina (L-NNA), NO-micron-nitro-L-arginina-p-nitroanilida (L-NAPNA), Labirinto em cruz elevado (LCE), L-NG-monometil-arginina (L-NMMA).

Trabalhos que sugerem a participação do NO na síndrome de abstinência de drogas de abuso				
Estudo	Droga de abuso	Droga/modelo testado	Animal	Resultados
ADAMS et al., 1995	Etanol	L-NAME, ISDN	Rato	L-NAME ↓ e ISDN ↑ sintomas de abstinência
JHAMANDAS et al., 1996	Morfina	Imunohistoquímica Fos + NADPH-d	Rato	↑ ativação de células NADPH-d positivas
UZBAY et al., 1997	Etanol	L-NAME e 7-NI	Rato	↓ sintomas de abstinência
MALIN et al., 1998	Nicotina	L-NNA e L-arginina	Rato	L-NNA ↓ e L-arginina ↑ sinais de abstinência
UZBAY, 2001	Etanol	L-NAME catatonía	Rato	Precipita catatonía
GÖREN et al., 2001	Etanol	Microdiálise de L-citrulina	Rato	abstinência ↑ e L-NAME ↓ L-citrulina
JAVELLE et al., 2002	Morfina	L-NAPNA e &-NI	Rato	↓ sinais de abstinência
UZBAY; ERDEN, 2003	Etanol	L-arginina	Rato	↑ ou ↓ locomoção e sinais de abstinência, dependendo da dose
YUKSEL et al., 2005	Etanol	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ sangue	Humano	↑ NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻
PEREGUD et al., 2006	Morfina	Microdiálise NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻	Rato	↑ ou ↓ NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ , depende da região
PEREGUD et al., 2007	Morfina	LCE	Rato	↓ ansiedade no LCE
MORI et al., 2007	Morfina	L-NAME e 7-NI	Camundongo	Perda de peso e ↓ sinais de abstinência
JAIN; MUKHERJEE; MOHAN, 2008	Nicotina	L-NNA, L-NAME, L-NMMA	Rato	↓ sinais somáticos de abstinência
	Etanol	Imunohistoquímica para iNOS	Rato	↓ expressão de NOS
SAGLAM, 2008				

1.3 *c-fos*

Além da manipulação farmacológica, o mapeamento neuronal empregando a expressão da proteína Fos em ratos tem sido usado para estudar a ativação de estruturas cerebrais sob diversas situações de estresse, incluindo a abstinência a substâncias de abuso (KNAPP et al., 1998).

c-fos é um protooncogene da classe dos *immediate early genes* (IGEs) e codifica a proteína Fos, um fator de transcrição. Os fatores de transcrição são proteínas que controlam a expressão de genes, responsáveis por regular o desenvolvimento e funcionamento de todas as células. Estas proteínas tendem a formar heterodímeros ou homodímeros que apresentam afinidade de ligação ao DNA, podendo, então, induzir ou suprimir a expressão de genes alvo (HERDEGEN; LEAH, 1998). Esses genes estão presentes em diversos tecidos, e, sob condições basais, geralmente se apresentam em níveis muito baixos. A ativação de *c-fos* se dá pelos mais diversos estímulos, como, por exemplo, estresse, convulsão e abstinência, podendo estar envolvida em diversos processos fisiológicos. A observação da expressão de Fos permite análises quali e quantitativas do tecido em estudo (MILDE-LANGOSCH, 2005).

Os mecanismos pelos quais ocorre a indução de *c-fos* também têm sido estudados. O aumento dos níveis neuroniais de AMPc resulta em ativação de *c-fos* via fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB) por uma proteína quinase A (SASSONE-CORSI et al., 1988). Já o influxo de Ca^{2+} por meio de canais voltagem dependentes do tipo L, também induz a expressão de Fos via CREB, enquanto a abertura de canais de Ca^{2+} pela ativação de receptores NMDA, resulta em sua ativação pela via do complexo proteína quinase ativada por mitógeno/elemento de resposta do soro (GHOSH et al., 1994).

Um dos primeiros trabalhos utilizando marcação de proteína Fos foi o realizado por Kruijer e colaboradores, em 1985, quando avaliaram a ativação do protooncogene *c-fos* por fator de crescimento nervoso, associada à diferenciação de células PC12. Cinco anos mais tarde, em 1990, Favaron e colaboradores, realizaram imunoensaio para *c-fos* no estudo de cultura primária de neurônios

grânulo-cerebelares. Ambos os grupos de pesquisa utilizaram métodos de eletroforese em suas análises para a detecção do *c-fos*.

Atualmente, a medida da expressão de *c-fos* é realizada principalmente por imunohistoquímica para detecção da proteína Fos e tem sido utilizada como um importante marcador de atividade neuronal. A utilização de marcação desta proteína como ferramenta, apresenta vantagens significativas, pois permite localizar grupos neuronais que respondem ao estímulo em estudo, além de permitir a combinação com marcação de diferentes classes de neurônios, por exemplo, neurônios nitrérgicos ou gabaérgicos (MORALES et al., 1998).

Em 1998, Knapp e colaboradores, estudaram a expressão da proteína Fos em ratos durante a abstinência, submetidos previamente a tratamento crônico com dieta contendo etanol durante 14 dias. Neste estudo, foram observadas evidências de ansiedade induzida por abstinência de etanol através da avaliação de sinais da vocalização ultrasônica emitida pelos animais durante abstinência, e a localização de neurônios ativados, através da expressão de Fos no tecido cerebral. Os resultados obtidos mostraram marcação significativa de regiões corticais, núcleo acumbens, amígdala, núcleo paraventricular do tálamo (PVA), e do hipotálamo (PVH), hipocampo, entre outras, que serviriam de guia para estudos de mapeamento posteriores.

Estudos de co-localização de expressão de proteína Fos em neurônios nitrérgicos, produtores de NO, permitem a análise do papel destes neurônios em resposta ao estímulo em questão. No caso do NO, a visualização da localização destes neurônios pode ser realizada utilizando a histoquímica para a NADPH-diaforase como marcador da presença de NOS, já que a medição direta do NO não é possível devido a suas características físico-químicas (DE OLIVEIRA, 2001; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; BEIJAMINI, 2006a).

1.4 NADPH-DIAFORASE

A histoquímica para NADPH-diaforase é uma técnica simples, de rápida execução e permite a detecção das NOS, principalmente no SNC (HOPE et al., 1991; VINCENT; KIMURA, 1992; REUSS et al., 1995).

O domínio localizado na porção C-terminal da NOS tem atividade redutase, que transfere elétrons por meio de derivados de NADPH para um aceptor de elétrons natural ou artificial, como o citocromo P450 e sais de tetrazolium, respectivamente. O aceptor utilizado nesta técnica é o *nitroblue tetrazolium* (NBT), que leva a formação de um formazan insolúvel em água. Essa reação de redução do NBT a formazan usando NADPH como substrato é chamada de atividade NADPH-diaforase da NOS, e este processo resulta na formação de um precipitado púrpura de fácil identificação histológica (BREDT et al., 1990; BLOTTER; GROZDANOVIC; GOSSRAU, 1995).

Em 1991, dois grupos de pesquisadores, Hope e colaboradores e Bredt e colaboradores demonstraram que a reação da NADPH-diaforase no SNC constituía um fiel marcador para NOS, considerando que a NOS é capaz de catalisar seletivamente reação a NADPH-diaforase em tecidos fixados em aldeído, numa proporção molecular de 1:1.

Em 1992, Vincent e Kimura demonstraram detalhadamente a distribuição e a morfologia dos neurônios nNOS positivos em diversas regiões do cérebro de ratos através da reação histoquímica da NADPH-d. Neurônios NADPH-d positivos, intensamente corados foram descritos no CP, CG e córtex frontal, bem como na substância branca subcortical, corpo estriado e complexo amigdalóide. Um padrão semelhante de coloração foi observado nas células do córtex entorrinal, enquanto que nos campos CA1, CA2 e CA3 do hipocampo apenas uma pequena rede de fibras e alguns interneurônios mostraram-se positivos para tal reação. No diencéfalo, células fortemente coradas foram identificadas no hipotálamo lateral (LH), PVH e núcleo supra-óptico. Uma fina rede de fibras com alguns neurônios corados foram observadas nos núcleos hipotalâmicos dorso e ventromedial, enquanto que a mais intensa coloração observada no cérebro foi descrita no núcleo pedunculopontino tegmentar dorsolateral. No mesencéfalo destacaram-se os colículos superior e inferior além de uma específica população de neurônios caracteristicamente arranjados na porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (PAG).

Embora a síndrome de abstinência de etanol em humanos e em ratos seja bem descrita, os mecanismos neurobiológicos em níveis moleculares envolvidos ainda são pouco entendidos, e o fato de que o álcool possa ter efeitos sobre uma

ampla variedade de sistemas de neurotransmissão contribui para a dificuldade de se desvendar todo seu mecanismo. Nesse sentido, nota-se a importância da realização de pesquisas nessa área.

Considerando as evidências da possível participação do NO na síndrome de abstinência de drogas, este trabalho buscou avaliar a ativação de neurônios nitrérgicos no SNC de ratos submetidos à abstinência de etanol, bem como mapear as regiões cerebrais envolvidas neste processo, utilizando as técnicas de imunohistoquímica para Fos combinada à histoquímica para atividade NADPH-diaforase.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ativação de neurônios nitrérgicos no SNC e o comportamento de ratos submetidos à abstinência ao etanol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento locomotor dos animais durante a abstinência no campo aberto;
- Mapear regiões ativadas pela abstinência de etanol utilizando imunohistoquímica para detecção da proteína Fos;
- Quantificar a expressão de dupla marcação (Fos e NADPH positivos) em relação ao número total de neurônios nitrérgicos, utilizando histoquímica para NADPH-diaforase.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 33 ratos Wistar machos, pesando entre 280-320g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Maringá. Chegando ao biotério local, os animais foram acomodados em gaiolas plásticas forradas com sepilho, sendo 3 animais por gaiola, sob ciclo claro/escuro de 12:12 horas, temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ$) e livre acesso à água durante todo o experimento. O experimento foi realizado de acordo com as recomendações do Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação – CEAE (099/2009).

3.2 ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL

O tratamento selecionado para promover a administração crônica de etanol foi um procedimento forçado de auto-administração de fluido dietético contendo álcool (CABRAL et al, 2006). Os animais passaram um período de 3 dias de adaptação ao ambiente do biotério local. Depois disso, nos dois dias subseqüentes, foi disponibilizada uma garrafa contendo somente uma base dietética, composta por Sustagen M® sabor chocolate (Mead Johnson, Evansville USA) (17,11g de Sustagen/60mL de água por rato/dia), sendo esta a única fonte de alimento diária para os animais (BOND; Di GISTO, 1976). Sustagen M® é uma dieta líquida completa e sua fórmula fornece proteínas, carboidratos, gordura, vitaminas e sais minerais, correspondendo a uma quantidade de 1.1 Kcal/mL. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: *i*) controle, *ii*) abstinência 24h= abstinência de etanol de 24 horas e *iii*) abstinência 48h= abstinência de etanol de 48 horas (CABRAL et al., 2006).

Para o grupo controle, foi disponibilizada a base dietética sem etanol, sendo as calorias do álcool compensadas pela adição de sacarose, 4,97g de sacarose/60 mL de bebida nos dois primeiros dias (6% de etanol), e 6,63g/60mL (8% de etanol) nos demais dias (KNAPP et al., 1998). Os grupos abstinentes foram submetidos à

administração de etanol por um período de 21 dias, seguidos de descontinuação abrupta do tratamento 24 ou 48h após. Para os grupos abstinência 24 e 48h, a dieta foi acrescida de diferentes concentrações de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), sendo de 6% (v/v) nos 2 primeiros dias e aumentada pra 8% (v/v) até o final do tratamento (3º ao 21º dia). No 22º dia todos os grupos consumiram a base dietética sem etanol nem sacarose.

O consumo de etanol foi verificado a cada três dias, por meio da sobra das garrafas que continham a bebida, e calculado em gramas de etanol/Kg de peso do animal. O peso dos animais foi verificado semanalmente durante todo o tratamento.

3.3 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Os animais passaram por um processo de habituação, sendo expostos a arena (70cm x 70cm x 40 cm) por cinco minutos nos três dias anteriores ao teste. 24 ou 48 horas após a retirada do álcool, os animais foram individualmente colocados na arena quadrada por 10 minutos (Figura 4) para observação da atividade locomotora dos mesmos. Os animais controle foram testados após os 21 dias de tratamento. Ao término do teste de cada animal, a arena foi limpa com álcool 70%. Os experimentos foram filmados por uma videocâmara (Safety View - CETV), montada verticalmente em relação à arena e conectada a um monitor e um videocassete colocados numa sala ao lado. Posteriormente, os vídeos foram analisados com o auxílio do *software* Ethovision® (versão 1.9, Noldus, Wageningen, The Netherlands). Foi quantificada a distância (cm) percorrida pelos animais durante todo o período de teste.



Figura 4: Fotografia representativa do campo aberto. Foto: Vivian T. Bonassoli.

3.4 PERFUSÃO

Duas horas após a realização da análise comportamental, os animais foram anestesiados profundamente com uma overdose de tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo) e perfundidos transcardiacamente com solução de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M (fosfato monossódico 0,01M, fosfato dissódico 0,01M, cloreto de sódio 0,9%) acrescida de heparina (200µl/L de PBS 0,01M) e nitrito de sódio (0.1%), seguida de solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS 0,01M (Figura 5). Os encéfalos foram retirados e pós-fixados na mesma solução fixadora por 2 horas. Então foram mergulhados em solução de sacarose 30% em PBS 0,01M por um período de 4-7 dias para crioproteção. Após este período, os encéfalos foram congelados em nitrogênio líquido e cortados em criostato Leica (CM 1850, Alemanha), obtendo-se secções de 40µm. As secções foram coletadas em quadruplicatas em placas de acrílico de 12 furos e mantidas em solução de PBS 0,01M acrescido de azido sódico 1%.



Figura 5: Perfusão transcadística, para fixação e remoção do tecido cerebral. Foto: Vivian T. Bonassoli.

3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PROTEÍNA FOS

As secções foram inicialmente pré-tratadas com H_2O_2 1% em PBS 0,01M durante 10 minutos para a redução da atividade da peroxidase endógena. Após 3 lavagens de 10 minutos cada, em PBS 0,01M, as secções foram incubadas em soro albumina bovina (BSA) 1% em PBS acrescido de Triton 100-X 0,03% (PBS+) durante 30 minutos, para o bloqueio de sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, o tecido foi incubado por um período aproximado de 48 horas (temperatura ambiente e agitação constante) com anticorpo policlonal de coelho anti-Fos (1:2000, *Santa Cruz Biotechnology*). Este anticorpo foi desenvolvido contra os resíduos 2-16 da porção N-terminal da proteína Fos. Passadas 48 horas, as secções foram lavadas em PBS 0,01M (3 x de 5 minutos) antes de serem incubadas em anticorpo secundário biotilado anti-coelho (1:1000, *Santa Cruz Biotechnology*,) por mais 2 horas. O anticorpo secundário liga-se ao anticorpo primário (anticorpo policlonal de coelho), específico contra a proteína Fos. Passadas 2 horas, as secções foram lavadas em PBS 0,01M (3 x de 5 minutos) e incubadas com complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:1500, Vecstatin ABC Kit, *Vector Laboratories*) e, PBS 0,01M, por 1 hora. Uma vez removido o complexo ABC, através de lavagens em PBS 0,01M (3 x

de 5 minutos), as secções foram incubadas com solução de 3-3'-di-amino-benzidina (DAB) contendo H_2O_2 0,04%, para revelação da atividade da peroxidase. A DAB é um cromógeno que, na presença de H_2O_2 e da peroxidase, propicia a formação de um precipitado de cor marrom, que pode ser visualizado no interior dos núcleos neuronais contendo proteína Fos.

3.6 HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE

Uma replicata das secções foi previamente ensaiada para a detecção da proteína Fos e então incubada por 90 minutos, a 40 °C, sob agitação constante e protegida da luz, com um meio contendo enzima diaforase β NADPH (1mg/ml, Sigma Chemical), *nitroblue tetrazolium* NBT (2 μ l/ml Sigma Chemical), Triton-X (0,5%, Fluka Analytical) e tampão fosfato (PB) 0,2M. O sal de tetrazolium, na presença de β NADPH, propicia a formação de um precipitado azul (formazan), que pode ser visualizado no citoplasma e prolongamento das células. O término da reação ocorreu pela lavagem das secções em PBS 0.1M. Finalmente, as secções foram distendidas em lâminas previamente gelatinizadas. Depois de secas, as lâminas foram desidratadas através de uma série de alcoóis (70%, 80%, 90% e 100%, 3 minutos cada), clareadas no xilol (2 x 5 minutos) e cobertas com *Permount*® e lamínulas.

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As secções foram observadas utilizando-se um microscópio óptico (Olympus BX41, America Inc.), equipado com uma câmera de vídeo (Olympus Q-Color 3, America Inc.) acoplada a um sistema de captura e análise de imagem computadorizado (Image Pro-Plus 4.0, Media Cybernetics).

A imunorreatividade à proteína Fos (Fos-IR) foi visualizada como um produto marrom depositado no interior dos núcleos neuronais; e neurônios NADPH-d positivos foram identificados como coloração púrpura no citoplasma e prolongamento das células. As regiões de interesse foram quantificadas em 3

secções por animal, em áreas pré-estabelecidas para cada estrutura de forma que abrangessem toda a região em questão. Para as estruturas de ocorrência bilateral, a média entre os valores dos dois hemisférios foi calculada. Os resultados foram apresentados como densidade neuronal levando em conta a média da estrutura/0,1mm².

Células duplamente marcadas para Fos-IR e NADPH-diaforase foram expressas em porcentagem/número total de neurônios NADPH-d positivos.

Para a contagem de Fos-IR foi utilizada a objetiva de 20 X, sendo o aumento de 200 X, e para a contagem de dupla marcação (Fos-IR e NADPH-d positivos) foi utilizada a objetiva de 40 X, sendo o aumento de 400 X.

A nomenclatura e o limite das regiões das estruturas analisados foram baseados no atlas de Paxinos e Watson (2007). As estruturas analisadas e suas coordenadas anteroposteriores (AP) a partir do bregma foram as seguintes (Figuras 6 e 7):

- Córtex cingulado (CG) (AP: 0.70 à 0.20 mm);
- Córtex piriforme (CP) (AP: 1.00 à 0.20 mm);
- Banda diagonal ventral (VDB) (AP: 0.70 à 0.20 mm);
- Núcleo anterior hipotálamo (AHA) (AP: -1.60 à -1.88mm);
- Núcleo paraventricular do tálamo (PVA), (AP: -1.60 à -1.88mm);
- Núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH) (AP: -1.80 à -1.88 mm);
- Hipotálamo lateral (LH) (AP: -1.80 à -1.88 mm);
- Núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMD) (AP: -2.56 à -3.14 mm);
- Núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) (AP: -2.56 à -3.14 mm);
- Amígdala medial (AmMe) (AP: -2.56 à -3.30 mm);
- Substância negra (SN) (AP: -5.20 à -5.80 mm);
- Núcleo medial geniculado ventral (MGV) (AP: -5.30 à -5.80 mm);
- Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial (DMPAG) (AP: -6.04 à -6.80 mm);

- Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (DLPAG) (AP: -6.04 à -6.80 mm);
- Substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (VLPAG) (AP: -6.04 à -6.80 mm);
- Núcleo dorsal da rafe parte dorsal (NDRd) (AP: -7.30 à -8.00 mm);
- Núcleo dorsal da rafe parte ventral (NDRv) (AP: -7.30 à -8.00 mm).

A escolha das estruturas analisados foi baseada na importância destas regiões na modulação emocional e motora relacionadas ao comportamento de abstinência (BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006a; BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006b; CABRAL et al., 2006 ; FONTANESI et al., 2007; KNAPP et al., 1998).

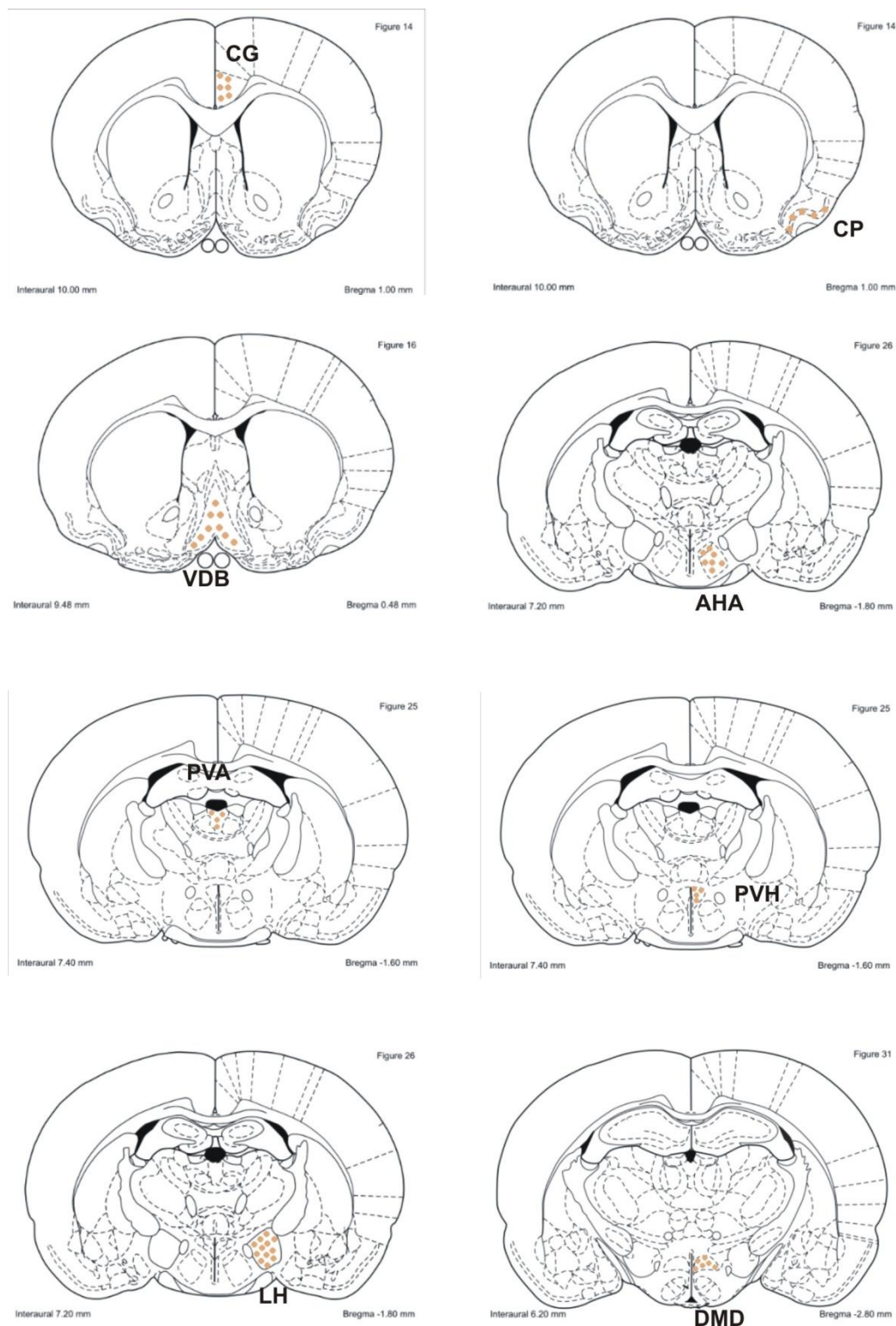


Figura 6: Diagramas representativos das estruturas quantificadas (modificado de Paxinos e Watson, (1997). Córtex Cingulado (**CG**), Córtex Piriforme (**CP**), Hipotálamo Anterior (**AHA**), Banda vertical diagonal límbica (**VDB**), Núcleo paraventricular do tálamo (**PVA**), Hipotálamo paraventricular (**PVH**), Hipotálamo Lateral (**LH**), Hipotálamo Dorsomedial (**DMD**).

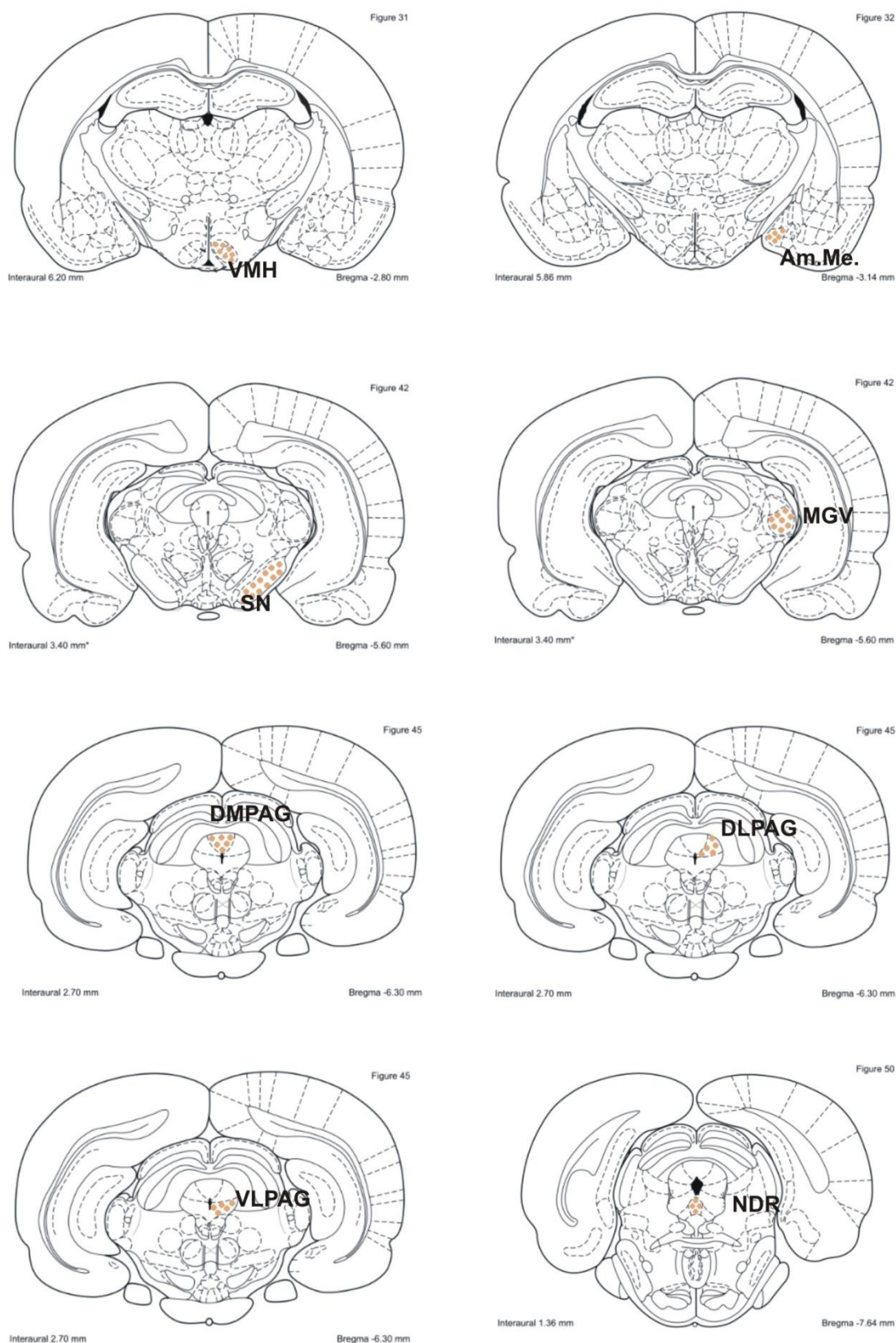


Figura 7: Diagramas representativos das estruturas quantificadas (Modificado de Paxinos e Watson, (1997). Hipotálamo ventromedial (**VMH**), Amígdala medial (**AmMe**), Substância Nigra (**SN**), Núcleo medial geniculado ventral (**MGv**), Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial (**DMPAG**), dorsolateral (**DLPAG**), ventrolateral (**VLPAG**), e Núcleo dorsal da rafe (**NDR**).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do software Statistica (Stat Soft Inc., Tulsa, OK, USA), onde os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos grupos.

Para análise do peso dos animais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. O fator independente foi “estado” (Controle, Abstinência 24 e 48h), e o fator “semanas” (1 a 4 semana) foi considerado a medida repetida.

A análise do consumo de etanol pelos animais durante o tratamento também utilizou ANOVA de medidas repetidas, tendo como fator independente o “estado” (Abstinência 24 e 48h) e como medida repetida o fator “dias”.

Os resultados relativos ao comportamento e a contagem de neurônios foram analisados através da análise de variância de uma via (ONEWAY ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey.

4 RESULTADOS

4.1 CONSUMO DE ETANOL DURANTE O TRATAMENTO

A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve diferença significativa no consumo total de etanol entre os animais dos grupos abstinência de 24 e 48h ao longo do tratamento ($F_{(1,21)}=2,88$, $p>0,05$). No entanto, houve um aumento do consumo de etanol a partir do 4º dia, para os grupos abstinência de 24 e 48h, respectivamente ($F_{(1,21)}= 381,93$, $p<0,05$), bem como interação entre o “tratamento” e os “dias” ($F_{(1,21)}= 12,73$, $p<0,05$). O consumo da dieta líquida pelos animais controle foi de 100% do volume oferecido (60mL/animal/dia).

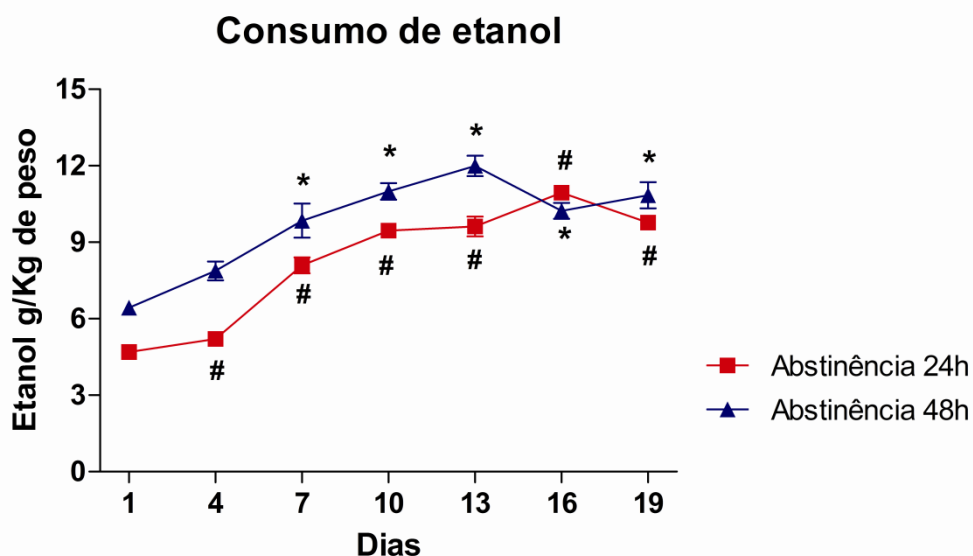


Figura 8: Consumo de etanol durante o tratamento crônico para induzir dependência em ratos. Os símbolos representam as médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) de 6 animais. # $p<0,05$ comparado com o consumo do primeiro dia de tratamento do grupo abstinência de 24h, * $p<0,05$ comparado com o consumo do primeiro dia de tratamento do grupo abstinência de 48h.

4.2 ANÁLISE DO PESO DOS ANIMAIS

Todos os animais apresentaram perda de peso durante o tratamento, porém, a ANOVA de medidas repetidas não mostrou diferença significativa entre os grupos durante o tratamento ($F_{(2,32)} = 2,85$, $p > 0,05$).

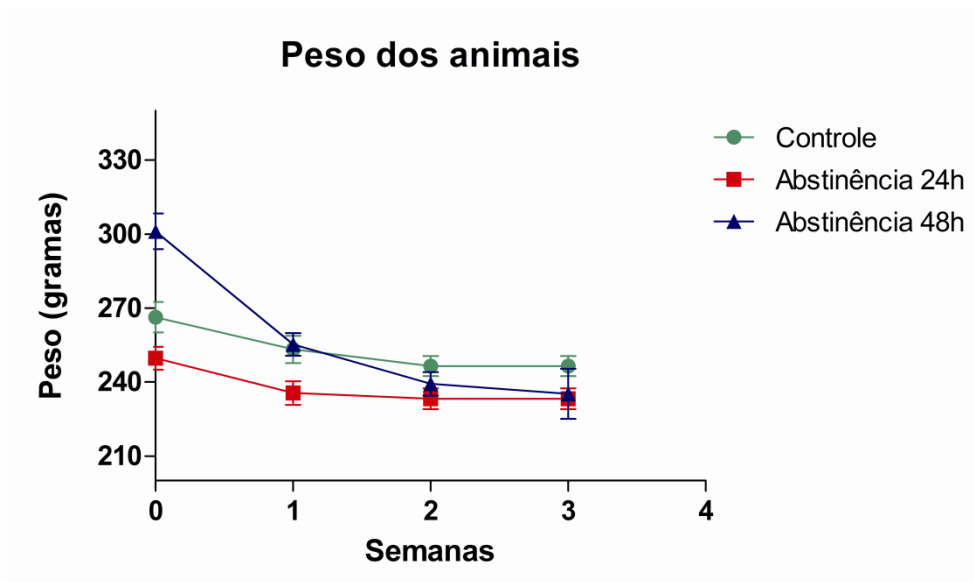


Figura 9: Efeito do tratamento com etanol sobre o peso dos animais. Os símbolos representam as médias $\pm$ EPMS de 11 animais, $p > 0,05$.

4.3 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Uma diminuição significativa da atividade locomotora foi observada nos animais submetidos à 24h de abstinência ao álcool, caracterizada por uma menor distância percorrida comparada aos animais do grupo controle ($F_{(2,32)} = 4,07$, $p < 0,05$. controle = $4610,2 \pm 471,9$ cm; 24h = $2785,0 \pm 507,2$ cm). Animais submetidos à abstinência de 48h não apresentaram variação significativa na atividade locomotora quando comparados com o controle ou abstinente de 24h (48h = $3579,1 \pm 403,9$ cm).

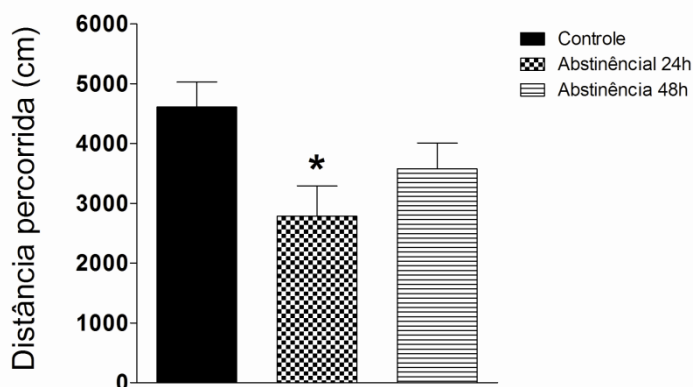


Figura 10 Efeito da abstinência de etanol de 24 e 48 horas após consumo crônico de 21 dias sobre a atividade locomotora de animais expostos ao campo aberto por dez minutos. As colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 11 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.4.1 Quantificação do número de células Fos-IR

Neste experimento foram quantificadas as estruturas nas quais a abstinência de etanol induziu ativação neuronal. Os resultados estão sumarizados na Tabela 3 e ilustrados nas Figuras 11 à 18.

A abstinência de etanol no tempo de 24h induziu um aumento significativo de células marcadas quando comparado com o grupo controle no CG ($F_{(2,13)}=9,19$; $p < 0,05$), CP ($F_{(2,14)} = 5,82$, $p < 0,05$), AHA ($F_{(2,13)}=3,66$; $p < 0,05$), PVA ($F_{(2,14)}=5,74$; $p < 0,05$), PVH ($F_{(2,14)}=6,48$; $p < 0,05$), LH ($F_{(2,13)}=15,15$; $p < 0,05$), DMD ($F_{(2,13)}=7,67$; $p < 0,05$), AmMe ($F_{(2,13)}=8,40$; $p < 0,05$), SN ($F_{(2,13)}=5,48$; $p < 0,05$), DMPAG ($F_{(2,13)}=5,06$, $p < 0,05$), DLPAG ($F_{(2,13)}=9,46$, $p < 0,05$), e VLPAG ($F_{(2,13)}=8,43$, $p < 0,05$).

No tempo de 48h foi observado aumento significativo da ativação neuronal no CG ($F_{(2,13)}=9,19$; $p < 0,05$), CP ($F_{(2,14)}= 5,82$, $p < 0,05$), PVA ($F_{(2,14)}=5,74$; $p < 0,05$), PVH ($F_{(2,13)}=6,48$; $p < 0,05$), LH ($F_{(2,13)}=15,15$; $p < 0,05$), AmMe ($F_{(2,13)}=8,40$; $p < 0,05$), SN ($F_{(2,13)}=5,48$; $p < 0,05$), DMPAG ($F_{(2,13)}=5,06$, $p < 0,05$), DLPAG ($F_{(2,13)}=9,46$, $p < 0,05$), VLPAG ($F_{(2,13)}=8,43$, $p < 0,05$) e NDR ($F_{(2,13)}=7,29$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle.

Tabela 3: Número de células imunorreativas para Fos em estruturas cerebrais de ratos controle ou abstinentes (Fos-IR/0,1mm²). Média±EPM. *p<0,05, **p<0,001, comparado com o controle. Maiores informações nas Figuras 11 à 18.

Estruturas	Controle	Abstinência 24h	Abstinência 48h
Córtex cingulado	14,68 ± 4,93	67,03 ± 7,48 *	55,12 ± 8,75 *
Córtex piriforme	19,38 ± 5,56	87,51 ± 14,82 *	96,84 ± 23,68 *
Banda diagonal ventral	24,78 ± 10,87	39,53 ± 6,19	32,68 ± 4,46
Núcleo anterior do hipotálamo	53,61 ± 12,55	122,5 ± 17,69 *	98,39 ± 20,29
Núcleo paraventricular do tálamo	34,64 ± 5,37	71,72 ± 7,49 *	65,90 ± 9,79 *
Núcleo paraventricular do hipotálamo	14,68 ± 4,93	67,03 ± 7,48 *	55,12 ± 8,75 *
Hipotálamo lateral	16,30 ± 0,83	44,16 ± 3,39 **	38,70 ± 3,53 *
Núcleo dorsomedial do hipotálamo	21,30 ± 8,13	61,04 ± 13,61 *	41,28 ± 10,81
Núcleo ventromedial do hipotálamo	35,02 ± 4,00	49,65 ± 10,42	50,94 ± 4,51
Amígdala medial	16,88 ± 2,22	44,48 ± 6,55 *	56,53 ± 5,85 *
Substância negra	3,42 ± 1,15	28,52 ± 7,96 *	19,72 ± 1,58 *
Núcleo medial geniculado ventral	7,76 ± 2,83	29,85 ± 11,01	24,70 ± 11,69
PAG dorsomedial	8,58 ± 2,75	39,27 ± 4,52 *	39,13 ± 9,06 *
PAG dorsolateral	13,70 ± 3,63	56,83 ± 7,59 *	65,68 ± 9,02 *
PAG ventrolateral	14,97 ± 2,56	47,28 ± 6,25 *	52,65 ± 6,83 *
Núcleo dorsal da rafe	8,36 ± 3,25	31,06 ± 8,21	47,07 ± 13,12 *

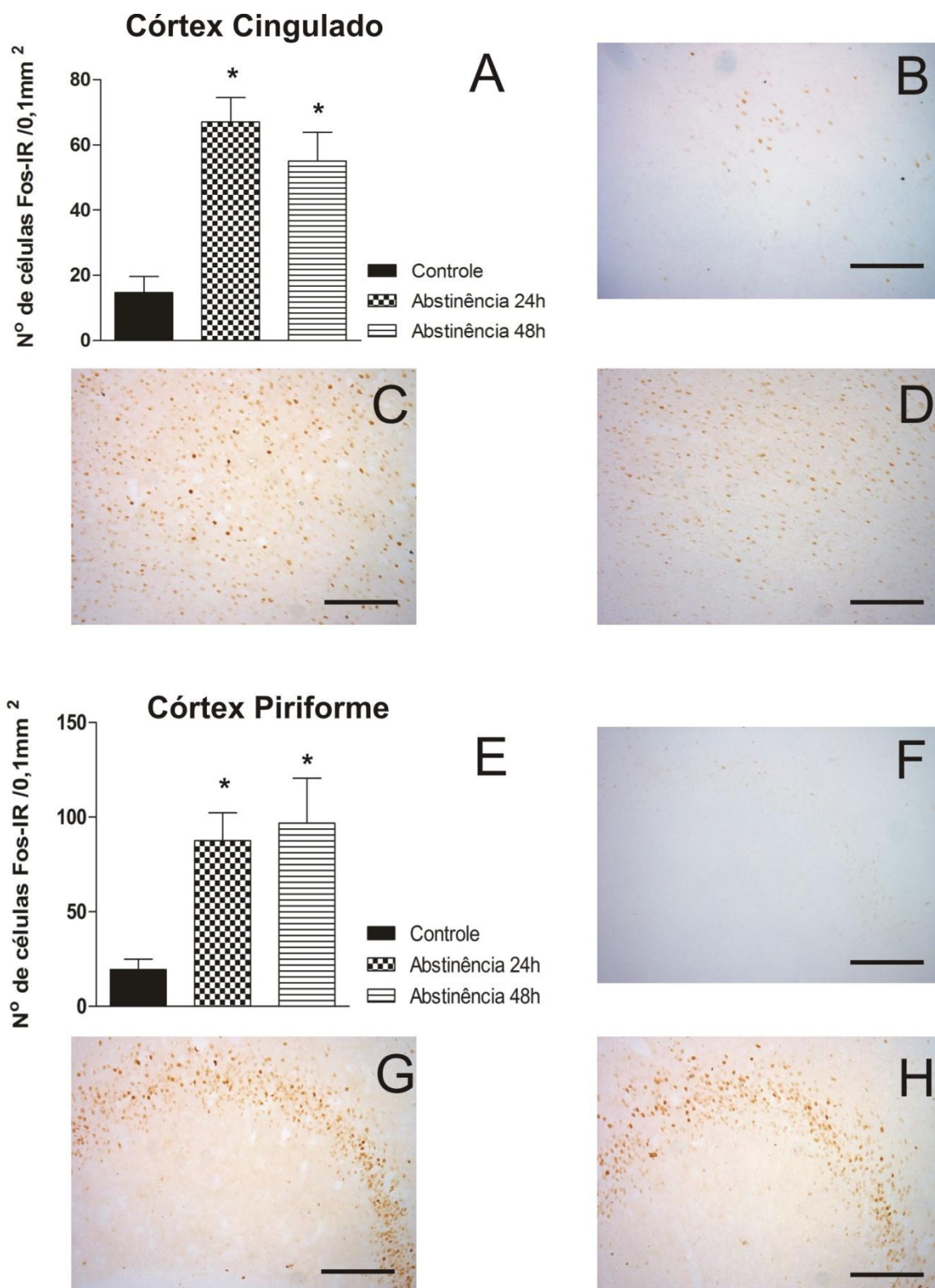


Figura 11: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR. As Colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 4-5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do Córtex Cingulado (B, C e D) e do Córtex Piriforme (F, G e H), Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G) e Abstinência 48h (D e H). Barras horizontais=150 μ m.

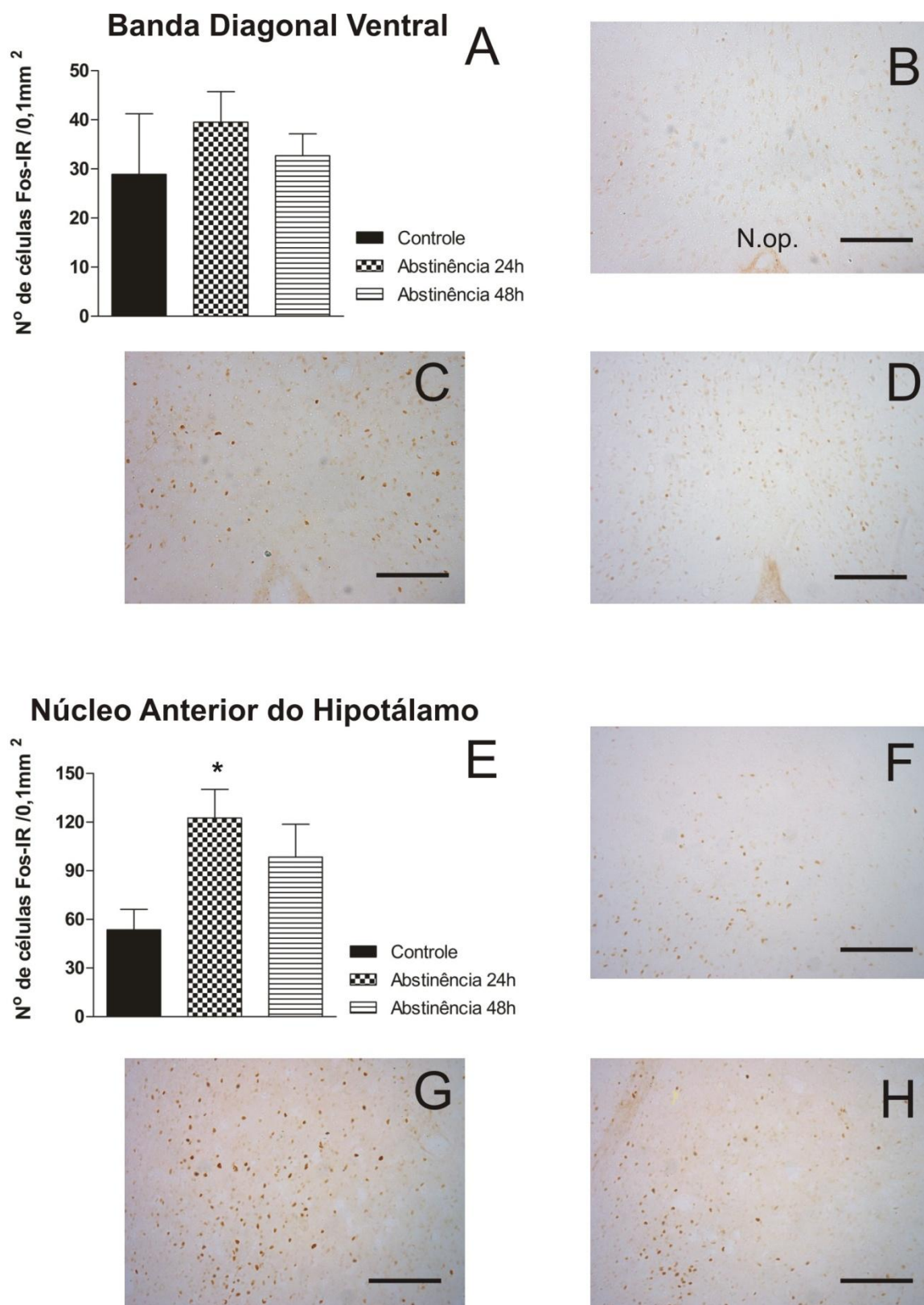


Figura 12: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR. As colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 4-5 animais, * $p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da Banda Diagonal Ventral (B, C e D) e do Núcleo Anterior do Hipotálamo (F, G e H), Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G), Abstinência 48h (D e H), Núcleo óptico (N.op). Barras horizontais=150 μ m.

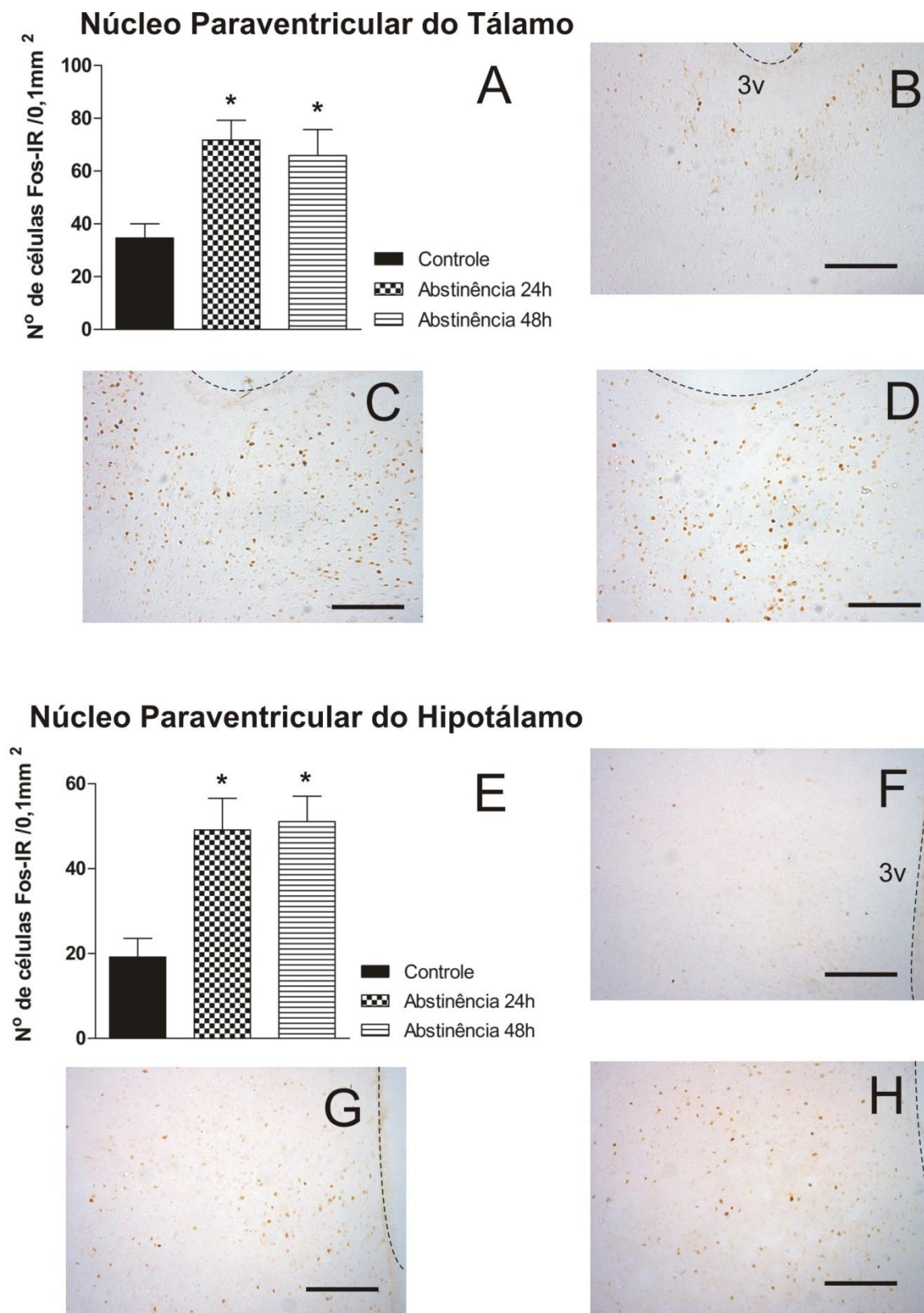


Figura 13: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR. As colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 4-5 animais, * $p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do Núcleo Paraventricular do Tálamo (B, C e D) e do Hipotálamo (F, G e H), Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G), Abstinência 48h (D e H), Terceiro ventrículo (3v.) Barras horizontais=150 μ m.

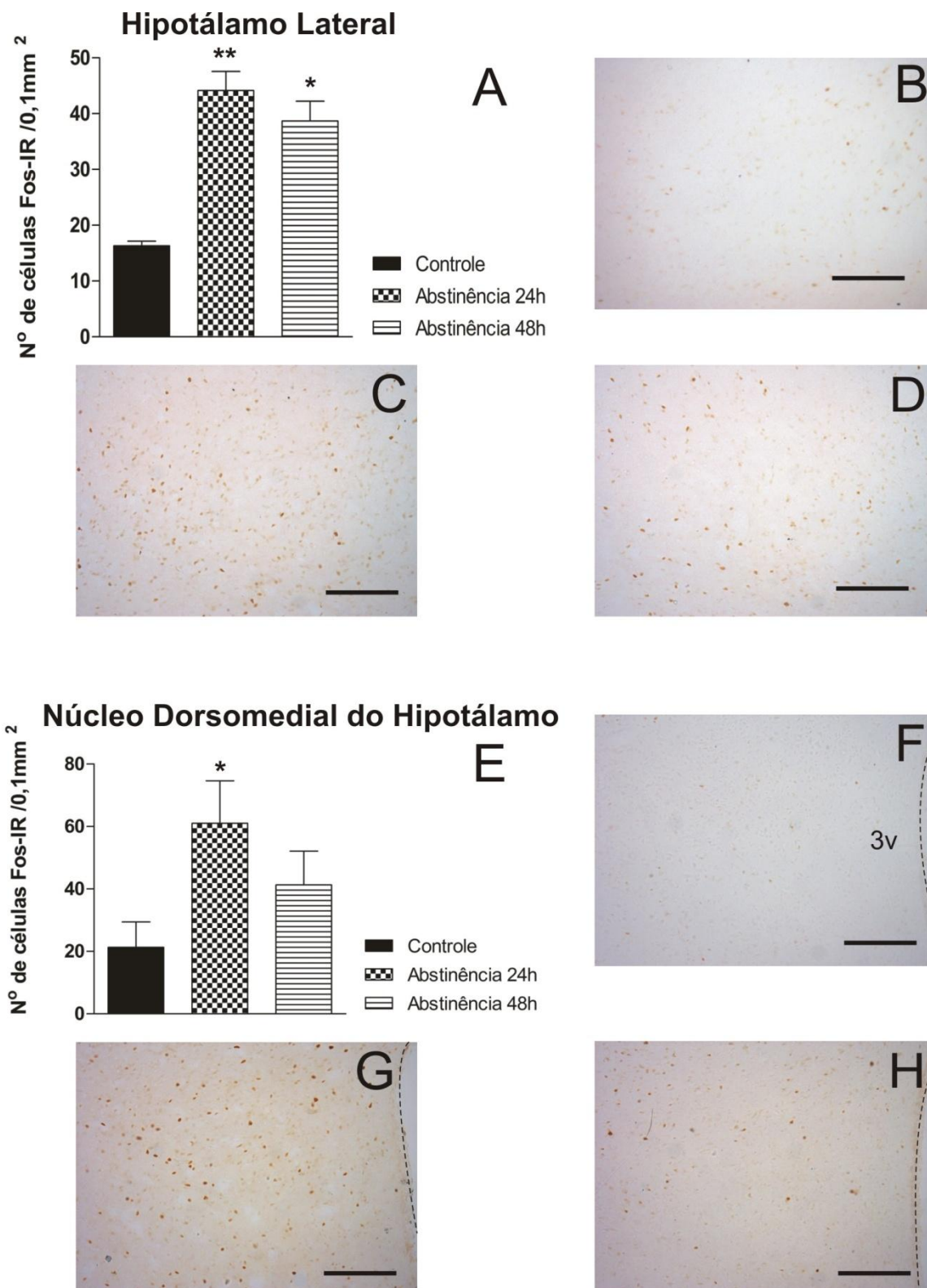


Figura 14: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR. As colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 4-5 animais, * $p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do Hipotálamo Lateral (B, C e D) e Núcleo dorsomedial do Hipotálamo (F, G e H), Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G), Abstinência 48h (D e H), Terceiro ventrículo (3v). Barras horizontais=150 μ m.

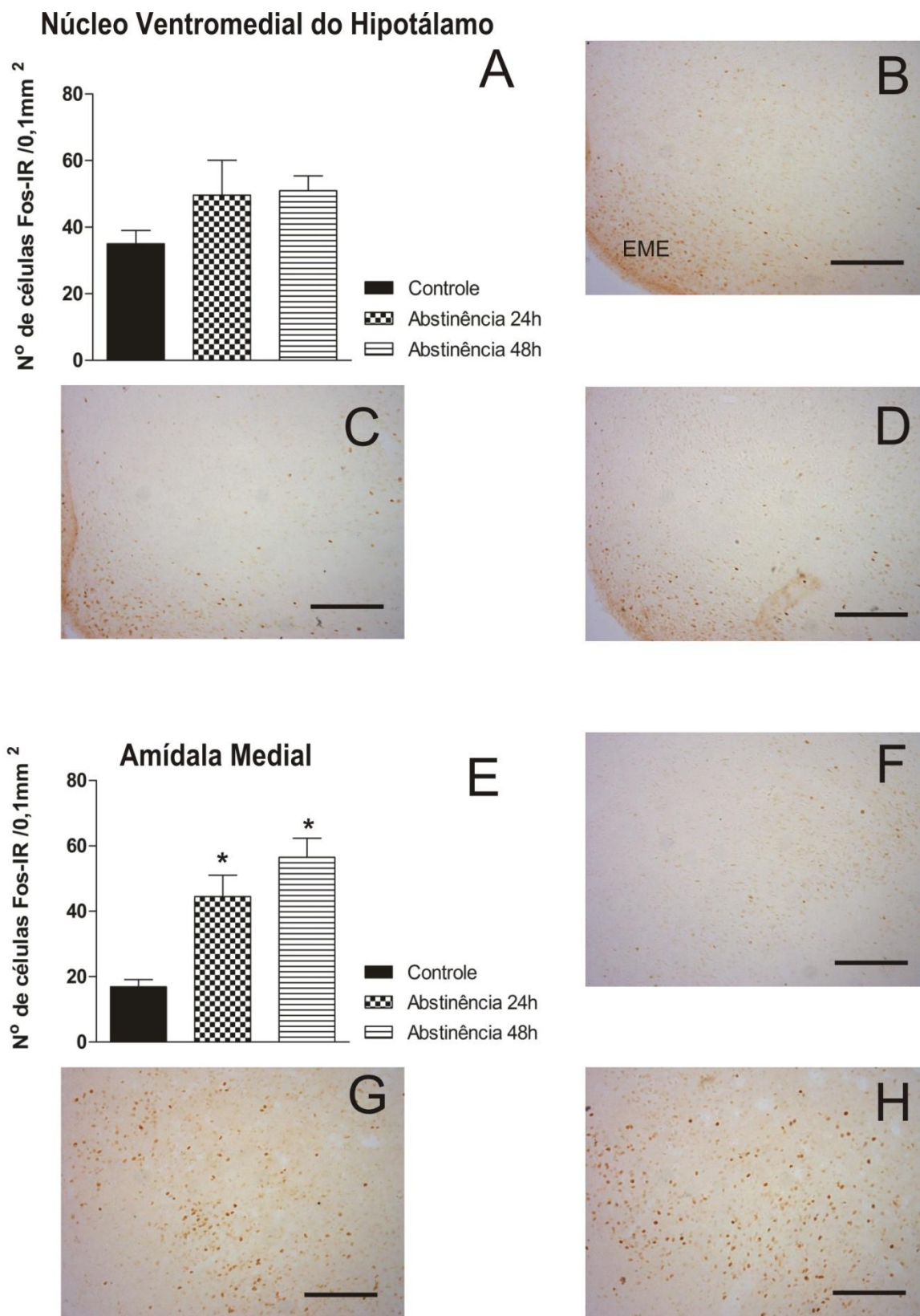


Figura 15: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR. As colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 4-5 animais, * $p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do Núcleo Ventromedial do Hipotálamo (B, C e D) e Amídala Medial (F, G e H), Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G), Abstinência 48h (D e H), Eminência medial externa (EME). Barras horizontais=150 μ m

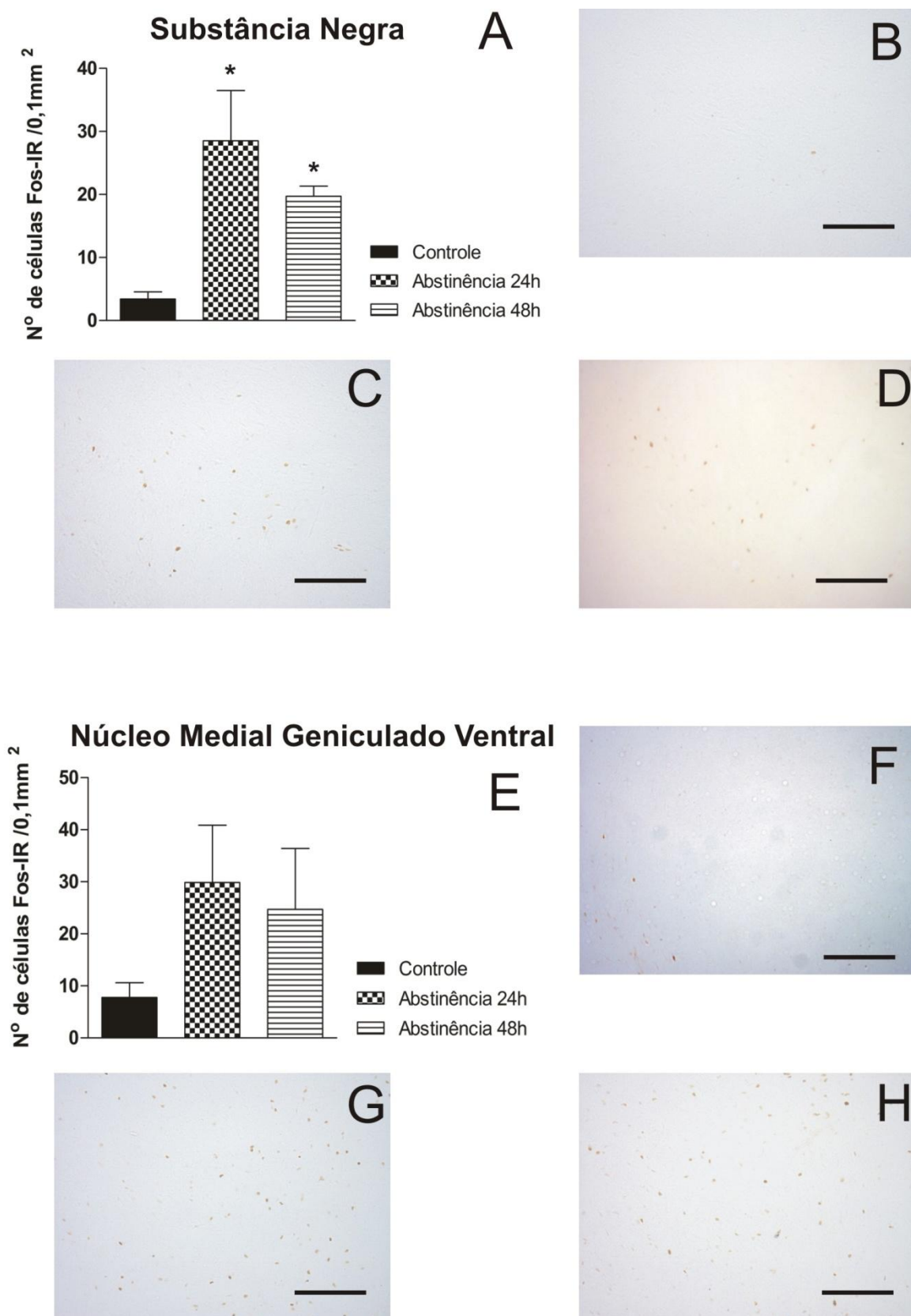


Figura 16: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR. As colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 4-5 animais, * $p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da Substância Negra (B, C e D) e Núcleo Medial Geniculado Ventral (F, G e H), Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G), Abstinência 48h (D e H). Barras horizontais=150 μ m.

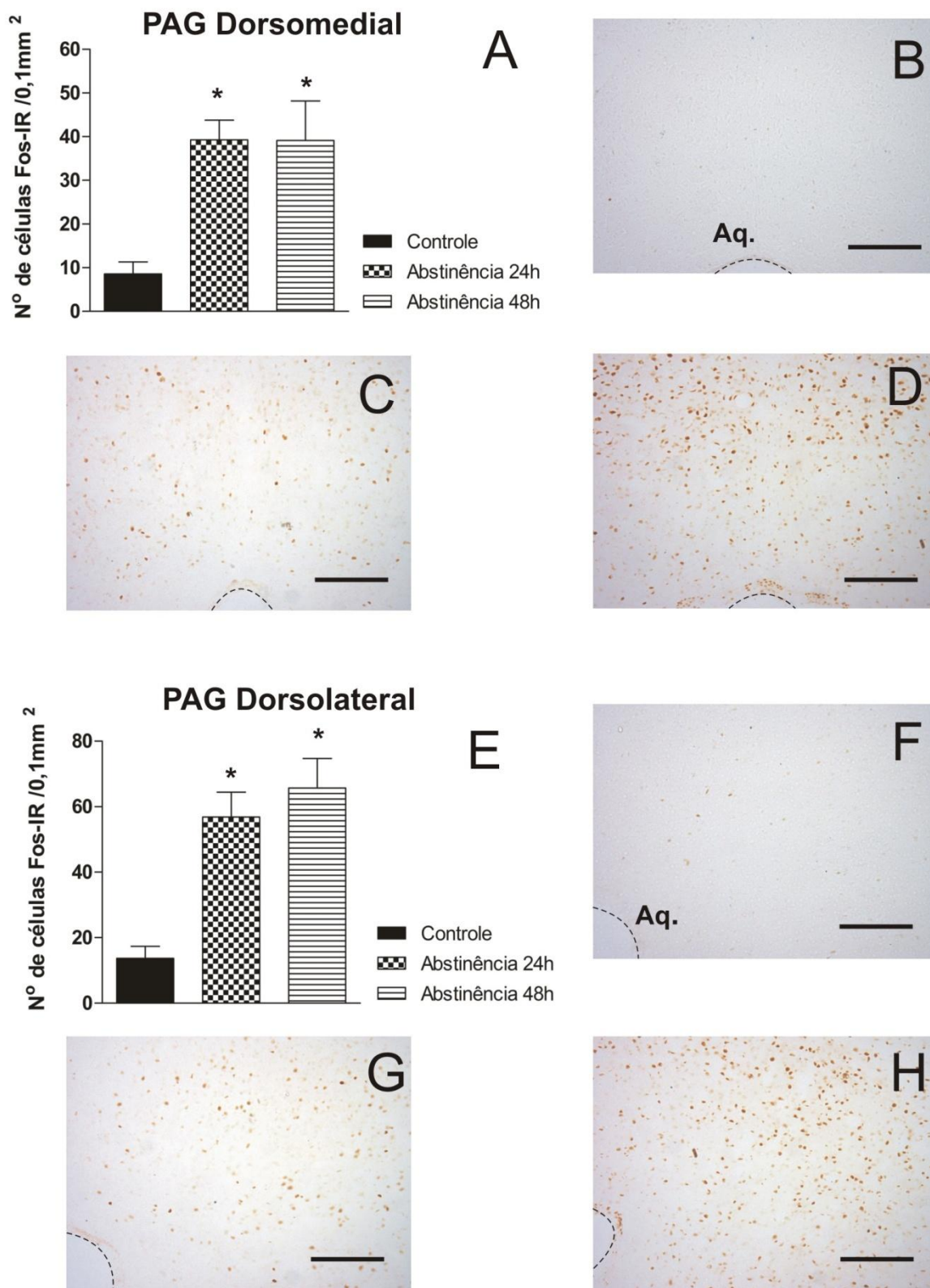


Figura 17: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR. As colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 4-5 animais, * $p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da Substância cinzenta periaquedutal (PAG) dorsomedial (B, C e D), e dorsolateral (F, G e H), Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G), Abstinência 48h (D e H), Aqueduto cerebral (Aq.). Barras horizontais=150 μ m.

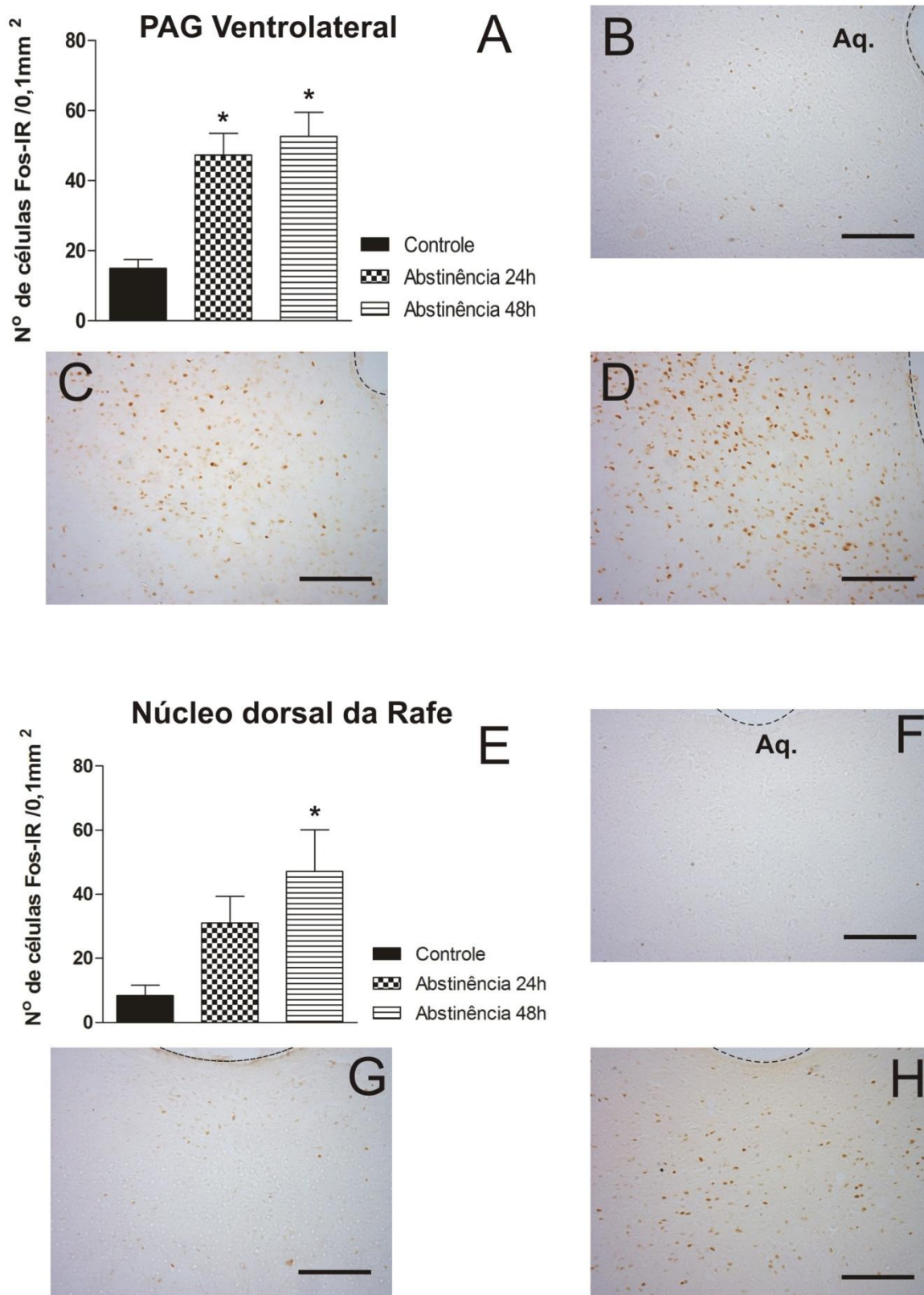


Figura 18: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR. As colunas representam as médias $\pm$ EPMs de 4-5 animais, * $p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da PAG ventrolateral ((B, C e D), e do Núcleo dorsal da rafe (F, G e H). Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G), Abstinência 48h (D e H), Aqueduto de Sylvius (Aq.S.). Barras horizontais=150 μ m.

4.4.2 Expressão de Fos-IR em neurônios NADPH-d positivos.

Neste experimento foram quantificadas as células NADPH-d positivas que foram ativadas (Fos-IR), em relação ao número total de células NADPH-d positivas, expresso em porcentagem, nas estruturas que apresentaram co-localização de marcação. Os resultados estão sumarizados na Tabela 4 e ilustrados nas Figuras 19 à 21.

A abstinência de etanol no tempo de 24h induziu um aumento significativo de células NADPH-d positivas ativadas, quando comparado com o grupo controle, no PVH ($F_{(2,13)}=6,35$, $p<0,05$), DLPAG ($F_{(2,13)}=8,73$, $p<0,05$), e NDR ($F_{(2,13)}=6,24$, $p<0,05$).

No tempo de 48h foi observado aumento significativo da ativação neuronal de neurônios NADPH-d positivos apenas na DLPAG ($F_{(2,13)}=8,73$, $p<0,05$), quando comparado ao grupo controle.

Não houve diferença significativa na ativação de neurônios NADPH-d positivos entre os grupos abstinência 24 e 48h, nas estruturas analisadas.

Tabela 4: Porcentagem de neurônios com dupla marcação em estruturas cerebrais de ratos controle ou abstinentes (Fos-IR e NADPH-d positivos / total de neurônios NADPH-d positivos). Média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, comparado com o controle. Maiores informações nas Figuras 19 à 21.

Estruturas	Controle	Abstinência 24h	Abstinência 48h
Banda diagonal ventral	34,29 $\pm$ 4,85	54,67 $\pm$ 9,35	47,84 $\pm$ 7,22
Núcleo paraventricular do hipotálamo	22,68 $\pm$ 3,24	45,69 $\pm$ 5,47 *	38,77 $\pm$ 4,03
Hipotálamo lateral	42,35 $\pm$ 8,00	47,47 $\pm$ 12,00	56,24 $\pm$ 5,27
PAG dorsolateral	25,12 $\pm$ 2,75	49,89 $\pm$ 6,19 *	48,83 $\pm$ 3,50 *
Núcleo dorsal da rafe - parte dorsal	17,59 $\pm$ 2,06	32,19 $\pm$ 3,03*	21,21 $\pm$ 3,46
Núcleo dorsal da rafe- parte ventral	11,48 $\pm$ 3,18	28,41 $\pm$ 6,63	19,98 $\pm$ 2,35

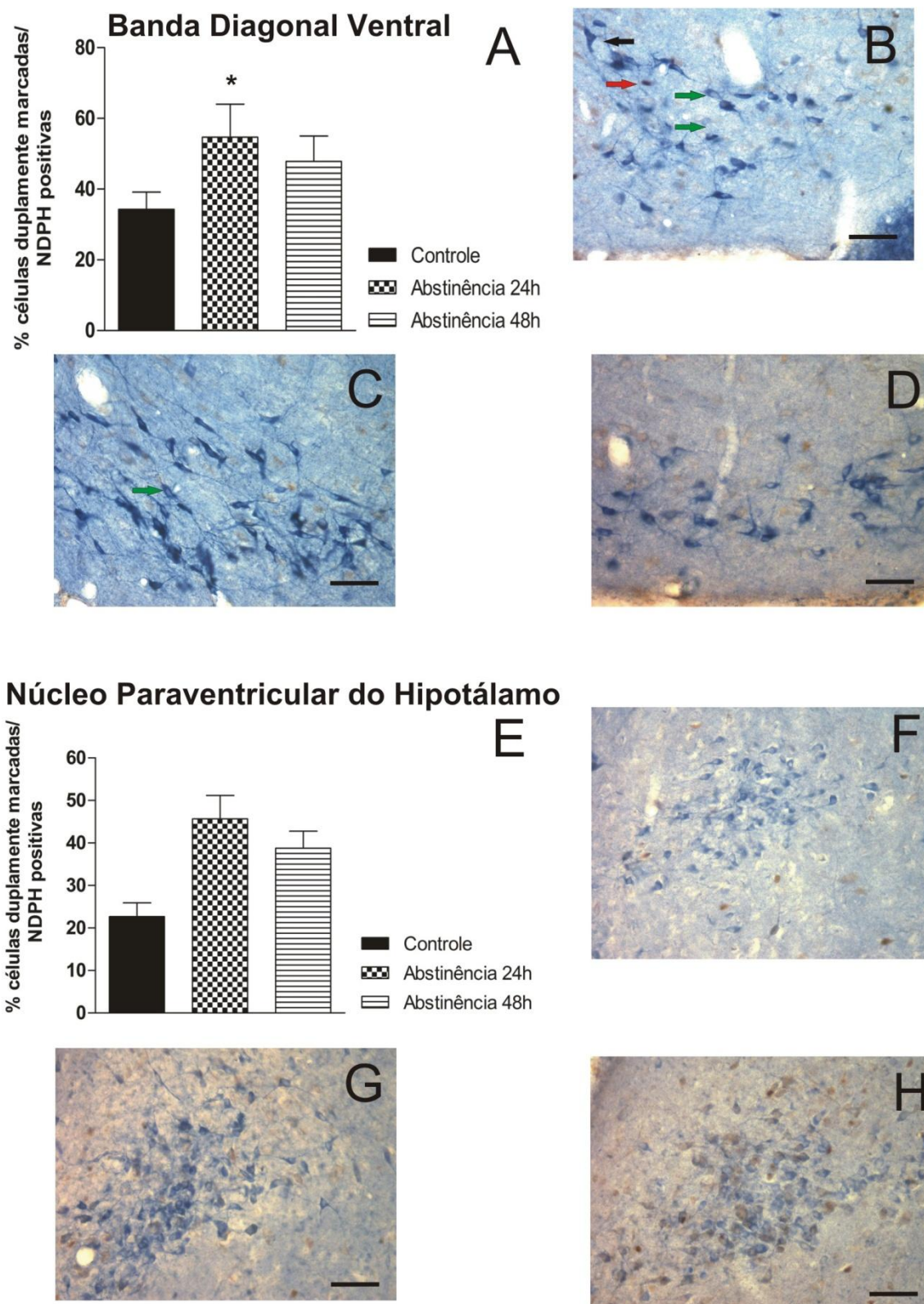


Figura 19: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR em neurônios NADPH-d positivos. As colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 4-5 animais. $*p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da Banda Diagonal Ventral (B, C e D) e Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (F, G e H), Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G) e Abstinência 48h (D e H). Barras horizontais=50 μ m. Setas verdes indicam células NADPH-d positivas; setas vermelhas indicam Fos-IR; setas pretas indicam células duplamente marcadas.

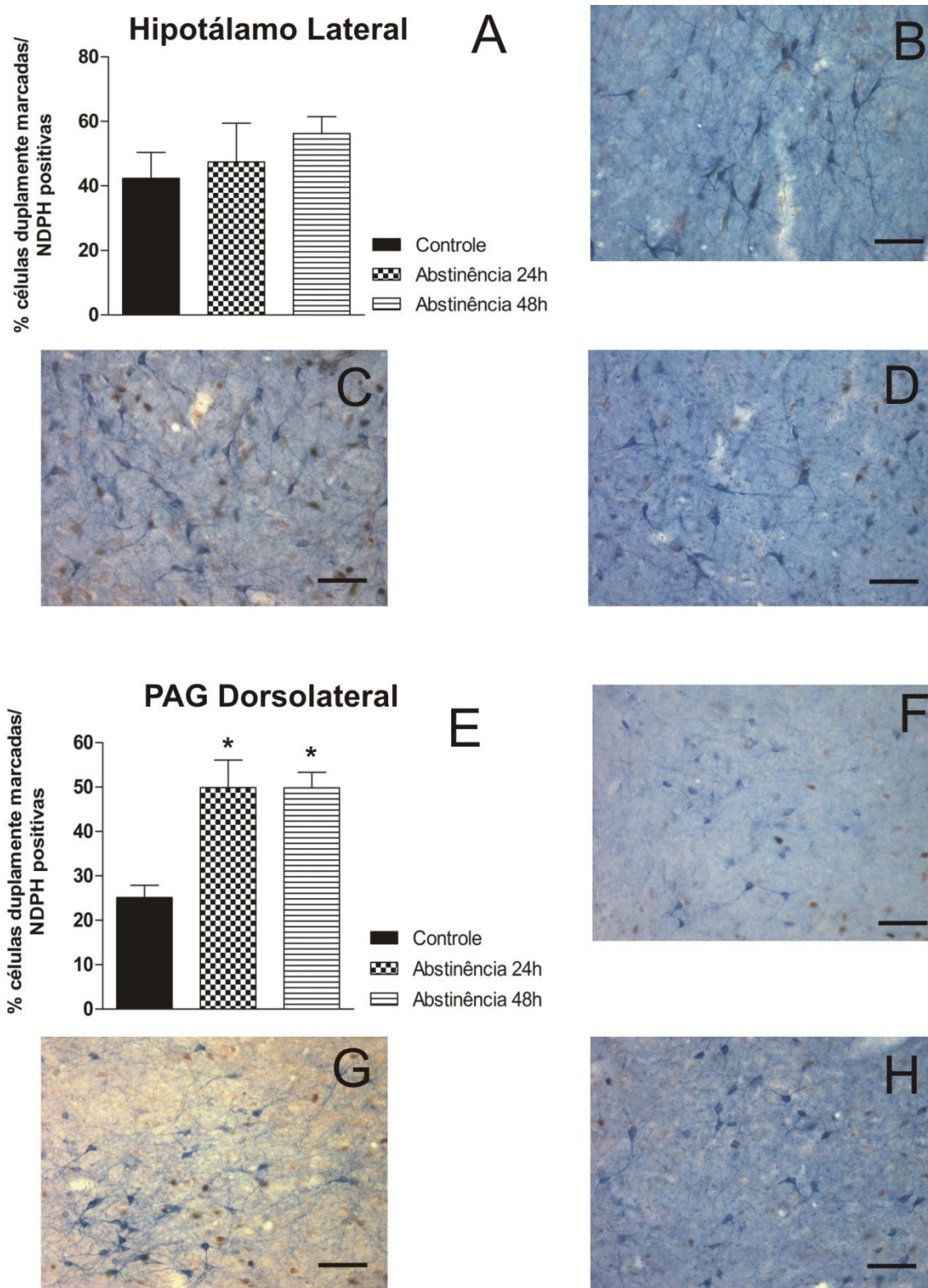


Figura 20: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR em neurônios NADPH-d positivos. As colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 4-5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do Hipotálamo lateral (B, C e D) e PAG dorsolateral (F, G e H), Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G) e Abstinência 48h (D e H). Barras horizontais=50 μ m.

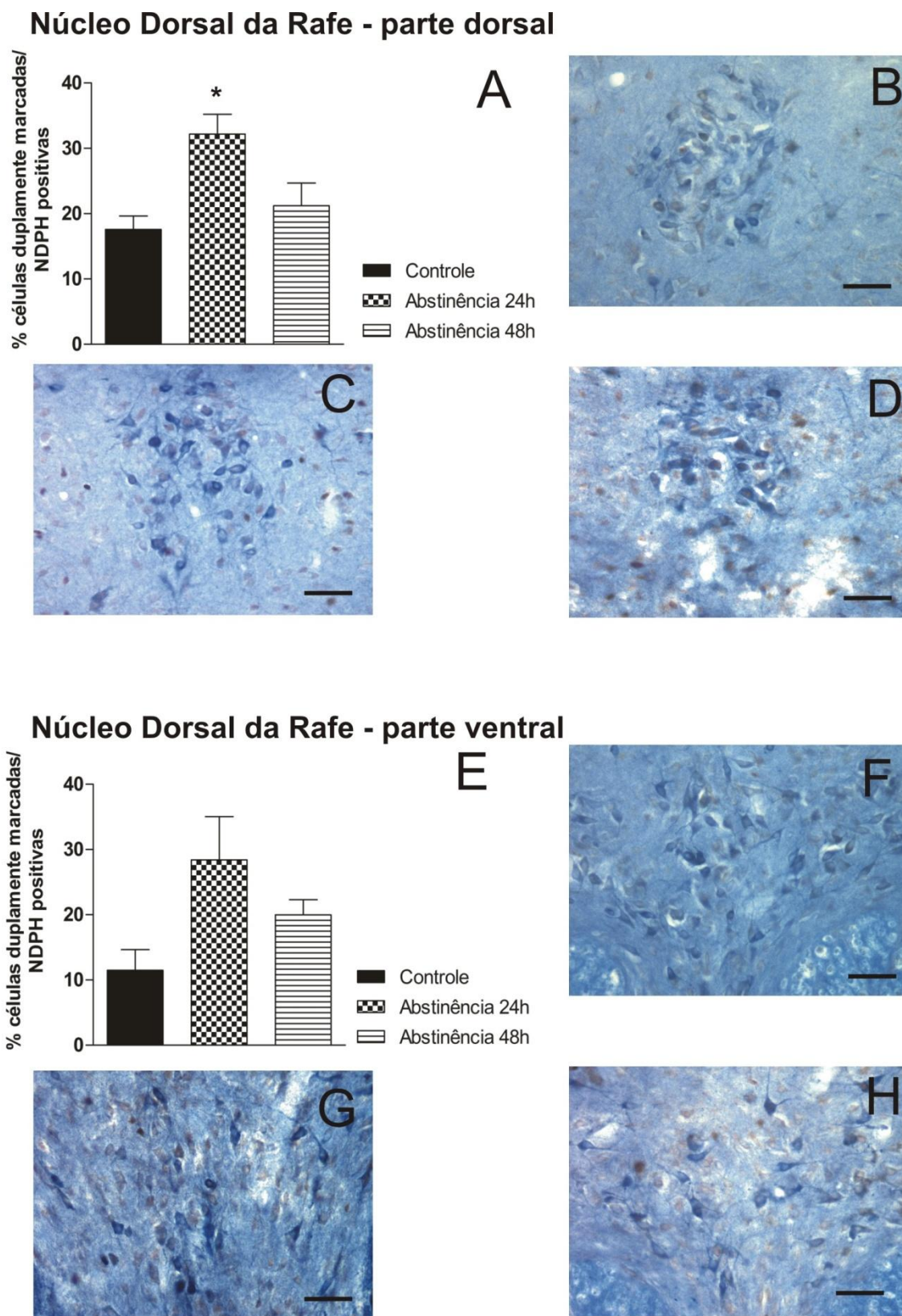


Figura 21: Efeito da abstinência de etanol sobre a expressão de Fos-IR em neurônios NADPH-d positivos. As colunas representam as médias $\pm$ EPMS de 4-5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao controle (A e E). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do Núcleo dorsal da rafe parte dorsal (B, C e D) e parte ventral (F, G e H), Controle (B e F), Abstinência 24h (C e G) e Abstinência 48h (D e H). Barras horizontais=50 μ m.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O consumo crônico de etanol pode levar à dependência e a descontinuação de seu uso está relacionada ao aparecimento da síndrome de abstinência alcoólica, caracterizada por intensos sinais de ansiedade. A ocorrência desta síndrome está associada a alterações neurobiológicas em vários sistemas de neurotransmissão como os que utilizam GABA, GLU, DA, 5-HT e NO. O presente trabalho avaliou o desempenho comportamental de ratos submetidos ao campo aberto 24 ou 48h após suspensão do consumo crônico de etanol durante 21 dias, bem como a ativação neuronal em diferentes regiões do SNC. Este trabalho avaliou também a ativação de neurônios nitrérgicos, durante os mesmos períodos de abstinência.

Diversos trabalhos experimentais mostram alteração da atividade locomotora de roedores em resposta à suspensão do consumo crônico de etanol (MEHTA; TICKU, 1993; ERDEN et al, 1999). Um estado de hiperatividade locomotora tem sido observado nas primeiras horas de retirada, o que muitas vezes é acompanhado de hipertermia (PUTZKE et al., 1996). Este efeito tem sido interpretado como efeito residual da intoxicação alcóolica. No entanto, outros autores mostraram redução da atividade locomotora após 6 (MEERT et al., 1992), 8 (RIPLEY et al., 2002) ou 14h (DEVAUD et al., 2002) da suspensão do consumo crônico de etanol. Estes autores sugerem que a diminuição da atividade locomotora estaria relacionada com o aumento da ansiedade em consequência da retirada do etanol. No presente trabalho, animais submetidos a abstinência ao etanol por 24h, apresentaram significativa redução na atividade locomotora, caracterizada por uma menor distância percorrida no campo aberto. De acordo, ratos e camundongos tratados com etanol 8% durante 7 dias, apresentaram diminuição do tempo e do número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE), após abstinência de 16h (WILSON et al., 1998). Outros estudos utilizando o LCE mostraram aumento da ansiedade apenas 12h após a retirada do etanol (FILE; ZHARKOVSKY; GULATI, 1991; PRATHER, REZAZADEH, LAL, 1991; FILE; ANDREWS; AL-FARHAN, 1993; JUNG, et al., 2000). Um aumento do tempo de duração e do número de vocalizações ultrasônicas também foi descrito após 15h da descontinuação do tratamento crônico com etanol (KNAPP et al., 1998, MOY et al., 2000).

O efeito ansiogênico causado pela abstinência alcoólica foi acompanhado por um aumento significativo da expressão de Fos em diversas estruturas cerebrais. A imunohistoquímica para Fos mostrou um aumento na expressão desta proteína após 24 ou 48h de abstinência, em estruturas como CG, CP, PVA, PVH, LH, AmMe, SN, DLPAG e VLPAG. Estes resultados estão de acordo com resultados apresentados em estudos semelhantes que também descrevem ativação neuronal nas regiões do CP, CG, PVH, PVA AmMe, entre outras, detectada de 12 a 15h após a interrupção do consumo de etanol (MATSUMOTO,1993; WILCE et al.,1994; KNAPP et al., 1998; BORLIKOVA et al., 2006). A ativação neuronal das mesmas estruturas cerebrais acima descritas foi também observada 48h após a retirada do diazepam (FONTANESI et al., 2007). Em adição, o PVH mostra-se ativado durante a abstinência à morfina (BENEVIDES et al, 2006). Estas evidências sugerem que estas estruturas integrem o substrato neural da abstinência e podem estar envolvidas na expressão dos sintomas de retirada das drogas de abuso.

A abstinência ao etanol levou a ativação de estruturas cerebrais relacionadas à expressão autonômica, hormonal e comportamental relacionada a ansiedade como os núcleos hipotalâmicos (DMD, PVH, AHA), PAG dorsal (DPAG) e AmMe. A ativação da DPAG parece estar relacionada ao comportamento aversivo por induzir estado de medo em ratos durante a abstinência de etanol de 48h. Cabral e colaboradores (2006) mostraram que a abstinência de etanol de 48h foi capaz de diminuir os limiares de resposta de congelamento e de fuga observados durante a estimulação elétrica na DPAG. Assim, a ativação desta estrutura pode possivelmente ser responsável pelo aumento da ansiedade apresentado pelos animais, caracterizado pela diminuição da atividade locomotora.

Uma importante área com forte reatividade à proteína Fos foi a AmMe, região que apresenta um importante papel na regulação de comportamentos de medo e ansiedade (GRAEFF et al., 1993). A amígdala funciona como uma interface entre áreas cerebrais neurovegetativas e áreas corticais superiores. Recebendo aferências do hipocampo e áreas corticais, a amígdala estaria envolvida na interpretação de eventos ameaçadores ou estressantes, com base em experiências passadas ou presentes, e na determinação de respostas comportamentais, neuroendócrinas e autonômicas que acompanham estes eventos, através de suas conexões diretas com o hipocampo e a DLPAG (LE DOUX, 1987; GRAEFF et al., 1993).

Outras estruturas com papel nas respostas a ansiedade como o CP, CG, e VLPAG, também mostraram imunorreatividade à proteína Fos durante a abstinência de etanol. No entanto, a ativação neuronal observada nas diversas estruturas relatadas neste estudo, não reflete necessariamente a ansiedade, mas talvez, a ativação do comportamento motor do animal desencadeado pelo procedimento. De fato, em experimentos comportamentais onde os animais podem locomover-se livremente, como neste caso, torna-se praticamente impossível dissociar estruturas cerebrais que estejam puramente envolvidas com a atividade locomotora, daquelas associadas com a ansiedade. Ainda, apenas pela análise da expressão de Fos não é possível determinar se a ativação neuronal se dá pelo efeito local da abstinência diretamente sobre as estruturas estudadas, ou se é mediado por conexões e mecanismos neuroquímicos ativados indiretamente em sítios distantes (KNAPP et al., 1998).

Continuando o estudo de mapeamento, analisamos o envolvimento de neurônios nitrérgicos durante a síndrome de abstinência ao etanol. A abstinência de 24h induziu um aumento significativo no número de células NADPH-d positivas ativadas, quando comparado com o grupo controle no PVH, DLPAG e NDR. No tempo de 48h foi observado aumento significativo da ativação de neurônios nitrérgicos apenas na DLPAG, quando comparado ao grupo controle. Estudos utilizando outros estímulos aversivos, como a exposição ao gato vivo, por exemplo, também mostram a ativação de neurônios nitrérgicos na DPAG de ratos, mostrando a participação destes neurônios, nesta estrutura, no efeito ansiogênico a diferentes estímulos aversivos (GUIMARÃES et al., 2005; BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006b).

Apesar de não existirem trabalhos que utilizem a dupla marcação para Fos e NADPH-d no estudo da abstinência ao etanol, nossos resultados reforçam a hipótese da participação do NO na síndrome de abstinência a substâncias de abuso. Neste sentido, Jhamandas e colaboradores (1996) observaram um aumento na proporção de neurônios NADPH-d positivos ativados no PVH de ratos durante abstinência a morfina, induzida pelo antagonista de receptores opióides, naltrexona. Da mesma forma, hiperatividade de neurônios nitrérgicos da rafe foi detectada após a descontinuação do tratamento crônico com o opióide diacetilmorfina (DYUIZEN et al., 2001). Somado a isto, a administração de AP-7 e CGP37849, antagonistas NMDA, diminui o efeito ansiogênico induzido pela abstinência de etanol em ratos submetidos ao LCE (GATCH et al., 1999) e o uso de inibidores da NOS mostraram

melhoras destes sinais (UZBAY et al., 1997, UZBAY; ERDEN, 2003). De fato, a estimulação da via NMDA/NOS leva ao aumento de GMPc que induz ativação neuronal evidenciada pela expressão de Fos em estruturas em atividade (HABY et al., 1994).

Em conclusão, o presente estudo confirma que a abstinência de etanol de 24h causa um efeito ansiogênico em ratos, evidenciado pela diminuição da atividade locomotora observada no teste do campo aberto, além da ativação de estruturas cerebrais possivelmente relacionadas ao estado de abstinência, tanto em 24 quanto em 48h. Dentre as regiões mapeadas, ocorreu um aumento na ativação de neurônios nitrérgicos na PVH, DLPAG e NDR estendendo as evidências do envolvimento destes neurônios na síndrome de abstinência ao etanol.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. L. et al. Inhibition of the morphine withdrawal syndrome by a nitric oxide synthase inhibitor, Ng-nitro-L-arginine methyl ester. *Life Science*, v. 2, p. 245-249, 1993.
- ADAMS, M. L. et al. Effects of nitric oxide-related agents on alcohol narcosis. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, v. 18, n. 4 p. 969-975, 1994.
- ADAMS, M. L. et al. Nitric oxide-related agents alter alcohol withdrawal in male rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, v. 19, n. 1, p. 195-199, 1995.
- ADAMS, L. M.; CÍCERO, T. J. Alcohol Intoxication and Withdrawal: The Role of Nitric Oxide. *Alcohol*, v. 16, n. 2, p. 153-158, 1997.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV), 4th edition, 2000. Washington DC, *American Psychiatry Association*, 2000.
- BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. *Brain Research Bulletin*, v. 69, 2006a.
- BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-positive neurons after exposure to a live cat. *Behavioral Brain Research*, v. 170, p. 52-61, 2006b.
- BENEVIDES, M. et al. Regulation of tyrosine hydroxylase levels and activity and Fos expression during opioid withdrawal in the hypothalamic PVN and medulla oblongata catecholaminergic cell groups innervating the PVN. *European Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 1, p. 103-112, 2003.
- BERMOND II, D. M.; TOSE H. Consumo de bebidas alcoólicas: interações com o benzeno e outras substâncias de uso ocupacional. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 27, n. 2, 2000.
- BHARGAVA, H. N.; THORAT, S. N. Evidence for a role of nitric oxide of the central nervous system in morphine abstinence syndrome. *Pharmacology*, v. 52, p. 86-91, 1996.
- BHAVE, S. B.; HOFFMAN, P. L. Ethanol Promotes Apoptosis in Cerebellar Granule Cells by Inhibiting the Trophic Effects of NMDA. *Journal of Neurochemistry*, v. 68, n. 2, p. 578-586, 1997.
- BLOTTER, D.; GROZDANOVIC, Z.; GOSSRAU, R. Histochemistry of nitric oxide synthase in the nervous system. *Histochemistry Journal*, v. 27, p. 785-811, 1995.

BOND, N.W.; Di GIUSTO, E.L. Effects of prenatal alcohol consumption on open-field behavior and alcohol preference in rats. *Psychopharmacology*, v. 46, p. 163-165, 1976.

BORLIKOVA, G. G.; LE MERRER, J.; STEPHENS, D. N. Previous experience of ethanol withdrawal-induced c-fos expression in limbic areas, but not withdrawal-induced anxiety and prevents withdrawal-induced elevations in plasma corticosterone. *Psychopharmacology*, n. 185, p.188-200, 2006.

BREDT, D. S. et al. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, v. 347, p. 763-770, 1990.

BREDT, D. S. et al. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, v. 7, n. 4. p. 615-624, 1991.

CABRAL, A. et al. Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG. *Experimental Neurology* v. 200, p. 200-208, 2006.

ÇELIK, T.; ZAGLY, U.; UZBAY, T. Nitric oxide synthase inhibition blocks amphetamine-induced locomotor activity in mice. *Drug Alcohol Dependence*, n. 56, p.109-11, 1999.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico, revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CUELLAR, B. et al. Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal. *Psychopharmacology*, n. 148, p. 66-73, 2000.

DE OLIVEIRA, R. M. M. W. Possível envolvimento do óxido nítrico na modulação das respostas a eventos aversivos. *Tese de doutorado apresentada à Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências*, Ribeirão Preto, 2001.

DEVAUD, L. L.; BARTOO, G.; MALTHANKAR, G. Altered responses to dizocilpine maleate administration in ethanol-withdrawn male and female rats. *Alcohol*, v. 28, p. 83-93, 2002.

DIANA, M. et al. Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 90, n. 17, p. 7966-7969, 1993.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G.; Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-450, 2003.

DYUIZEN, I. V.; MOTAVKIN, P. A.; SHORIN, V. V. Dynamics of NADPH Diaphorase Activity in Raphe Neurons during chronic Treatment with Opiates. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, n. 2, p. 918-920, 2001.

ERDEN, B. F. et al., Dextromethorphan attenuates ethanol withdrawal syndrome in rats. *Pharmacology Biochemistry Behaviour*, v. 62, p. 537-541, 1999.

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

FAVARON M., et al. Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, p. 1983-1987, 1990.

FELDMAN, R.S.; MEYER, J. S.; QUENZER, L. F. Principles of Neuropsychopharmacology. Massachusetts. Sinauer Associates, Inc., Publishers, 1997.

FERNANDES, N.; FERNANDES, V. Criminologia integrada. Revista dos Tribunais. 2 ed. São Paulo. *Toxicomanias*, p. 679-729, 2002.

FILE. S. E.; ANDREWS, N.; AL-FARHAN, M. Anxiogenic responses of rats on withdrawal from chronic ethanol treatment: effects of tianeptine. *Alcohol and Alcoholism Supplement*, v. 28, p. 281-286, 1993.

FILE, S. E.; ZHARKOVSKY, A.; GULATI, K. Effects of baclofen and nitrendipine on ethanol withdrawal responses in the rat. *Neuropharmacology*, v. 30, n. 2, p. 183-190, 1991.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B., Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FONTANESI, L. P. et al. Brainstem areas activated by diazepam withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain Research*, n. 1166, p. 35-46, 2000.

GATCH, M. B.; WALLIS, C. J.; LAL, H. Effects of NMDA Antagonists on Ethanol-Withdrawal Induced "Anxiety" in the Elevated Plus Maze. *Alcohol*, v. 19, n. 3, p. 207-211, 1999.

GHOSH, L., et, al, Calcium regulation of gene expression in neuronal cells, *Journal of Neurobiology*, v. 25, n. 3, p. 294-303, 1994.

GÖREN, M. Z., ET AL. Investigation of Extracellular L-Citruline concentration in the Striatum During Alcohol Withdrawal in Rats. *Neurochemical Research*, v. 26, n. 12, p. 1327-1333, 2001.

GRAEFF, F. G. et al. Role of amygdala and periaqueductal grey in anxiety and panic. *Behaviour Brain Research*, v. 58, p. 123-131, 1993.

GUIMARÃES, F. S. et al., Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, v. 29, p. 1313-1322, 2005.

GUTSTEIN, H. B. et al. Mu and kappa opioid receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuroreport*, n. 9, p. 1777-1781, 1998.

HABY, C. et al., Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and junB in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, v. 64, p. 496-501, 1994.

HERDEGEN, T. K.; LEAH, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB-ATF proteins. *Brain Research Reviews*, v. 28, n. 2, p. 83-107, 1996.

HOPE, B. T., et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings in the National Academy of Science USA*, v. 88, p. 2811-2814, 1991.

INEC - Instituto de Neurociências e Comportamento. Curso: Papel Funcional da Interação Dopamina e Óxido Nítrico no Sistema Nervoso Central. Disponível em: <http://www.inec-usp.org/cursos/cursol/cursol.htm>. Acesso em 10 set, 2009.

JAIN, R.; MUKHERJEE, K.; MOHAN, D. Effects of nitric oxide inhibitors in attenuating nicotine withdrawal in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, n. 88, p. 473-480, 2008.

JAVELLE, N. et al. NO synthase inhibitors attenuate locus coeruleus catecholamine metabolism and behavior induced by morphine withdrawal. *Neuroreport*, v. 13, n. 5, p. 725-728, 2002.

JHAMANDAS, J. H., 1996. Activation of nitric oxide-synthesizing neurons during precipitated morphine withdrawal. *Neuroreport*, v. 7, n. 18, p. 2843-2846, 1996.

JUNG, M. E.; WALLIS, C. J.; GATCH, M. B.; LAL, H. Abecarnil and alprazolam reverse anxiety-like behaviors induced by ethanol withdrawal. *Alcohol*, v. 21, p. 161-168, 2000.

KNAPP, D. J. et al. Induction of Fos-Like Proteins and Ultrasonic Vocalizations during Ethanol Withdrawal: Further Evidence for Withdrawal-Induced Anxiety. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 22, n. 2, p. 481-483, 1998.

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

KOOB, G. F.; NESTLER, E. J. The neurobiology of drug addiction. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 9, p. 482-497, 1997.

KOPROWSKI, H. et al. In vivo expression of inducible oxide nitric synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 90, p. 3024-3027, 1993.

KRUIJER, W.; SHUBERT D.; VERNA I. M. Induction of the proto-oncogene by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, p. 7330-7334, 1985.

LE DOUX, J. E. Emotion. In: *Handbook of Physiology* (Montcastle, V. V. Plum, F.; Geiser, S. R. eds.), Bethesda, p. 419-460, 1987.

LEITE, M. C. P. Alcoolismo – Dependência do álcool. *Informedicals Policlin*. Disponível em: <http://www.policlin.com.br/drpoli/061/>. Acesso em 12 nov, 2009.

LEZA, J. C. et al. Correlation between brain nitric oxide synthase activity and opiate withdrawal. *Naunyn Schmiedebergs Archive Pharmacology*, n. 353, p. 349-354, 1996.

LOFTIS, J. M.; JANOWSKY, A. Regulation of NMDA Receptor Subunits and Nitric Oxide Synthase Expression During Cocaine Withdrawal. *Journal of Neurochemistry*, v. 75, n. 5, 2000.

LUNDBERG, J. O. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nature Medicine*, n. 1, p. 370-373, 1995.

MALIN, D. H. et. al. The nitric oxide synthesis inhibitor nitro-L-arginine (L-NNA) attenuates nicotine abstinence syndrome in the rat, *Pharmacology*, n. 140, p. 371-377, 1998.

MAYER, B. et al. Brain nitric oxide synthase is a biopterin - and flavin - containing multi-functional oxido - reductase. *FEBS Letters*, v. 288, p. 187-191, 1991.

MATSUMOTO, I. Immediate Early Gene Expression in the Rat Brain during Ethanol Withdrawal. *Molecular and Cellular Neurosciences*, v. 4, p. 485-491, 1993.

MEERT, T. F. et al., Quantification of tremor sensitivity and inhibition of exploratory behaviour during alcohol withdrawal in rats. *Behavioural Pharmacology*, v. 3, n. 6, p. 601-607, 1992.

MEHTA, A. K.; TICKU, M. K. Ethanol- and diazepam-withdrawal hyperlocomotion is not due to 5-HT₃ receptor stimulation. *Pharmacology Biochemistry Behaviour*, v. 45, p. 755-757, 1993

MILDE-LANGOSCH, K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *European Journal of Cancer*, v. 41, n. 16, p. 2449-2461, 2005.

MOLLACE, V. et al., Nitric oxide from vascular smooth muscle cells: regulation of platelet reactivity and smooth muscle cell guanylate cyclase. *British journal of pharmacology*, v. 104, n. 3, p. 633-638, 1991.

MONCADA, S. et al. Endothelium-derived relaxing factor : identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochemistry Pharmacology*, n. 37, p. 2495-501, 1988.

- MORALES, M. et al. Acute ethanol reduces c-fos immunoreactivity in GABAergic neurons of the central nucleus of the amygdala. *Brain Research*, n. 798, p. 333-336, 1998.
- MORI, T. et. al. Comparison of nitric oxide synthase inhibitors, phospholipase A2 inhibitor and free radical scavengers as attenuators of opioid withdrawal syndrome. *Behavioral Pharmacology*, v. 18, n. 8, p. 725-729. 2007.
- MOY, S. S.; KNAPP, D. J.; DUNCAN, G. E. Enhanced ultrasonic vocalization and Fos protein expression following ethanol withdrawal: effects of flumazenil. *Psychopharmacology*, n. 152, p. 208-215, 2000.
- NEVO, I.; HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochemistry International*, v. 26, n. 4, p. 305-336, 1995.
- NUTT, D. et al. Alpha-2-adrenoceptor function in alcohol withdrawal: a pilot study of the effects of iv, clonidine in alcoholics and normals. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, v. 12, n. 1, p. 292-296, 1988.
- OVTCHAROFF, W.; BOZHILOVA-PASTIROVA, A.; CHRISTOVA, T. Postnatal development of neurons expressing NADPH-diaphorase and parvalbumin in the parietal cortex of male and female rats. *Acta Histochemistry*, v. 104, n. 1, p. 23-28, 2002.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3rd. *Academic Press*, San Diego, CA, 1997.
- PEREGUD, D. I. et. al. Nitric oxide synthase activity and nitrates/nitrites level in brain regions during the spontaneous morphine withdrawal in rats. *Biomeditsinskaia Khimiia*, v. 53, n. 4, p. 352-363, 2006.
- PEREGUD, D. I. et. al. Anxiety level during morphine abstinence correlates with status of nitrgergic system in the rat hippocampus. *Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal Imeni Sechenova*, v. 93, n. 4, p. 357-365, 2007.
- POHORECHY, L. A.; BRICK, J. Pharmacology of ethanol. In *Psychotropic Drugs of Abuse*. *Pergamum Press*, Nova York, p. 189-281, 1990.
- PRATHER, P. L. REZAZADEH, S. M.; LAL, H. Mianserin in the treatment of ethanol withdrawal in the rat: prevention of behaviors indicative of anxiety. *Psychopharmacology Bulletin*, v. 27, p. 285-289, 1991.
- PRZEGALINSKI, E., FILIP, M. Nitric oxide (NO) pathway and locomotor hyperactivity towards dopaminomimetics in rats. *Polish Journal of Pharmacology*, n. 49, p. 291-298, 1997.
- PUTZKE, J. The anti-craving drug acamprosato reduces c-Fos expression in rats undergoing ethanol withdrawal. *European Journal of Pharmacology*, n. 317, p. 39-48, 1996.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. *Química Nova*, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 284-290, 1999.

RADI, R. et al., Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, v. 288, p. 481-487, 1991.

RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, v. 10-16, n. 306, p. 174-176, 1983.

RASMUSSEN, D. D. et al., Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, n. 25, p. 999-1005, 2001.

REUSS, S. et al. Nitric oxide synthase in the hypothalamic supraoptic nucleus of rat: evidence from histochemistry and western blot; and colocalization with VIP. *Brain Research*, v. 695, n. 2, p. 257-262, 1995.

RIPLEY, T. L.; DUNWORTH, S. J.; STEPHENS, D. N. Effect of CGP39551 administration on the kindling of ethanol-withdrawal seizures. *Psychopharmacology*, n. 163, p. 157-165, 2002.

SAGLAM, E. et al. Escitalopram increases cortical nitric oxide synthase (NOS) in rat brain during ethanol withdrawal. *Nitric Oxide*, n. 19, p. 284-288, 2008.

SASSONE-CORSI, P. et al, induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes and Development*, v. 2, n. 12A, p. 1529-1538, 1988.

SCHUMAN, E. M., MADISON D. V. Nitric oxide and synaptic function. *Annual Review of Neuroscience*, v. 17, p. 153-183, 1994

SILVA, C. J.; GARBE, G. G. Animações em dependência química. Disponível em: (<http://www.virtual.epm.br/material/depquim/4aflash.htm>). Acesso em 16 set, 2009.

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, v.266, n. 5, p. 68-77, 1992.

STAHL, S. M. *Psicofarmacologia – Base Neurocientífica e Aplicações Práticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 2ª Ed, 2006.

TODA, M. N. D. et al. Modulation of Opioid Actions by Nitric Oxide Signaling. *Anesthesiology*, n. 110, p.166-188, 2009.

TSAI, G. E. et al. Increased glutamatergic neurotransmission and oxidative stress after alcohol withdrawal. *American Journal of Psychiatry*, v. 59, n. 7, p. 985-993, 2007.

UZBAY, T.; et al. Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats. *Life Sciences*, v. 61, n. 22, p. 2197-2209, 1997.

UZBAY, I. T. L-NAME precipitates catatonia during ethanol withdrawal in rats. *Behavioural Brain Research*, n. 119, p. 71-76, 2001.

UZBAY, I. T.; OGLESBY, M. W. Nitric Oxide and substance dependence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 25. p. 43-52, 2001.

UZBAY, T.; ERDEN. B. F. Attenuation of ethanol signs by high doses of l-arginine in rats. *Alcohol and Alcoholism*, v. 38, p. 213-218, 2003.

VIEIRA, D. L. Riscos do consumo de bebidas alcoólicas. Disponível em: <http://www.idmed.com.br/bemestarMateria.php?sessao=bemestar&topico=1&materia=131>. Acesso em 02 nov, 2009.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, v. 46, p. 755-794, 1992.

WEISS, F. et al. Ethanol Self-Administration Restores Withdrawal-Associated Deficiencies in Accumbal Dopamine and 5-Hydroxytryptamine Release in Dependent Rats. *Journal of Neuroscience*, v. 16, n. 10, p. 3474-3485, 1996.

WILCE, P. et al. Gene expression during ethanol withdrawal. *Alcohol and Alcoholism Supplement*, v. 2, p. 97-102, 1994.

WILSON, J.; WATSON, W. P.; LITTLE H. J. CCK(B) antagonists protect against anxiety-related behaviour produced by ethanol withdrawal, measured using the elevated plus maze. *Psychopharmacology*, n. 137, p. 120-131, 1998.

XAVIER, G. F. Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso. São Paulo: Plêiade, p. 238, 1999.

YUKSEL, N. et al. Increased serum nitrite/nitrate (NOx) and malondialdehyde (MDA) levels during alcohol withdrawal in alcoholic patients. *Pharmacopsychiatry*, v. 38, n. 2, p. 95-96, 2005.