



Universidade Estadual de Maringá  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Farmácia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



# EFEITOS DA INTOXICAÇÃO E ABSTINÊNCIA DE ETANOL SOBRE OS PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS EM REGIÕES MESENFÁLICAS RELACIONADAS À ANSIEDADE EM RATOS

VÍVIAN TACIANY BONASSOLI

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira (UEM/DFT)

Maringá, 2014

VIVIAN TACIANY BONASSOLI

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO E ABSTINÊNCIA DE ETANOL SOBRE  
OS PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS EM REGIÕES  
MESENCEFÁLICAS RELACIONADAS À ANSIEDADE EM RATOS**

Tese 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 para obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira

MARINGÁ, 2014

Vívian Taciany Bonassoli

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO E ABSTINÊNCIA DE ETANOL SOBRE OS PARÂMETROS  
NEUROINFLAMATÓRIOS EM REGIÕES MESENCÉFÁLICAS RELACIONADAS À  
ANSIEDADE EM RATOS**

Tese 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 para obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira  
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Beijamini Harres  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Marques Bolonheis de Campos  
Faculdade Ingá

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Célia Regina Ambiel Silva  
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ciomar aparecida Bessani Amado  
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

**DEDICATÓRIA**

À minha mãe,  
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 decisões.

Às minhas tias Cida, Rosinha e Lenis, que nos momentos mais difíceis assumiram minhas obrigações como filha para que eu pudesse me dedicar a este trabalho.

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, esforço e paciência, que tornaram possível a realização deste trabalho.

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

A todos os amigos pós-graduandos e graduandos do laboratório: Angélica, Cássia, Marco Aurélio, Emilene, Lígia, Jacqueline, Janaína, Gislene, Cristiano, Erika, Jéssica, Letícia, Mônica, Manuela, pelos bons momentos que passamos juntos e pelo ótimo convívio durante este tempo.

Ao agora médico, Dr. Ewandro Contardi, por sua colaboração na realização dos experimentos durante seu período de graduação.

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.

Às Professoras Dr<sup>a</sup> Vanessa Beijamini Harres, Dr<sup>a</sup> Simone Marques Bolonheis de Campos, Dr<sup>a</sup> Célia Regina Ambiel Silva e Dr<sup>a</sup> Ciomar Aparecida Bessani Amado, que aceitaram, gentilmente, compor a banca de defesa desta tese.

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

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADRO

FIGURA 1: Via dopaminérgica mesolímbica.....	18
FIGURA 2: Biossíntese de NO.....	21
FIGURA 3: Síntese de NO a partir da nNOS.....	22
FIGURA 4: Síntese de NO a partir da eNOS.....	23
FIGURA 5: Síntese de NO a partir da iNOS.....	24
FIGURA 6: Diagrama representativo da SCPDL.....	29
FIGURA 7: Fotografia representativa da caixa claro/escuro.....	42
FIGURA 8: Fotografia representativa do campo aberto.....	42
FIGURA 9: Diagramas representativos das estruturas analisadas.....	44
FIGURA 10: Distribuição das amostras para dosagem de citocinas.....	49
FIGURA 11: Efeitos da administração sistêmica de 1400W sobre a ansiedade induzida pela abstinência de etanol testada na caixa claro/escuro.....	51
FIGURA 12: Efeito da administração sistêmica de 1400W sobre a atividade locomotora na abstinência testada no campo aberto.....	52
FIGURA 13: Expressão de OX-42 na SCPDL e NDR de ratos durante a intoxicação e abstinência de etanol.....	54
FIGURA 14: Expressão de iNOS na SCPDL e NDR de ratos durante a intoxicação e abstinência de etanol.....	53
FIGURA 15: Efeito da abstinência de etanol sobre a ansiedade testada na caixa claro/escuro.....	71
FIGURA 16: Diagramas representativos dos sítios de micro injeção e fotomicrografias da SCPDL.....	72
FIGURA 17: Efeitos do Carboxi-PTIO administrado na SCPDL de ratos abstinentes de etanol testados na caixa claro/escuro.....	73
FIGURA 18: Efeito da L-NAME e do L-NAME + Sal ou L-Arg administrados na SCPDL de ratos abstinentes de etanol testados na caixa claro/escuro.....	76
FIGURA 19: Efeitos do TRIM administrado na SCPDL de ratos abstinentes de etanol testados na caixa claro/escuro.....	77
FIGURA 20: Efeitos do 1400W administrado na SCPDL de ratos abstinentes de etanol testados na caixa claro/escuro.....	78
TABELA 1: Resultados da quantificação dos níveis de citocinas non mesencéfalo de ratos durante intoxicação e abstinência de etanol.....	55

TABELA 2: Efeitos dos agentes que interagem com NO administrados na SCPDL sobre a atividade locomotora de ratos abstinentes de etanol testados no campo aberto.....74

QUADRO 1: Esquema representativo das análises realizadas.....43

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>7-NI</b> – 7-Nitroindazol	<b>NE</b> – norepinefrina
<b>ABC</b> – Avidina biotina peroxidase	<b>NFkB</b> – <i>Nuclear Factor kappa B</i>
<b>ADMA</b> – Dimetil L-Arginina	<b>NMDA</b> – N-metil-D-aspartato
<b>BZD</b> - Benzodiazepínicos	<b>nNOS</b> – Óxido nítrico sintase neuronal
<b>Ca<sup>2+</sup></b> - Cálcio	<b>NO</b> – Óxido nítrico
<b>Ca/M</b> – Cálcio/Calmodulina	<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> – Nitrito
<b>CeA</b> – Amígdala central	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> – Nitrato
<b>Cl<sup>-</sup></b> - Cloro	<b>NOS</b> – Óxido nítrico sintase
<b>COX-2</b> – Ciclooxygenase tipo 2	<b>RNAm</b> – Ácido ribonucleico mensageiro
<b>CR3</b> - Receptor C3	<b>SCP</b> – Substância cinzenta periaquedutal
<b>CSE</b> – Concentração sanguínea de etanol	<b>SNC</b> – Sistema nervoso central
<b>DA</b> – Dopamina	<b>SCPDL</b> – Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral
<b>DNA</b> – Ácido desoxirribonucléico	<b>TLR</b> – <i>toll like receptor</i>
<b>DMC</b> – Complexo vagal dorsal	<b>TNF-α</b> – Fator de necrose tumoral alfa
<b>DOI</b> – Densidade óptica integrada	<b>5-HT</b> - Serotonina
<b>DSM-V</b> – Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais - Quinta Edição	
<b>EPM</b> – Erro padrão da média	
<b>Fe</b> - Ferro	
<b>eNOS</b> – Óxido nítrico sintase endotelial	
<b>GABA</b> – Ácido gama amino butírico	
<b>GLU</b> – Glutamato	
<b>GM-CSF</b> - <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>	
<b>GMPc</b> – Guanidina monofosfato cíclico	
<b>IL</b> – Interleucina	
<b>INF γ</b> – Interferon gama	
<b>iNOS</b> – Óxido nítrico sintase induzida	
<b>L-Arg</b> – L-Arginina	
<b>LCE</b> – Labirinto em cruz elevado	
<b>LPS</b> – Lipopolissacarídeo bacteriano	
<b>L-NAME</b> – N(g)-nitroarginina metil éster	
<b>NAc</b> – Núcleo <i>Accumbens</i>	
<b>NADPH-d</b> – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – diaforase	
<b>NDR</b> – Núcleo dorsal da rafe	

**BONASSOLI, VT 2014. Efeitos da intoxicação e abstinência de etanol sobre os parâmetros neuroinflamatórios em regiões mesencefálicas relacionadas à ansiedade em ratos. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 115p.**

**Resumo:** O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos da intoxicação e abstinência de etanol sobre parâmetros neuroinflamatórios na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SPCDL) e núcleo dorsal da rafe (NDR) de ratos, bem como avaliar os efeitos da inibição da óxido nítrico sintase (NOS) sobre a ansiedade decorrente da abstinência. No primeiro capítulo foram investigados os efeitos da intoxicação e abstinência de etanol sobre a ativação microglial e expressão de NOS induzida (iNOS) na SCPDL e NDR, os níveis de citocinas no mesencéfalo e os efeitos da administração sistêmica do inibidor seletivo da iNOS, diidroclorato de N-([3-(aminometil) fenil] metil) etanimidamida (1400W), sobre o comportamento tipo ansioso na abstinência de etanol. Ratos Wistar machos receberam uma dieta líquida contendo etanol 6-8 % (v/v) por 15 dias como única fonte de alimento e foram submetidos aos testes comportamentais imediatamente após última exposição (intoxicado) ou 24 h após a descontinuação do etanol (Abst). O grupo controle recebeu a mesma dieta sem etanol, mas acrescida de sacarose para o balanço energético. Três dias antes do fim da exposição à dieta iniciou-se a administração de salina *i.p* para os grupos controle e intoxicado; e salina ou 1400W para o grupo abstinente que foi subdividido em 4 subgrupos: Abst+Sal; Abst+1400W 0,75; 1,5 ou 3,0 µg/kg. Os tratamentos continuaram até o dia dos testes comportamentais os quais foram realizados na caixa claro/escuro e campo aberto. A expressão de OX-42, indicador de ativação microglial, e de iNOS foi avaliada na SCPDL e NDR por imunohistoquímica e os níveis de citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e GM-CSF) foram dosados no mesencéfalo pela técnica Luminex™ xMAP. Os animais abstinentes (Abst+Sal) apresentaram um efeito tipo ansiogênicos comparado com o controle. O tratamento com 1400W 1,5µg/kg diminuiu os efeitos tipo-ansiogênicos da abstinência de etanol. O grupo intoxicado apresentou um aumento na expressão de OX-42 e iNOS na SCPDL e NDR; enquanto o grupo Abst+Sal apresentou aumento apenas de OX-42 nas duas estruturas, quando comparado com o controle. O tratamento com 1400W não alterou a expressão de OX-42 ou iNOS comparado com o grupo Abst+Sal. Os níveis de citocinas não foram alterados em nenhum dos grupos experimentais testados. Estes resultados sugerem que a intoxicação por etanol induz um estado inflamatório na SCPDL e NDR, o que pode estar relacionado com a manifestação do comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência. No segundo capítulo foi investigada a hipótese de que o óxido nítrico (NO) na SCPDL estaria envolvido na expressão do comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência de etanol. Ratos Wistar machos receberam uma dieta líquida contendo etanol 6-8 % (v/v) por 15 dias como única fonte de alimento e seis dias antes do fim da exposição tiveram uma cânula guia implantada diretamente na SCPDL. Vinte e quatro horas após o fim da exposição ao etanol, os animais receberam microinjeções do sequestrador de NO 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxil-3-óxido (carboxi-PTIO), do inibidor não seletivo da NOS N-G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), do inibidor seletivo para NOS neuronal (nNOS) 1-(2-trifluorometil] fenil) imidazol (TRIM), do inibidor seletivo iNOS, 1400W, ou de salina na SCPDL. Dez minutos depois os animais foram avaliados na caixa claro/escuro e campo aberto. Carboxi-PTIO (1 nmol), L-NAME (200 nmol), TRIM (20 nmol), e 1400W (0,3 e 1 nmol) diminuíram os efeitos tipo-ansiogênicos da abstinência de etanol em ratos avaliados na caixa claro escuro. O precursor de NO L-Arginina reverteu os efeitos do L-NAME. Estes resultados indicam que a produção de NO na SCPDL desempenha um papel na modulação do comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência de etanol em ratos.

**Palavras chave:** Etanol, intoxicação, abstinência, neuroinflamação, ansiedade, óxido nítrico, ratos.

**Bonassoli, VT 2014. Effects of ethanol intoxication and withdrawal on neuroinflammatory parameters in anxiety-related midbrain areas in rats. PhD Thesis, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 115p.**

**Abstract:** This study was aimed to investigate the effects of ethanol intoxication and withdrawal on neuroinflammatory parameters in dorsolateral periaqueductal gray matter (DLPAG) and dorsal raphe nucleus (DRN) in rats, as well to evaluate the effects of nitric oxide synthase (NOS) inhibition on ethanol withdrawal-induced anxiety. In the first chapter, we investigated whether the effects of ethanol intoxication and withdrawal on microglial activation and NOS inducible (iNOS) expression in DLPAG and DRN; cytokines levels in midbrain and effects of iNOS inhibitor, N-([3-(aminomethyl)phenyl] methyl) ethanimidamide dihydrochloride (1400W) on ethanol withdrawal-induced anxiety-like behaviour. Male Wistar rats were forced to consume a liquid diet containing ethanol 6–8 % (v/v) for 15 days as their only source of diet, then their behavior were tested immediately after last exposure (intoxicated) or 24 h ethanol withdrawal (WD). The control group received the same diet with sucrose instead ethanol for energetic balance. Three days before diet exposure ends, started treatment with (Sal) *i.p.* for intoxicated and control groups; and Sal or 1400W for withdrawn group (WD), which was subdivided in 4 subgroups: WD+Sal, WD+1400W 0,75; 1,5 or 3,0 µg/kg. The treatment persisted until testing day. OX-42 and iNOS expression were evaluated by immunohistochemistry and cytokines levels (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e GM-CSF) were analyzed by Luminex™ xMAP. Ethanol withdrawal (WD+Sal) promoted an angiogenic-like effect compared to control. Treatment with 1400W 1,5 µg/kg decreased the angiogenic-like effect induced by ethanol withdrawal. Intoxicated group showed OX-42 and iNOS expression increased, while WD+Sal showed only OX-42 increased in both regions compared with control. 1400W administration did not alter OX-42 or iNOS. Cytokine levels were not altered in any experimental groups. These results suggest ethanol intoxication promotes an inflammatory state in DLPAG and DRN, which may be related with ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior. In the second chapter, we investigated whether nitric oxide (NO) in the DLPAG is involved in the expression of ethanol withdrawal-induced anxiety-like behaviour. Male Wistar rats were implanted with guide cannulae aimed at the DLPAG. The animals were forced to consume a liquid diet containing ethanol 6–8 % (v/v) for 15 days as their only source of diet. Six days after surgery and 24 h after ethanol discontinuation, the animals received microinjections of the NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (carboxy-PTIO), nonselective nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 1-(2-trifluoromethyl)phenyl) imidazole (TRIM), selective inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor N-([3-(aminomethyl)phenyl] methyl) ethanimidamide dihydrochloride (1400W) or saline into the DL PAG. Ten minutes later, the animals were tested in the light/dark box and open field. Carboxy-PTIO (1 nmol), L-NAME (200 nmol), TRIM (20 nmol), and 1400W (0,3 and 1 nmol) decreased the angiogenic-like effects of ethanol withdrawal in rats in the light/dark box test. The NO precursor L-arginine reversed the effects of L-NAME. These results suggest NO production in the DLPAG may play a role in the modulation of ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior in rats. Furthermore, iNOS-mediated NO synthesis in the DLPAG is predominantly involved in the behavioral expression of anxiety-like behavior during ethanol withdrawal.

**Keywords:** Ethanol, intoxication, withdrawal, neuroinflammation, anxiety, nitric oxide, rats.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	14
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>EFEITOS DA INTOXICAÇÃO E ABSTINÊNCIA DE ETANOL SOBRE PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS EM REGIÕES MESENCEFÁLICAS RELACIONADAS À ANSIEDADE</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	<b>39</b>
2.1 ANIMAIS.....	39
2.2 ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL.....	39
2.3 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DE ETANOL.....	40
2.4 DROGA.....	40
2.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	40
2.6 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	41
2.6.1 <b>Caixa claro/escuro</b> .....	41
2.6.2 <b>Campo aberto</b> .....	42
2.7 PERFUSÃO.....	43
2.8 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	44
2.8.1 <b>Estruturas cerebrais analisadas</b> .....	44
2.8.2 <b>Técnica</b> .....	45
2.8.3 <b>Quantificação</b> .....	46
2.9 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	47
2.9.1 <b>Coleta da amostra</b> .....	48
2.9.2 <b>Técnica</b> .....	48
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
3.1 CONSUMO DE ETANOL.....	50
3.2 PESO CORPORAL.....	50
3.3 DOSAGEM DAS CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DE ETANOL.....	50
3.4 EFEITOS COMPORTAMENTAIS.....	50
3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	52
3.6 CITOCINAS.....	55
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>

## CAPITULO II

### EFEITOS DA INIBIÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERISQUEDUTAL DORSOLATERAL SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO INDUZIDO PELA ABSTINÊNCIA DE ETANOL EM RATOS

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	63
<b>2 MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	66
2.1 ANIMAIS.....	66
2.2 DROGA.....	66
2.3 ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL.....	66
2.4 CIRURGIA E ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS.....	67
2.5 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	68
2.5.1 <b>Caixa claro/escuro</b> .....	68
2.5.2 <b>Campo aberto</b> .....	68
2.6 HISTOLOGIA.....	69
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
<b>3 RESULTADOS</b> .....	70
3.1 CONSUMO DE ETANOL.....	70
3.2 PADRONIZAÇÃO DO MODELO COMPORTAMENTAL.....	70
3.3 EFEITOS COMPORTAMENTAIS DE DROGAS QUE ATUAM NOS SISTEMAS NITRÉRGICOS.....	72
3.3.1 <b>Carboxi-PTIO</b> .....	72
3.3.2 <b>L-NAME e L-Arg</b> .....	75
3.3.3 <b>TRIM</b> .....	77
3.3.4 <b>1400W</b> .....	78
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	79
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	84
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	86
<b>ANEXO</b> .....	105

## **INTRODUÇÃO GERAL**

---

Do uso social ao problemático, o etanol é a droga de abuso mais consumida no mundo. Os primeiros indícios do consumo humano de bebidas alcoólicas advêm do início da História, com registros datados de aproximadamente 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 etanol 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 etanol sofre restrições que tentam controlar ou prevenir o seu uso indevido.

A cada ano, cerca de 2 bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas, o que corresponde a aproximadamente 40% da população mundial acima de 15 anos (ANTHONY, 2009). No Brasil, aproximadamente 12% da população tem problemas com o uso indevido de etanol, o que gera custos para o Estado, além de prejuízos para o próprio indivíduo e a sociedade, representando, em termos nacionais, um dos maiores problemas de saúde pública (CARLINI et al., 2005).

O uso abusivo desta substância é um dos principais fatores que contribuem para a diminuição da saúde da população mundial, sendo responsável por 3,2% de todas as mortes (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Os custos anuais associados à ingestão maciça de etanol e os problemas subsequentes foram estimados em 185 bilhões de dólares nos Estados Unidos, onde esta droga contribui para cerca de 100.000 mortes por ano (REHM; GNAM; POPOVA, 2007). Estudos estimam que o Brasil gaste, anualmente, 7,3% de seu Produto Interno Bruto (PIB) com consequências de problemas relacionados ao etanol – desde o tratamento das condições médicas até a perda da produtividade decorrentes do seu uso (GALLASSI et al., 2008). Desse modo, a prestação de serviços médicos de qualidade é profundamente afetada pelo consumo de etanol, sendo este responsável por grande parte dos recursos financeiros dispendidos com a assistência à saúde (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Os efeitos do etanol no organismo dependem de uma série de fatores, como quantidade consumida num determinado período de tempo, tipo de bebida, sexo, idade, peso, condições físicas e psíquicas, presença de alimentos no estômago, combinação com outras substâncias e desenvolvimento de tolerância (VIEIRA, 2009).

Alguns estudos indicam que o consumo leve a moderado de etanol exerce um efeito protetor contra doenças cardiovasculares, diminuindo o risco de morte por doenças coronarianas (CHIVA-BLANCH et al., 2013). No entanto, o consumo de grandes quantidades está associado a inúmeras consequências sociais e para a saúde, que podem superar o seu benefício (BRASIL, 2007).

A transição do beber moderado ao beber problemático ocorre de forma lenta, tendo uma interface que, em geral, leva vários anos. O consumo excessivo e prolongado de bebidas alcoólicas leva ao estado de dependência conhecida como alcoolismo ou etilismo, que se caracteriza como um estado fisiológico de neuroadaptação produzido pela administração repetida, exigindo administração contínua da droga para evitar a ocorrência de síndrome de abstinência (STAHL, 2006; LEITE, 2014).

Segundo o que a *American Psychiatry Association* (2013) define no Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais - Quinta Edição (DSM-V), o indivíduo que apresentar dois ou mais dos onze sintomas mostrados abaixo, em um período de 12 meses, pode ser diagnosticado como dependente de álcool, de acordo com a seguinte classificação:

- Dependência leve: presença de dois ou três dos onze critérios por um período de um ano;
- Dependência moderada: presença de quatro ou cinco dos onze critérios por um período de um ano;
- Dependência grave: presença de mais de seis dos onze critérios por um período de um ano.

Os 11 critérios são:

1. *Consumo da substância frequentemente em grandes quantidades, ou por período maior do que o intencionado;*
2. *Um desejo persistente ou esforço sem sucesso de diminuir ou controlar o uso da substância;*
3. *Grandes períodos de tempo utilizados em atividades necessárias para obter a substância, usá-la ou recuperar-se de seus efeitos;*
4. *Fissura (craving), ou um forte desejo de consumir álcool;*
5. *Uso recorrente resultando em incapacidade de cumprir obrigações importantes no trabalho, na escola ou em casa;*
6. *Uso continuado, apesar de problemas sociais e interpessoais persistentes ou recorrentes, causados ou exacerbados pelos efeitos do álcool.*
7. *Redução ou abandono de atividades sociais, recreacionais ou ocupacionais por causa do uso da substância;*
8. *Utilização recorrente em situações de exposição a risco;*
9. *Uso continuado da substância, apesar do conhecimento de ter um problema físico ou psicológico recorrente que tenha sido causado ou exacerbado pela mesma;*

10. *Tolerância, definida por qualquer uma das seguintes opções:*

*a) Necessidade de doses cada vez maiores para se obter os efeitos observados com a dose usada originalmente.*

*b) Efeito acentuadamente diminuído com o uso continuado da mesma quantidade de álcool.*

11. *Abstinência, manifestada por qualquer um dos seguintes critérios:*

*a) Síndrome de abstinência característica para álcool;*

*b) Álcool (ou uma substância estreitamente relacionada, tal como um benzodiazepínico) alivia ou evita sintomas de abstinência.*

### **Aspectos farmacológicos**

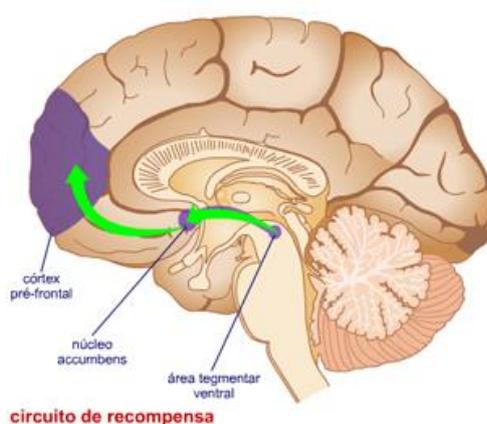
Após a administração oral, o etanol é rapidamente absorvido no estômago e no intestino delgado e se distribui na água corporal total (0,5 - 0,7 L/kg). Os níveis sanguíneos máximos ocorrem cerca de 30 minutos após o consumo, quando ingerido em jejum (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Durante o consumo, esta substância potencializa a neurotransmissão inibitória do ácido gama-amino butírico (GABA) mediada por receptores do tipo GABA<sub>A</sub>, acoplados à canais de cloro (Cl<sup>-</sup>), aumentando a condutância deste íon, o que provoca inibição pós-sináptica por meio da diminuição transitória do potencial de membrana.

O efeito do etanol sobre a neurotransmissão excitatória ocorre pela inibição de receptores de glutamato (GLU) do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), e cálcio, bem como dos canais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) voltagem dependentes. A ativação de receptores GABA<sub>A</sub> 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 etanol reduzam a excitabilidade neuronal durante o consumo agudo, entretanto, o consumo crônico aumenta a densidade de receptores NMDA e canais de Ca<sup>2+</sup>, além de diminuir a função dos receptores GABA<sub>A</sub>. Assim, essas mudanças levam ao aumento da excitabilidade pela ativação excessiva do receptor NMDA quando a administração da substância é interrompida, desencadeando os sinais da síndrome de abstinência que podem incluir convulsões e até óbito se não tratada a tempo. (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997). Por outro lado, a administração de antagonistas deste receptor durante a abstinência, diminuiu o comportamento tipo ansioso apresentado por ratos abstinentes no labirinto em cruz elevado (LCE). Estes antagonistas são utilizados na clínica, sendo indicados na prevenção de recaídas (KOTLINSKA; BOCHENSKI; 2008).

Em doses baixas, o etanol provoca desinibição, euforia, sensação de relaxamento e bem-estar. Esses efeitos sugerem que ele 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 efeito que as mudanças nos sistemas GABA e GLU exercem sobre a liberação de dopamina (DA) na via mesolímbica, que se projeta da área tegmentar ventral para o núcleo *accumbens* (NAc) (Figura 1). A liberação de DA nesta via tem sido relacionada à sensação de prazer obtida com o consumo de etanol ou outras drogas de abuso (KOOB; NESTLER, 1997; STAHL, 2006).



**Figura 1:** Via dopaminérgica mesolímbica. Fonte: SILVA; GARBE, 2014.

Estudos demonstram que a serotonina (5-HT) exerce ação moduladora da atividade de neurônios dopaminérgicos que fazem sinapse no NAc. Sabe-se que o consumo repetido de etanol inibe o *clearance* de 5-HT, resultando em estimulação da atividade serotoninérgica (DAWS et al., 2006). Neste sentido, vários autores têm descrito o envolvimento da 5-HT no efeito motivacional do consumo de etanol, uma vez que a inibição da recaptção deste neurotransmissor pela fluoxetina leva à diminuição no consumo voluntário de etanol por ratos, enquanto que a destruição de neurônios 5-HT pela 5-7-diidroxitriptamina aumenta o consumo da substância (NEVO; HAMON, 1995; WEISS et al., 1996; SIMON et al., 2001; STAHL, 2006).

O reforço positivo obtido com o uso do etanol também se deve à indução da liberação de opióides endógenos. O bloqueio de receptores opióides com naltrexona em humanos dependentes faz com que o opióide liberado não resulte em prazer, diminuindo assim a “fissura” pelo etanol (STAHL, 2006; RÖSNER, 2010).

A norepinefrina (NE) também parece estar envolvida na dependência e abstinência alcoólica. O consumo agudo de etanol leva a um aumento na síntese de NE e conversão à epinefrina, sendo este efeito induzido diretamente pelo etanol, ou mediado pelo efeito estressor geral causado pelo consumo desta substância. O consumo crônico leva à hipoatividade de receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos devido à neuroadaptação (*down regulation*). Esses receptores controlam, por retroalimentação, a liberação de monoaminas na fenda sináptica, e, se não funcionam, a liberação é excessiva, resultando em manifestações características da atividade simpática, como tremores e taquicardia (ZALENSKI et al., 2004).

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 em humanos tem início de 6 a 24 h após o último consumo e seus sinais e sintomas incluem o anseio pela substância ou “*fissura*”, além de ansiedade, tremor, irritabilidade, náuseas, taquicardia, distorções da percepção, agitação, alucinações, convulsões e *delirium tremens* (MUNCIE; YASINIAN; OGE, 2013). Estes sintomas, muitas vezes, fazem com que o indivíduo volte a usar a substância não mais pelo prazer que ela proporciona, mas para amenizar os efeitos aversivos experimentados na abstinência, o que constitui um grande obstáculo no tratamento clínico do alcoolismo, estando associado à recaída de etilistas abstêmios (BRASIL, 2007).

As alterações neurobiológicas ocorridas durante a abstinência de etanol incluem ações contrárias às observadas com o consumo crônico, como diminuição de atividade gabaérgica, aumento de atividade glutamatérgica, e hiperatividade de receptores adrenérgicos, relacionadas aos sintomas excitatórios. Além disso, uma diminuição de DA e 5-HT no NAc também foi observada, o que possivelmente está relacionada a sintomas como disforia e aumento da ansiedade, observados durante a abstinência (WEISS et al., 1996; KOOB; LE MOAL, 1997; TSAI et al., 2007).

Além da participação de neurotransmissores clássicos, o óxido nítrico (NO) também parece estar envolvido na abstinência de etanol e de outras drogas capazes de causar dependência. Estudos 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).

## **Óxido nítrico**

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. Esta 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). Sua estrutura química é extremamente lábil, apresentando meia vida de 1 a 10 segundos antes de ser convertido a nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ) pela ação do oxigênio e da água (SNYDER; BREDT, 1992). Por ser pouco solúvel em água e muito solúvel em solventes apolares, 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, sendo sintetizado pelas células endoteliais, células de defesa e certos grupos neuronais. Entre as diversas funções exercidas pelo NO no organismo, destaca-se seu papel no sistema nervoso central (SNC), onde influencia a atividade comportamental, a formação da memória e intensifica respostas a estímulos de dor (INEC, 2014).

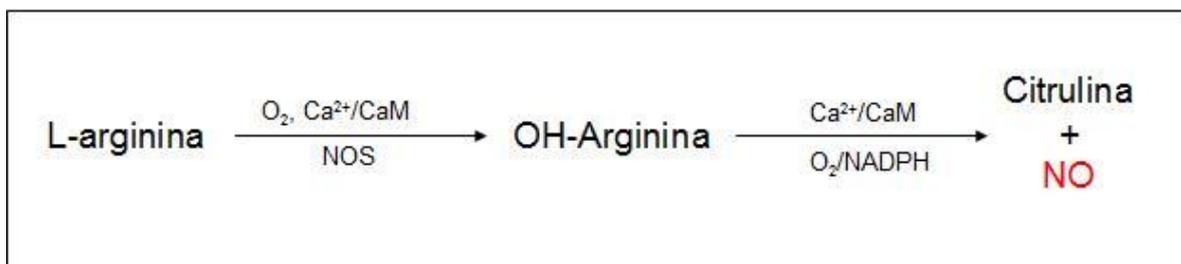
No SNC, o NO é considerado um neurotransmissor atípico (OVTSCCHAROFF et al., 2002), uma vez que se difunde para fora de um neurônio e para dentro de outro, e um candidato a receptor foi identificado, o Ferro (Fe) no sítio ativo da guanilato ciclase. Adicionalmente, o NO difere dos demais neurotransmissores, pois não é armazenado em vesículas, não é liberado por exocitose e não age sobre receptores protéicos nas membranas neuronais (UZBAY; OGLESBY, 2001).

## **Síntese do NO**

Nos mamíferos, o NO pode ser gerado por três isoformas diferentes de da enzima NO sintase (NOS), sendo duas isoformas 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 síntese de NO compreende duas etapas: na primeira, seu precursor, L-arginina (L-Arg) sofre oxidação sendo convertido em Ng-hidróxido-arginina, que é posteriormente oxidado gerando NO e citrulina, com a participação da calmodulina (CaM) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). A nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) atua como doador

de elétrons nesta reação (MAYER et al., 1991, UZBAY et al., 2001; FÖRSTERMANN; SESSA, 2011) (Figura 2).



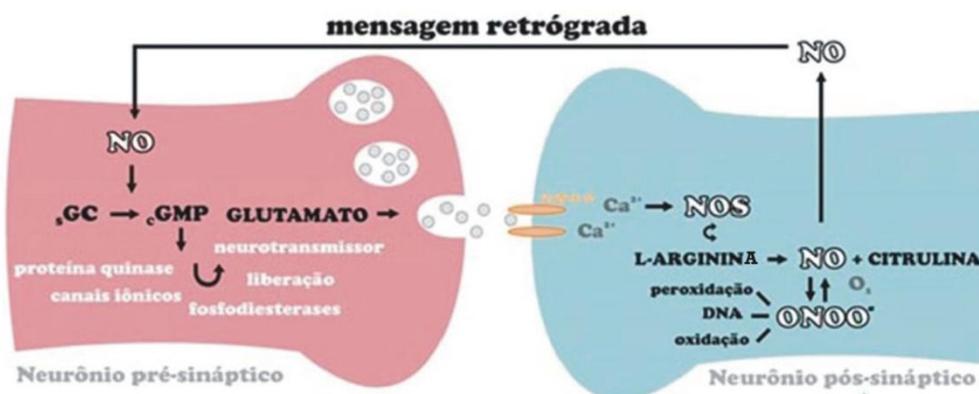
**Figura 2:** Biossíntese de NO (Ca<sup>2+</sup>/CaM = cálcio/calmodulina; NADPH= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NOS= óxido nítrico sintase; NO= óxido nítrico). Modificado de Uzbay; Oglesby, (2001).

A nNOS e a eNOS são enzimas cálcio/CaM (Ca<sup>2+</sup>/CaM)-dependentes constitutivas (BREDT et al. , 1991). Na presença de altas concentrações de Ca<sup>2+</sup>, a CaM se liga a estas NOSs ativando-as. Já a ligação da iNOS à CaM ocorre mesmo em baixíssimas concentrações intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, sendo sua atividade induzida por estímulos imunológicos ou inflamatórios, como lipopolissacarídeo bacteriano - LPS e/ou citocinas que estimulam sua síntese (HENEKA et al., 2000). A ativação das isoformas constitutivas nNOS e eNOS produzem NO em quantidades nanomolares por curto período de tempo (segundos e minutos) (NATHAN et al., 1992), enquanto a indução da iNOS catalisa altos níveis de NO na ordem de micromolar, por longos períodos de tempo (NATHAN; XIE, 1994, QUEIROZ; BATISTA, 1999). O NO formado pelas NOSs pode atuar sobre diversos alvos protéicos, sendo a ativação da guanilato ciclase solúvel e a geração de guanidina monofosfato cíclico (GMPc), um de seus papéis fisiológicos mais importantes (KNOWLES et al., 1989; GARTHWAITE, 1991).

No cérebro, as três isoformas da enzima NOS são expressas e, embora cada isoforma possa desempenhar um discreto papel fisiológico, o NO gerado pode atuar tanto em processos fisiológicos como patológicos (DUNCAN; HEALES, 2005).

A produção de NO pela nNOS ocorre em sinapses glutamatérgica, onde, após estímulo do neurônio pré-sináptico, ocorre liberação de GLU que vai se ligar aos receptores NMDA pós-sinápticos. Enquanto persistir esta união (glutamato/receptor NMDA), o Ca<sup>2+</sup> 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. O NO produzido pode atuar como mensageiro retrógrado, estimulando a produção de GMPc, que poderá promover a fosforilação de proteínas, abertura de canais iônicos e/ou liberação de outros neurotransmissores (QUEIROZ; BATISTA, 1999) (Figura 3).

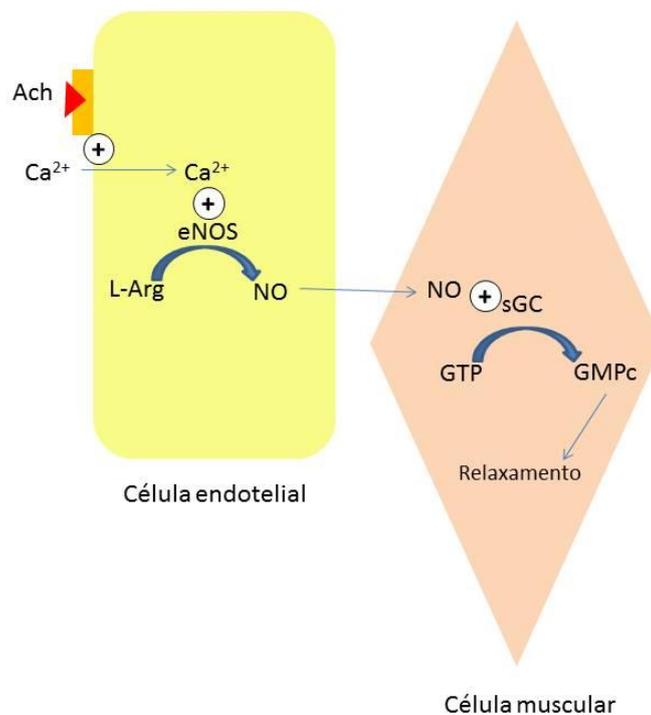
Assim, no SNC, a nNOS medeia a regulação do *long-term potentiation* (IZUMI; CLIFFORD; ZORUMSKI, 1992). A comunicação retrógrada mediada pela nNOS tem sido implicada na modulação de processos neurofisiológicos como, aprendizado, formação de memória e neurogênese, e a administração de inibidores desta isoforma tem mostrado um prejuízo destas funções (ZHOU; ZHU, 2009).



**Figura 3:** Síntese de óxido nítrico (NO) a partir da ativação da enzima NO sintase neuronal (nNOS) e seu mecanismo de atuação como mensageiro retrógrado. sGC: Guanilato ciclase solúvel, cGMP: guanidina monofosfato cíclico (Fonte: INEC, 2009).

A eNOS é expressa principalmente em células endoteliais. No entanto, esta isoforma também tem sido detectada em miócitos cardíacos, plaquetas e certos neurônios do cérebro (FÖRSTERMANN, 2000). Além da ativação dependente de Ca<sup>2+</sup> intracelular, a eNOS também pode ser ativada por estímulos que não produzem aumento sustentado deste íon, e ainda assim induzem uma liberação de NO pela fosforilação da enzima pela proteína quinase ativada (FULTON et al., 1999; FLEMING; BUSSE, 2003).

O NO produzido no endotélio vascular via eNOS, independente do estímulo, ativa a guanilato ciclase levando ao aumento de produção de GMPc, que induz a musculatura lisa adjacente ao relaxamento (Figura 4), causando vasodilatação, com consequente aumento do fluxo sanguíneo e diminuição da pressão arterial (RAPOPORT; RAZNIN; MURAD, 1983). No SNC, o NO é um poderoso vasodilatador, mantendo o fluxo sanguíneo cerebral basal e levando a aumento desse fluxo sob atividade neuronal intensa.



**Figura 4:** Síntese de óxido nítrico (NO) a partir da enzima NO sintase endotelial (eNOS) e sua atuação sobre o relaxamento muscular. L-Arg: L-Arginina, sGC: Guanilato ciclase solúvel, GTP: Guanosina trifosfato, cGMP: guanidina monofosfato cíclico. (Fonte: Elaborada pela autora).

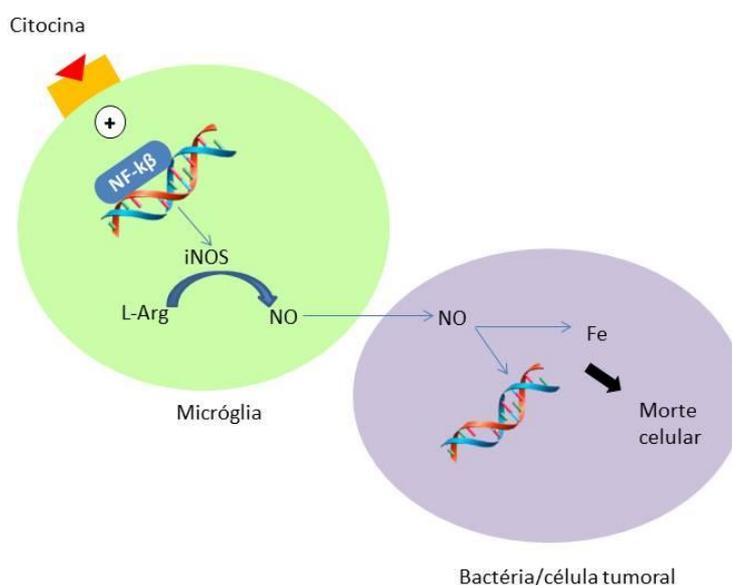
A iNOS não é comumente expressa em condições fisiológicas, mas pode ser induzida por estímulos como lipopolissacarídeo bacteriano-LPS, citocinas, e até drogas de abuso como o etanol. Uma vez expressa, sua ativação se mantém independente da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Esta isoforma foi identificada primeiramente em macrófagos, mas no SNC tem sido descrita em micróglia e astrócitos durante a manifestação de respostas imunes inatas (SAGIN et al., 2004). O controle da expressão da iNOS ocorre em nível de transcrição. Embora o mecanismo de indução ainda não esteja completamente esclarecido, o fator de transcrição nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) parece estar relacionado com a indução desta isoforma da NOS em resposta a infecções e lesão tecidual.

A iNOS, quando induzida em macrófagos, produz grandes quantidades de NO, que representam o princípio citotóxico destas células. Devido à alta afinidade pelo Fe, o NO pode inibir enzimas que contêm este metal em seus centros catalíticos (Figura 5). Além disto, altas concentrações de NO podem interferir com o DNA de células alvo, provocando ruptura e fragmentação de seus filamentos. A combinação destes efeitos forma a base da atividade citostática e citotóxica do NO sobre microorganismos, certos parasitas e células tumorais (FÖRSTERMANN; SESSA, 2011) (Figura 5).

Altos níveis de NO, além de serem tóxicos para microorganismo, parasitas e células tumorais, quando liberados em locais errados, também podem prejudicar células saudáveis. A grande maioria de doenças inflamatórias e auto-imunes é caracterizada por uma abundância de macrófagos e neutrófilos ativados, com quantidades significativas de NO secretadas por estas células, levando a danos no tecido adjacente (FÖRSTERMANN; SESSA, 2011).

No SNC, a iNOS pode ser considerada um componente chave no processo inflamatório e na resposta à injúria tecidual. No cérebro, a neurodegeneração inflamatória contribui para um grande número de doenças cerebrais. Os mecanismos pelos quais micróglias e astrócitos matam neurônios incluem a ativação microglial e expressão de iNOS por células da glia, mecanismos estes, que combinados levam à apoptose via produção de ONOO<sup>-</sup>, e o aumento de NO por esta via resulta em liberação de glutamato e excitotoxicidade.



**Figura 5:** Síntese de óxido nítrico (NO) a partir da enzima NO sintase induzida (iNOS) e seu mecanismo de citotoxicidade. L-Arg: L-Arginina, Fe: Ferro. (Fonte: Elaborada pela própria autora)

## NO e drogas de abuso

Substâncias de abuso como anfetaminas, cocaína e outros psicoestimulantes são utilizadas por sua capacidade de causar estimulação motora e euforia. Evidências

experimentais indicam que o NO participa das manifestações motoras e comportamentais durante o consumo de drogas de abuso. Vários trabalhos têm mostrado que a administração do inibidor não seletivo da NOS, N(G)-nitroarginina metil éster (L- NAME) e do seletivo para nNOS 7-Nitroindazol (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, reduzem a hiperatividade locomotora induzida pelos últimos. Por outro lado, a administração de doadores de NO parece potencializar essa atividade (ÇELIK; ZAGLY; UZBAY, 1999; UZBAY; OGLESBY, 2001).

Além da participação na atividade locomotora durante o uso, 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 24 h de cocaína, utilizando técnica de imunohistoquímica para detecção desta isoforma. De acordo, Nasif e colaboradores (2010) mostraram que a inibição da nNOS preveniu a sensibilização motora e excitabilidade de células piramidais de ratos durante a abstinência de cocaína. A administração do inibidor não seletivo da NOS N-G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), também atenuou os sinais de abstinência de cocaína e de agonista opioide (WIN 55212-2), evidenciada pela diminuição da taxa de locomoção de planárias, mostrando que sistemas opióides também podem ser influenciados pelo NO (RAWLS et al., 2006).

A ativação de receptores opióides  $\mu$  induz a expressão de nNOS, mediada por canais NMDA via influxo de  $Ca^{2+}$  intracelular (GARZÓN; RODRÍGUEZ-MUÑOZ; SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, 2012). Estudos sugerem que o aumento de NO por esta via está relacionado à dependência e abstinência de opióides como a morfina. A administração subcrônica de 7-NI atenuou a tolerância ao efeito analgésico da morfina em ratos (SANTAMARTA; ULIBARRI; PINEDA, 2005). Karami e colaboradores (2014) mostraram que a administração do precursor de NO, L-Arg, na amígdala central potencializa os sinais de abstinência de morfina como *dog shaking* e *grooming* em ratos; enquanto o tratamento com os inibidores NO-MICRON-nitro-L-arginina-p-nitroanilina (LNAPNA) ou 7-NI, no *locus coeruleus*, ou na medula espinal, reduz os sinais da abstinência, reforçando a participação do NO neste processo (JAVELLE et al., 2002; LIU; QIAN, 2012). Como o mecanismo de ação da nicotina também envolve a ativação de receptores opióides, o papel do NO nos processos de dependência e abstinência desta substância parece ser semelhante ao observado com agentes opióides. Um aumento na expressão de NOS, foi observado no núcleo dorsal da rafe (NDR) e *locus coeruleus* de ratos expostos à nicotina (OKERE; WATERHOUSE, 2013), enquanto a administração de inibidores de nNOS atenuou os sinais de abstinência a esta substância, sugerindo a possível utilização destes inibidores no tratamento do tabagismo (MALIN et al., 1998; JAIN; MUKHERJEE; MOHAN, 2008).

A síndrome de abstinência de etanol também parece ser influenciada pela ação do NO. Em 2003, Uzbay e Erder avaliaram o efeito da L-Arg durante a abstinência de etanol em ratos, utilizando uma escala de parâmetros comportamentais que incluiu itens como postura e marcha anormal, agitação, e rigidez da cauda, e observaram um aumento dos sinais de abstinência com a administração do precursor do NO.

Além disso, a administração do doador de NO, dinitrato de isosorbida, aumentou a severidade de alguns sinais da síndrome de abstinência de etanol em ratos, como a diminuição do tempo de duração do reflexo no teste de reflexo de endireitamento. A avaliação deste mesmo parâmetro após a administração do inibidor da NOS, L-NAME, verificou um aumento do tempo de duração e diminuição da perda de reflexo induzida pela abstinência de etanol (ADAMS; CÍCERO, 1995; ADAMS et al., 1997). A administração do mesmo inibidor resultou ainda em diminuição de alguns sinais de abstinência como tremor, rigidez da cauda e hiperatividade em ratos (ADAMS; CÍCERO, 1997, UZBAY et al., 1997).

Estudos utilizando técnicas indiretas também têm mostrado a participação do NO na abstinência de etanol. Em 2001, Gören e colaboradores mostram um aumento na concentração de L-citrulina no corpo estriado de ratos submetidos à abstinência de etanol, a partir da primeira hora após o fim do consumo. 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 alcoólatras em abstinência, comparado com o controle, não alcóolicos (YUKSEL et al., 2005).

Dentre os trabalhos que mostram o aumento do NO durante a abstinência de etanol, o envolvimento da iNOS também tem sido descrito. Um aumento na expressão desta isoforma da NOS e da ciclooxygenase tipo 2 (COX-2) foi observado no hipocampo e cerebelo de ratos 24 h após a descontinuação do consumo crônico de etanol (PASCUAL et al., 2007). Recentemente, Abdel-Zaher e colaboradores (2013) mostraram que camundongos tratados com timoquinona, uma substância presente no óleo essencial das sementes de *Nigella sativa* e descrita como inibidora da iNOS (EL-MAHMOUDY et al., 2002), apresentaram uma diminuição dos sinais de abstinência à morfina como *jumping*, *rearing*, tremor de patas e bater de dentes, sendo este efeito revertido pela administração concomitante de L-Arg.

O aumento de NO durante a exposição e abstinência de etanol parece ser acompanhado de alteração de outros mediadores inflamatórios como citocinas e de COX-2 (VALLES et al., 2004; FERNANDEZ-LIZARBE; PASCUAL; GUERRI, 2009), sugerindo a ocorrência de resposta inflamatória neste processo.

## **Dependência de etanol e neuroinflamação**

Além dos efeitos sobre os diversos neurotransmissores, o consumo crônico de etanol tem sido relacionado à inflamação no SNC. Evidências apontam que a exposição ao etanol pode alterar níveis de mediadores inflamatórios como as citocinas, a expressão de iNOS e COX-2 (VALLES et al., 2004; FERNANDEZ-LIZARBE; PASCUAL; GUERRI, 2009), além de provocar modificações microgliais (HE; CREWS, 2008), sugerindo o envolvimento da resposta imune inata nesse processo.

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa contra patógenos e não requer exposição prévia a antígenos estranhos para ser acionada. No SNC, as micróglias são as principais células efectoras deste tipo de resposta (KOFLEER; WILEY, 2011; SOSA; FORSTHUBER, 2011). Em condições normais, as micróglias desempenham várias funções homeostáticas e estão envolvidas na plasticidade sináptica e neurotransmissão. Em situações patológicas estas células são ativadas, e liberam uma variedade de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas, espécies reativas de oxigênio, e óxido nítrico, os quais devem, eventualmente, causar destruição neuronal, o que é observada em várias doenças do SNC (STOLL; JANDER, 1999; WEITZ; TOWN, 2012; CHUNG et al., 2013).

Evidências indicam que a exposição às drogas de abuso, como o etanol, leva à ativação microglial, com consequente ativação do fator de transcrição NF-κB e aumento da expressão de genes da imunidade inata, como citocinas, iNOS e COX-2 (CREWS et al., 2006; HE; CREWS, 2008; ZOU; CREWS, 2010).

Além do componente celular, representado principalmente pelas microgliais, a resposta inata cerebral inclui componentes moleculares como as citocinas. As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares hidrossolúveis produzidas por diversos tipos de células por meio da ativação de proteoquinases ativadas por mitógenos. Estes mediadores químicos, com frequência, são formados em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas que podem atuar por mecanismos parácrinos (em células vizinhas) ou autócrinos (nas próprias células produtoras) (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; SOMMER; WHITE, 2010).

Diferentes tipos de células podem secretar a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno este denominado pleiotropia. Além disso, estes mediadores podem ser redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas (ZHANG, 2007). Estas ações se dão por meio de ligações à receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, além de regular a produção de outras citocinas, que podem aumentar (proinflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta

inflamatória. Dentre as principais citocinas consideradas proinflamatórias, destacam-se interleucinas (IL) 1 alfa e beta (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), IL-2, IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); e as anti-inflamatórias IL-4, e IL-10 (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; SOMMER; WHITE, 2010).

O estado neuroinflamatório evidenciado por ativação microglial, aumento dos níveis de citocinas e da expressão de iNOS e COX-2, tem sido relacionado às alterações comportamentais observadas durante o consumo e abstinência de etanol. Injeções intracerebrais de citocinas aumentam o comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência de etanol em ratos submetidos ao teste de interação social (BREESE et al., 2008; KNAPP et al., 2011). Alguns autores mostraram ainda que enquanto o consumo de etanol induziu genes da imunidade inata no cérebro, como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS e COX-2, a inibição de citocinas próinflamatórias, diminui a sensibilidade para neurotoxicidade glutamatérgica e o comportamento tipo ansioso durante a abstinência (KNAPP; CREWS, 1999; ZOU; CREWS, 2010; CREWS; ZOU; QIN, 2011). Além disto, o tratamento com o anti-inflamatório indometacina reduziu a indução de iNOS e COX-2, e preveniu o déficit cognitivo e motor induzido pela exposição crônica ao etanol (PASCUAL et al., 2007).

Recentemente, Freeman e colaboradores (2012) demonstraram em ratos, 48 h após a retirada do etanol, um aumento na expressão de RNAm de TNF- $\alpha$  e iNOS no núcleo central da amígdala (CeA) e complexo vagal dorsal (DVC), dois núcleos anatomicamente conectados e com papel viscerossensorial importante. Estes resultados sugerem que sinais inflamatórios estão presentes em regiões cerebrais associadas com a instabilidade emocional e autonômica durante a abstinência de etanol.

Além da CeA e DVC, estudos neuroanatômicos têm mostrado que regiões mesencefálicas como a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPDL) e NDR também estão associadas ao comportamento ansioso típico da abstinência. A ativação neuronal destas duas regiões foi observada em ratos durante abstinência de 24 e 48 h, a qual foi acompanhada de aumento de ansiedade evidenciado pela diminuição da distância percorrida no campo aberto (BONASSOLI; MILANI, DE OLIVEIRA, 2011).

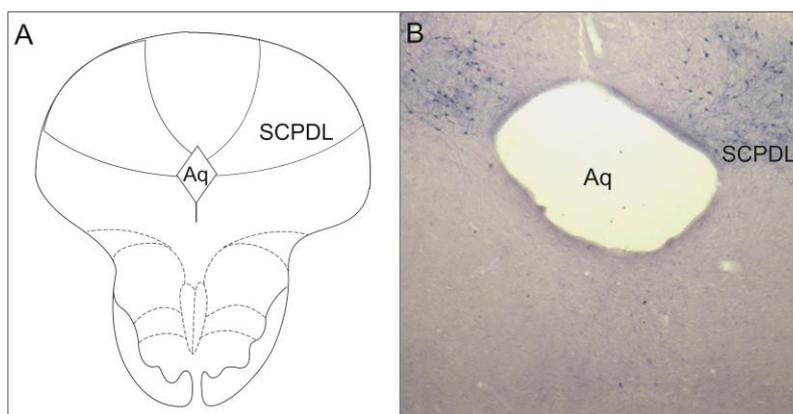
### **Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e abstinência de etanol**

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é uma região que circunda o aqueduto cerebral e compreende cerca de 10% do mesencéfalo de mamíferos como, o homem, o gato e o rato. Sua localização, entre o romboencéfalo e o diencéfalo, lhe proporciona uma posição privilegiada para participar dos diversos sistemas através de uma rede de conexões ascendentes e descendentes. É uma das partes do encéfalo que menos sofreu mudanças

no curso evolutivo sugerindo que a mesma esteja envolvida em importantes funções de proteção ou regulação homeostática que requerem essa aparente estabilidade (BEITZ, 1982; CARRIVE, 1993). Foi demonstrado que a estimulação elétrica do teto mesencefálico do homem produz o mesmo padrão de respostas somáticas e afetivas relativas ao medo e ansiedade que a estimulação desta mesma região em animais de laboratório, suportando a idéia de que esta estrutura participaria ativamente na expressão destes comportamentos (NASHOLD et al., 1969).

Bandler e colaboradores (1991), em estudos anatômicos com traçadores retrógrados e anterógrados e mapeamento funcional com microinjeção de aminoácidos excitatórios, dividiram a SCP em colunas com nítidas diferenças funcionais entre as mesmas. Entre elas, destaca-se a região dorsolateral (SCPDL), que é ativada em situações que provocam reações de confronto ou a fuga do estímulo estressor (KEAY; BANDLER, 2001).

Neurônios nitrérgicos foram observados por técnicas imunohistoquímicas na SCPDL, onde formam uma coluna orientada longitudinalmente (ONSTOTT; MAYER; BEITZ, 1993) (Figura 6). A grande quantidade de neurônios nitrérgicos localizados nesta região sugere o envolvimento do NO em funções mediadas por esta estrutura, como a manifestação da ansiedade, por exemplo.



**Figura 6:** Diagrama representativo da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPDL) (A). Fotomicrografia de secção coronal (40µm) da SCPDL de ratos (B). Nota-se a presença de neurônios NADPH-diaforase positivos que delimitam a coluna dorsal da SCPDL. Aq: Aqueduto de Sylvius. (Fonte: Elaborado pela própria autora, modificado do Atlas Paxinos e Watson (1997).

De fato, vários estudos reforçam a participação do NO nas reações de medo e ansiedade mediadas pela SCPDL. Estes trabalhos mostram uma diminuição da ansiedade após administração de inibidores da NOS diretamente nesta região cerebral (AGUIAR; GUIMARÃES, 2009; TONETTO et al., 2009). Além disso, a administração de doadores de NO diretamente nesta estrutura causa um aumento nas reações de defesa, caracterizadas

por reação de fuga (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000; BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009).

Estudos clássicos já citavam a SCP como uma via final a respostas defensivas. Estes estudos mostraram que a estimulação elétrica de estruturas como amígdala e hipotálamo medial podem induzir respostas defensivas como, comportamento de fuga e congelamento, as quais são permanentemente abolidas após lesões na SCP (HUNSPERGER, 1963; GRAEFF, 1994). O contrário não é verdadeiro, pois, nem lesões no telencéfalo, nem no hipotálamo bloqueiam respostas defensivas provocadas pela estimulação da SCP (HUNSPERGER, 1963, TOMAZ et al., 1988).

Alterações comportamentais e somáticas semelhantes às obtidas através da estimulação elétrica da SCP foram observadas durante o estado de abstinência a drogas de abuso, como o etanol (BRANDÃO et al., 1999; VIANNA et al., 2001). Experimentos utilizando a estimulação elétrica *in vivo* diretamente na SCPDL demonstram que animais submetidos à abstinência de etanol por 48 h apresentam diminuição do limiar de congelamento e fuga (CABRAL et al., 2006). A técnica de estimulação elétrica aplicada a neurônios da SCP *in vitro*, obtidos de ratos em abstinência de etanol, também mostrou diminuição do limiar de estimulação necessário para desencadear um potencial de ação (YANG et al., 2002). Além disto, a microinjeção de ácido DL-2-amino-7-fosfonoheptanóico, um antagonista de receptores NMDA, na porção ventrolateral da SCP de ratos durante a abstinência de etanol bloqueou a susceptibilidade a convulsões audiogênicas, indicando que esta região desempenha um papel chave na excitabilidade neuronal, durante a abstinência ao etanol (YANG et al., 2003).

### **Núcleo dorsal da rafe e abstinência de etanol**

O NDR é uma porção do núcleo da rafe (NR) localizada na porção anteroinferior do mesencéfalo. Análises anatômicas demonstram que o NDR envia projeções para a SCPDL e as colunas laterais e dorsomedial da SCP emitem projeções preferencialmente para a região caudal do núcleo da rafe (KÁLEN et al., 1985; HERMANN et al., 1997). O NDR também envia projeções serotoninérgicas excitatórias para a amígdala e córtex pré-frontal. Por outro lado, esta estrutura recebe projeções glutamatérgicas de várias regiões do SNC, tais como o córtex pré-frontal e núcleos do hipotálamo; projeções gabérgicas da SCPDL; projeções dopaminérgicas da área tegmentar ventral; e projeções noradrenérgicas do *locus coeruleus* (LEE et al., 2003).

Embora esta estrutura, contenha a maior concentração de neurônios serotoninérgicos no cérebro, pelo menos 50% são células não-serotoninérgicas (não-5-

HT) (STEINBUSCH et al., 1980; DESCARRIES et al., 1982). Um dos principais fenótipos não-5-HT presentes são as células que expressam NOS (JOHNSON; MA, 1993). Os neurônios que contêm esta enzima apresentam uma distribuição topográfica única em todo o NDR (VASUDEVA et al., 2011).

A presença de NO nesta estrutura tem sido implicada na modulação de respostas de ansiedade a estímulos diversos incluindo a abstinência de etanol (BATISTELA, 2009). Um aumento da ativação de neurônios nitrérgicos, evidenciado pelo aumento de células duplamente marcadas (c-Fos + NADPH-d positivas), foi observado no NDR de ratos após exposição ao LCE (BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006). O mesmo padrão de ativação foi observado por Bonassoli e colaboradores (2011), 24 e 48 h após a descontinuação do consumo crônico de etanol. Em 2008, Spiacci Jr e colaboradores mostraram que a administração de inibidores da NOS, não seletivo, L-NAME e seletivo para nNOS, 7-NI, diretamente do NDR diminuiu o comportamento tipo ansioso de ratos avaliados no LCE. E no ano seguinte, Batistela e colaboradores (2009) observaram que a administração de L-NAME na mesma estrutura resultou em diminuição dos sinais da ansiedade em ratos avaliados no LCE, 48 h após a descontinuação do consumo crônico de etanol. O mesmo não foi observado com a administração de 7-NI, no mesmo período, mostrando o possível envolvimento de outras isoformas da NOS neste processo (BATISTELA, 2009).

## **Justificativa**

A complexidade dos mecanismos de ação do etanol e o crescente interesse da comunidade científica no estudo do envolvimento de sistemas de neurotransmissão central levam ao surgimento, cada vez maior, de novos estudos e teorias sobre a relação destes sistemas com os efeitos do consumo e abstinência de etanol. Apesar disto, ainda há dificuldades em estabelecer uma terapia mais eficaz para o tratamento da dependência que, só serão sanadas, com o melhor entendimento das estruturas cerebrais, sistemas de neurotransmissores e fenômenos de neuroadaptação envolvidos no consumo de etanol.

Os atuais tratamentos da dependência alcoólica incluem programas sociais como, os Alcoólicos Anônimos (AA), comunidades terapêuticas, acompanhamento psicológico e tratamentos farmacológicos. Quando necessário, a intervenção é feita principalmente com drogas aversivas como o dissulfiram ou drogas capazes de reduzir o desejo intenso de beber como naltrexona e o acamprosato. Estes dois últimos, quando combinados, vão atuar sobre diferentes aspectos do uso de etanol, sendo a naltrexona responsável por diminuir o consumo e o acamprosato por estabilizar a abstinência (KAMKOONG, 2006)

Não há evidências de que estes medicamentos desenvolvam tolerância ou sintomas de abstinência quando cessado o tratamento, mas, apesar de seus benefícios, podem causar efeitos hepatotóxicos, principalmente para indivíduos com doenças hepáticas clinicamente significantes, como a cirrose.

Na tentativa de amenizar sintomas excitatórios da abstinência de etanol, vários psicofármacos são utilizados, sendo os benzodiazepínicos (BZD) a medicação de primeira escolha, administrados conforme a intensidade dos sintomas de agitação e convulsões. Esta classe de medicamentos atua como depressora do SNC e sua eficácia na abstinência está baseada na tolerância farmacológica cruzada com o etanol.

Apesar da eficácia, o uso de BZD no tratamento da dependência/abstinência, está associado à elevada incidência de tolerância, dependência e a ocorrência da síndrome de abstinência quando se interrompe ou diminui o seu uso (BRAZ, 2003). Estas características, somadas à possibilidade de abuso dessas drogas durante a detoxificação alcoólica e efeitos colaterais desses compostos, como a inibição cognitiva e a sedação, limitam seu uso na clínica. Além dos BZD, outros depressores como os barbitúricos, e antipsicóticos como o haloperidol, também podem ser utilizados para controlar as manifestações excitatórias e alucinações, respectivamente (LARANJEIRA, 2000).

Semelhante ao que se observa com BZD, os barbitúricos também levam ao quadro de tolerância e dependência, seguidas de síndrome de abstinência, quando seu uso é interrompido. A desvantagem desse grupo em relação aos BZD se deve ao fato de que a ação inibitória desta classe de drogas, ao contrário dos BZD, ocorre de maneira

independente de GABA endógeno, o que aumenta o risco em casos de abuso (SILVA, 2010).

Devido aos inconvenientes observados com os tratamentos atuais, como tolerância, dependência e até síndrome de abstinência medicamentosa, novas terapias visando uma melhoria no tratamento da dependência de etanol, constituem uma necessidade urgente.

Dada a importância da síndrome de abstinência de etanol como agente causador de recaídas em etilistas abstêmios, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo pode auxiliar a pesquisa de novos tratamentos e, assim, contribuir para a recuperação dos dependentes. Neste sentido, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da intoxicação e abstinência de etanol sobre os parâmetros neuroinflamatórios em estruturas cerebrais relacionadas à ansiedade, bem como avaliar os efeitos da inibição da NOS sobre o comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência de etanol.

## **CAPÍTULO I**

### **EFEITOS DA INTOXICAÇÃO E ABSTINÊNCIA DE ETANOL SOBRE PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS EM REGIÕES MESENCEFÁLICAS RELACIONADAS À ANSIEDADE**

---

## 1 INTRODUÇÃO

A relação entre consumo crônico de etanol e a abstinência é complexa e de interesse devido à grande incidência de abuso desta substância, à dependência por ela causada e ao impacto potencial sobre a saúde neurológica e emocional (KELLEY; DANTZER, 2011). A falta de terapias farmacológicas eficazes para o tratamento da dependência alcoólica torna ainda mais urgente o entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nesta condição.

Embora inúmeros fatores já tenham sido implicados no início e sustentação do abuso de etanol e dependência, a desregulação no sistema neuroimune tem ganhado destaque (VALLES et al., 2003; PASCUAL et al., 2007; BREESE et al., 2008; HE; CREWS, 2008; QIN et al., 2008; ALFONSO-LOECHES et al., 2010; CREWS et al., 2011; KNAPP et al., 2011; PASCUAL et al., 2011; CREWS et al., 2013). Evidências apontam que a exposição ao etanol pode alterar mediadores inflamatórios como citocinas e óxido nítrico (NO) (VALLES et al., 2004; FERNANDEZ-LIZARBE; PASCUAL; GUERRI, 2009), além de provocar modificações microgliais (HE; CREWS, 2008), sugerindo o envolvimento da resposta imune inata nesse processo.

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa contra patógenos e não requer exposição prévia a antígenos estranhos para ser acionada. No sistema nervoso central (SNC), a principal função da resposta imune inata é realizada pela micróglia, célula residente que, quando ativada, apresenta atividade fagocítica, apresentadora de antígeno e secretora de mediadores inflamatórios (KOFLER; WILEY, 2011; SOSA; FORSTHUBER, 2011). Em condições patológicas, astrócitos (FLOREANI et al., 2010), células endoteliais (YU et al., 2011) neurônios (YU et al., 2011) e até leucócitos infiltrados (THIBEAULT et al., 2001; KASSNER et al., 2009), podem também contribuir para a manifestação da resposta imune.

O cérebro saudável contém microglias ramificadas não ativadas, conhecidas por sustentar o tecido cerebral e regular as sinapses (GRAEBER, 2010). Estas células apresentam um baixo limiar de ativação, podendo ser estimuladas por diversos fatores tais como, estresse, infecção, exposição ao etanol e outras drogas de abuso (SHPARGEL et al., 2008). A ativação microglial leva à alteração de sua morfologia, evidenciada por alargamento celular, associado à ativação do fator de transcrição kB (NF-kB, do inglês *nuclear factor kappa B*).

Vários estudos mostram que o etanol induz a transcrição gênica mediada por NF-kB. Um aumento na atividade de NF-kB no cérebro de ratos foi descrito por Ward e colaboradores (1996), 30 min após a administração intraperitoneal de etanol. Crews e colaboradores (2006), mostraram um aumento da ligação NF-kB-DNA no cérebro de ratos

tratados com altas doses de etanol por um período de 4 dias (CREWS et al., 2006); o mesmo aumento foi observado em culturas de células hipocâmpais humanas obtidas de alcoólatras *postmortem* (ZOU; CREWS, 2006). Um aumento nos produtos da transcrição de genes alvo do NF- $\kappa$ B, como as interleucinas 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e 6 (IL-6), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), além de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) foi observado em cultura de células do hipocampo de ratos submetidos ao consumo crônico de etanol (ZOU; CREWS, 2010), enquanto um aumento nos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  bem como de iNOS e COX-2 também foi observado em cultura de micróglia e de astrócitos de ratos submetidos à exposição crônica ao etanol (VALLES et al., 2004; FERNANDEZ-LIZARBE et al., 2009). O aumento destes mediadores inflamatórios estimula a transcrição de NF- $\kappa$ B pela própria célula que o secretou e por células próximas, indicando que a ativação do NF- $\kappa$ B desencadeada pela exposição ao etanol se mantém por meio de alças de sinalização autócrina e parácrina, que levam a um aumento persistente destes mediadores (QIN et al., 2008; ZOU; CREWS, 2010; CREWS; ZOU; QIN, 2011).

Embora muitos trabalhos mostrem que a exposição crônica ao etanol ativa processos neuroinflamatórios inatos (CREWS, 2006; BREESE et al., 2008; CREWS et al., 2011; ZOU; CREWS, 2010), os mecanismos pelos quais a neuroinflamação pode influenciar o comportamento dos indivíduos expostos à intoxicação e abstinência de etanol, são pouco entendidos.

O aumento da iNOS, bem como de outros marcadores de neuroinflamação durante o consumo de etanol tem sido relacionado a alterações comportamentais características da dependência e retirada. Em 2008, Breese e colaboradores, mostraram que injeções cerebrais de citocinas, aumentam a ansiedade induzida pela dependência de drogas de abuso durante a abstinência. Liu e colaboradores (2000) observaram que a administração de naloxona, um antagonista opióide utilizado no tratamento da dependência, também bloqueia a ativação microglial e a indução de genes da resposta imune inata em cultura de células mesencefálicas obtidas de ratos abstinentes de etanol. Tal constatação sugere a participação deste bloqueio na manifestação do efeito terapêutico da naloxona. Uma diminuição dos sinais de ansiedade também foi observada em ratos abstinentes tratados com o inibidor de receptores de citocinas próinflamatórias, SL327, e avaliados no teste de interação social (KNAPP; CREWS, 1999).

A interrupção do consumo de etanol após um período longo de exposição, leva à síndrome de abstinência, evidenciada por uma instabilidade emocional e autonômica, caracterizadas por ansiedade, agitação, delírio e sinais simpáticos, como elevação da frequência cardíaca e da pressão arterial. Estes sinais parecem estar relacionados com o estado neuroinflamatório; entretanto, os mecanismos que explicam esta relação não são

bem compreendidos (JOCHUM et al., 2010; MONTE et al., 2010; SHIRAFUJI et al., 2010; EYER et al., 2011).

O que se pensava no início era que a remoção do etanol promovesse resolução de qualquer estado próinflamatório resultante da exposição crônica, levando à recuperação. No entanto, há evidências que sugerem que o oposto pode ocorrer. Assim, a interrupção do consumo de etanol, ao invés de causar uma diminuição, causaria, por sua vez, uma exacerbação do estresse oxidativo a nível celular e neuroinflamação (BROWN et al., 2009). De acordo, Qin e colaboradores (2008), observaram um aumento de citocinas próinflamatórias, bem como um aumento na ativação microglial induzidos por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) no cérebro de camundongos, 24 h após a descontinuação do consumo crônico de etanol. Com o mesmo tempo de abstinência, Pascual et al. (2007) também constataram um aumento nos níveis de iNOS no neocórtex, hipocampo, e cerebelo de ratos. Os mesmos autores mostraram ainda que o tratamento com o anti-inflamatório indometacina foi capaz de reverter o aumento de iNOS e prevenir os déficits de memória e aprendizado, bem como a diminuição da atividade motora, induzidos pela exposição crônica ao etanol.

Recentemente, Freeman e colaboradores (2012) demonstraram um aumento na expressão de RNAm de citocinas como TNF- $\alpha$ , e de proteínas como iNOS, 48 h após a retirada do etanol no núcleo central da amígdala (CeA) e complexo vagal dorsal (CVD), dois núcleos anatomicamente conectados e com papel viscerossensorial importante. Estes resultados sugerem que sinais inflamatórios estão presentes em regiões cerebrais associadas com a instabilidade emocional e autonômica durante a abstinência de etanol.

Além da CeA e CVD, regiões mesencefálicas como a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPDL) e o núcleo dorsal da rafe (NDR) têm sido associadas ao comportamento ansioso típico da abstinência de etanol (CABRAL et al., 2006; BATISTELA, 2009; BONASSOLI; MILANI; DE OLIVEIRA, 2011). A ativação neuronal destas duas regiões foi observada em ratos durante abstinência de 24 e 48 h. Além disso, um aumento da ativação de neurônios nitrérgicos acompanhado de comportamento tipo ansioso, evidenciado pela diminuição da distância percorrida no campo aberto, foram observados em ratos 24h após a descontinuação de etanol (BONASSOLI; MILANI; DE OLIVEIRA, 2011).

Cabral e colaboradores (2006) mostraram que a abstinência de etanol foi capaz de diminuir os limiares de resposta de congelamento e de fuga observados durante a estimulação elétrica na SCPDL. Esta estrutura possui conexões recíprocas com demais estruturas cerebrais relacionadas à expressão do comportamento ansioso, como o hipotálamo (SHIPHEY et al., 1991; VEENING et al., 1991) e o complexo amigdalóide (RIZVI et al., 1991; SHIPLEY et al., 1991; LEITE-PANISSI et al., 2001). Durante a expressão da

ansiedade, a ativação destas estruturas ocorre de maneira conjunta, onde cada uma é capaz de influenciar o *output* das outras (GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

Análises anatômicas demonstraram que a SCPDL recebe projeção do NDR (VERTES et al., 1991) e as colunas laterais e dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal emitem projeções preferencialmente para o núcleo caudal da rafe (KÁLEN et al., 1985; VERTES et al., 1991; HERMANN et al., 1997). Estas estruturas têm sido implicadas na regulação da ansiedade em diferentes situações que envolvem estímulos aversivos como analgesia, estresse e abstinência de etanol (BASBAUM; FIELDS, 1984; AMAT et al., 2005; MAIER; WATKINS, 2005; CABRAL et al., 2006; BONASSOLI; MILANI; DE OLIVEIRA, 2011; BONASSOLI et al., 2013, MAGUIRE et al., 2014).

Uma alta densidade de neurônios nitrérgicos tem sido descrita no NDR, e injeções do inibidor não seletivo da NOS, N-G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) nesta região diminui os sinais de ansiedade após a descontinuação do consumo crônico de etanol. Já a administração do inibidor seletivo da nNOS 7-nitroindazol (7-NI), na mesma estrutura não apresenta efeito algum sobre a ansiedade induzida pela abstinência de etanol (BATISTELA, 2009). Estes dados sugerem que outras isoformas da NOS, que não a nNOS possam estar envolvidas na manifestação do comportamento observado.

Dada a importância da SCPDL e do NDR na manifestação comportamental da ansiedade durante a abstinência de etanol, e evidências de que a neuroinflamação pode estar envolvida neste processo, consideramos a hipótese de que a neuroinflamação nestas estruturas poderia estar relacionada ao comportamento tipo ansioso observado na abstinência. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi: i) avaliar a ativação micróglial pela expressão de OX-42 e a expressão de iNOS na SCPDL e no NDR durante a intoxicação e abstinência de etanol, ii) quantificar os níveis de citocinas no mesencéfalo durante a intoxicação e abstinência de etanol, iii) investigar os efeitos do inibidor da iNOS, 1400W sobre os parâmetros neuroinflamatórios e sobre o comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência de etanol.

## 2 MATERIAIS E MÉTODO

### 2.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), pesando 250–300g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, foram mantidos em grupos de três por caixa, sob ciclo claro/escuro de 12/12-h (claro às 7:00 AM) e temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com livre acesso à água. Os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento para o Cuidado e Uso de animais de Laboratório e aprovados pelo Comitê de ética para experimentação animal local (CEAE 031/2010). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

### 2.2 ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL

O consumo crônico de etanol se deu por um procedimento forçado de auto-administração de dieta líquida contendo etanol (BONASSOLI et al., 2011). Os animais passaram um período de 3 dias de adaptação ao ambiente do biotério local e, nos dois dias subsequentes 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). A dieta oferecida constitui uma formulação nutricionalmente completa que forneceu proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais minerais necessários à manutenção da saúde dos animais, com valor calórico correspondente à 1,1 kcal/mL (BOND; Di GISTO, 1976).

A dieta líquida foi a única fonte de alimento disponível para os animais, e foi preparada e oferecida diariamente no mesmo horário (14:00 horas). Os animais receberam a dieta composta por Sustagem e água (grupo Controle) ou etanol (grupos Intoxicado e Abstinente), durante 15 dias, e após foram submetidos aos testes comportamentais, conforme divisão de grupos mostrada adiante.

Para os animais que receberam etanol, a dieta foi acrescida de diferentes concentrações de etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), sendo de 6% (vol/vol) nos 2 primeiros dias e aumentada para 8% (vol/vol) até o final do tratamento (3º ao 15º dia). No 16º dia, o grupo Abstinente consumiu base dietética sem etanol.

Para o grupo controle, foi disponibilizada a base dietética sem etanol, sendo as calorias do etanol compensadas pela adição de sacarose, 4,97g de sacarose/60 mL de bebida nos dois primeiros dias (6% de etanol), e 6,63 g / 60mL (8% de etanol) nos demais dias (KNAPP et al., 1998). No 16º dia, os animais consumiram a base dietética sem 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 corporal do animal.

Os pesos dos animais foram determinados semanalmente durante todo o tratamento.

### 2.3 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DE ETANOL

As concentrações sanguíneas de etanol (CSE) foram determinadas para verificar se a dieta líquida oferecida resultaria em CSE confiável durante o período de exposição crônica e para confirmar o *clearance* de etanol durante o período de abstinência. Dois grupos experimentais foram testados, onde a coleta de sangue foi realizada imediatamente após a última exposição (grupo Intoxicado) ou 24h após o fim do tratamento (grupo Abstinente).

As amostras de sangue foram coletadas da veia cava inferior dos animais anestesiados com tiopental sódico (0,4 mg/kg, i.p.), utilizando seringas heparinizadas. As dosagens de etanol foram realizadas em um cromatógrafo a gás Varian CP3380, equipado com um detector de ionização de chama (Varian 1177, Palo Alto, CA) e uma coluna capilar de sílica fundida Carbowax (30 m 0,25 milímetros i.d.; espessura, 0,25 mm) (Chrompack, Middelburg, Holanda). Injeções da amostra foram realizadas utilizando um amostrador automático (CombiPAL, CTC Analytics, Zwingen, Suíça), seguindo o procedimento descrito por De Martinis et al (2006). Em resumo, 1mL da amostra de sangue contendo fluoreto de sódio como conservante foi colocado em um compartimento (vial *headspace*), com 1mL de água destilada, 1g de NaCl, e isobutano (100 mg/dL) como padrão interno. O compartimento foi fechado com silicone politetrafluoretileno e uma tampa de aço. As amostras foram incubadas a 80°C durante 10 min antes de serem injetadas no orifício de entrada do sistema capilar do cromatógrafo gasoso. Estas análises foram realizadas em parceria com o Departamento de Química da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, sob responsabilidade do professor Dr. Bruno Spinoso De Martinis.

Os resultados foram apresentados como média±erro padrão da média (S.E.M.) da CSE em mg%.

### 2.4 DROGA

A droga utilizada nos experimentos foi o inibidor seletivo da iNOS, N-(3-[Aminometil]benzil)acetamidina (1400W, Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído em salina e administrado sistemicamente (i.p.) nas doses de 0,75 µg/kg, 1,5 µg/kg e 3,0 µg/kg (MONTEZUMA et al., 2012).

### 2.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Inicialmente, os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos experimentais:

i) Controle: animais que receberam a dieta líquida sem etanol (com sacarose) por 15 dias e foram testados 24 horas depois;

ii) Intoxicado: animais que receberam a dieta contendo etanol e os testes foram realizados imediatamente após a última exposição ao etanol, ainda durante o período de intoxicação e;

iii) Abstinente: animais que receberam a dieta contendo etanol por 15 dias e foram testados 24 horas depois.

Três dias antes do fim do período de exposição ao etanol, iniciou-se o tratamento com o 1400W ou salina. Para esta etapa, o grupo de animais abstinentes foi novamente subdividido de acordo com o tratamento farmacológico, totalizando 6 grupos:

i) Controle + salina (Controle)

ii) Intoxicado + salina (Intoxicado)

iii) Abstinente + salina (Abst + Sal)

iv) Abstinente + 1400W 0,75 µg/kg (Abst + 1400W 0,75 µg/kg)

v) Abstinente + 1400W 1,5 µg/kg (Abst + 1400W 1,5 µg/kg)

vi) Abstinente + 1400W 3,0 µg/kg (Abst + 1400W 3,0 µg/kg)

## 2.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

No dia dos testes, os animais foram transportados para uma sala pouco iluminada (40 lux), com atenuação de ruídos e temperatura controlada ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) onde permaneceram em repouso por, pelo menos, 1 h antes do teste.

Trinta min após a última administração de 1400W ou salina, os animais foram individualmente avaliados na caixa claro/escuro (5 min) e, em seguida, no teste do campo aberto (10 min). Depois de cada teste, a caixa claro/escuro e o campo aberto eram limpos com solução de etanol 70%. Todas as sessões comportamentais foram conduzidas durante o período diurno (entre 8:00 e 12:00 horas) e filmadas para análises posteriores utilizando o *software* de análise de imagem ANY-maze (version 1.9; Stoelting, Wood Dale, USA).

### 2.6.1 Caixa claro/escuro

O aparato utilizado foi uma caixa de madeira (80x40x20 cm) dividida em dois lados iguais (40x40x20 cm) por uma barreira que apresenta uma abertura de (8x12 cm), por onde os animais passam para transitar entre os dois lados a caixa. Um dos compartimentos é preto e escuro, e o outro branco e bem iluminado (Figura 7). Os animais foram colocados no meio do compartimento claro, de frente para o lado escuro, e foi permitido explorar livremente o aparato por 5 min. A latência (em segundos) para entrar no compartimento escuro com as 4 patas, e a porcentagem do tempo total gasto no lado claro foram avaliadas. O compartimento claro representa um ambiente aversivo a roedores, que preferem o escuro. Assim, um aumento nestes parâmetros sugere um efeito ansiolítico do tratamento testado, ao passo que uma diminuição reflete um efeito ansiogênico. O número de transições entre

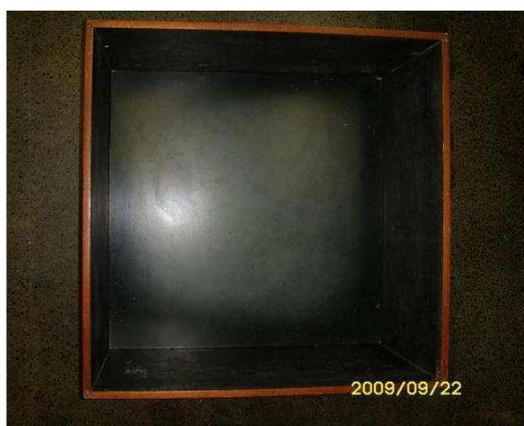
os lados do caixa (cruzamentos) também foi observado. A diminuição do número de cruzamentos pode indicar uma diminuição do comportamento voluntário e ser interpretada como efeito ansiogênicos.



**Figura 7:** Fotografia representativa da caixa claro/escuro. Foto: Vivian T. Bonassoli.

### **2.6.2 Campo aberto**

Após o teste da caixa claro/escuro, cada animal foi imediatamente avaliado por 10 min no campo aberto, que consiste de uma caixa preta de madeira (80x80x50 cm) (Figura 8). O software ANYMAZE® detectou a posição do animal no aparato e calculou a distância percorrida (em metros), que neste teste é proporcional á atividade locomotora.



**Figura 8:** Fotografia representativa do campo aberto. Foto: Vivian T. Bonassoli.

Após os testes comportamentais (grupos Controle e Abstinente) ou após a última exposição ao etanol (grupo Intoxicado), cada grupo experimental foi aleatoriamente dividido, sendo a metade dos animais destinada à perfusão para fixação e coleta de tecido cerebral para realização de imunohistoquímica para detecção de OX-42 e de iNOS, e, o restante dos animais, destinado à coleta de tecido cerebral a fresco, para dosagem de citocinas.

Uma vez que resultados comportamentais significativos foram obtidos para o grupo Abst + 1400W 1,5 µg/Kg, apenas este grupo teve seus cérebros processados para imunohistoquímica e dosagem de citocinas. Um esquema representativo das análises realizadas e dos grupos experimentais envolvidos em cada etapa do experimento é descrito no quadro 1.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TESTES COMPORTAMENTAIS	EXPRESSÃO DE OX-42	EXPRESSÃO DE INOS	DOSAGEM DE CITOCINAS
Controle	Sim	Sim	Sim	Sim
Intoxicado	--	Sim	Sim	Sim
Abstinente + Salina	Sim	Sim	Sim	Sim
Abstinente + 1400W 0,75	Sim	--	--	--
Abstinente + 1400W 1,5	Sim	Sim	Sim	Sim
Abstinente + 1400W 3,0	Sim	--	--	--

**Quadro 1:** Esquema representativo das análises realizadas e dos grupos experimentais envolvidos em cada etapa do experimento. As doses de 1400W equivalem a µg/kg.

## 2.7 PERFUSÃO

Após a última exposição ao etanol (grupo Intoxicado) e a realização dos testes comportamentais (grupos Abst e Controle), os animais destinados à imunohistoquímica foram anestesiados profundamente com uma *overdose* de tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo) e perfundidos transcardiacamente com solução tampão de fosfato de sódio (PBS) 0,01M (fosfato monossódico 0,01M em cloreto de sódio 0,9%), seguida de solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS 0,01M. Os cérebros foram retirados e pós-fixados na mesma solução por 2 horas. Então, foram mergulhados em solução de sacarose 30% em PBS 0,01M por um período de 4-7 dias para crioproteção,

depois do qual foram congelados. Após este período, os cérebros foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80° C até o momento da realização dos cortes.

## 2.8 IMUNOHISTOQUÍMICA

As reações imunohistoquímicas permitem localizar antígenos (proteínas) em uma amostra de tecido e manter seu contexto anatômico. Essa técnica explora o princípio de ligações específicas entre antígenos e anticorpos específicos, e apresenta vantagens como sensibilidade e especificidade significantes, ampla aplicabilidade e fácil correlação com parâmetros físicos tradicionais (BASSOTTI et al., 2007).

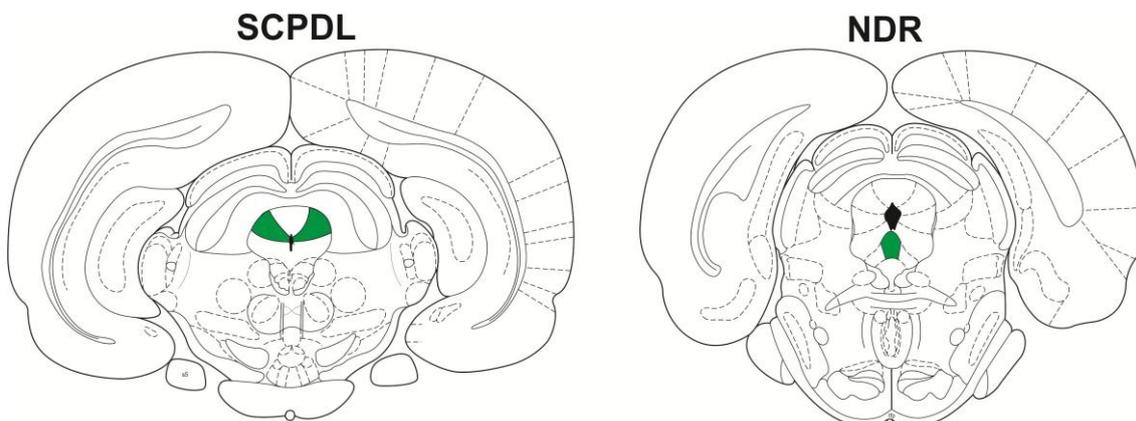
As análises imunohistoquímicas foram processadas nas secções coletadas de animais dos grupos Controle, Intoxicado, Abst + Sal e, Abst + 1400W 1,5 ug/kg.

### 2.8.1 Estruturas cerebrais analisadas

Foram realizados cortes coronais em criostato Leica (CM 1850, Alemanha), obtendo-se secções de 40µm ao longo da extensão rostro-caudal da SCPDL e NDR. Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento, de modo que as análises histológicas fossem realizadas em secções comparáveis ao longo de cada estrutura.

A nomenclatura e o limite anatômico das estruturas analisadas foram baseados em fotografias e figuras representativas do atlas de cérebro de rato (PAXINOS; WATSON,1997). As estruturas analisadas e suas coordenadas anteroposteriores (AP) a partir do bregma foram as seguintes (Figura 9):

- Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPDL) (AP: -6,04 à -6,80 mm);
- Núcleo dorsal da rafe (NDR) (AP: -7,30 à -8.00 mm).



**Figura 9:** Diagramas representativos das estruturas analisadas (modificado de Paxinos e Watson (1997). Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPDL), e núcleo dorsal da rafe (NDR).

### 2.8.2 Técnica

O anticorpo OX-42 reconhece receptores C3 (CR3) do sistema complemento em fagócitos mononucleares como micróglia e é utilizado como um marcador específico de hiperativação destas células. Em condições de estresse, ocorre ativação de vias de sinalização intracelular, com consequente aumento da expressão destes receptores, caracterizando o estado de ativação da microglia (LING et al., 1990).

O anticorpo anti iNOS se liga à isoforma induzida da NOS, expressa por micróglia e astrócitos, células residentes responsáveis pela resposta imune no cérebro

A realização da técnica teve início com a recuperação antigênica, onde as secções foram aquecidas em solução citrato de sódio com pH 6.0 em banho Maria a 50°C durante 30 min e, em seguida, arrefecidas por mais 30 min. Terminada a recuperação, as secções foram lavadas (3 X de 5 minutos) com PBS 0,01M, contendo 0,15% de Triton X-100 (PBST) para, por meio de sua atividade detergente, tornar a membrana celular permeável, melhorando o acesso do anticorpo ao antígeno. O bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos foi realizado em solução de albumina de soro bovino 2% em PBST (BSA - Sigma Chemicals, St. Louis, MO) por 2 horas e, em seguida, as secções foram incubadas com anticorpo primário *overnight*.

Para avaliar a ativação microglial, o anticorpo primário utilizado foi OX-42, produzido em camundongo (1:500, *mouse* OX-42, Santa Cruz Biotechnology). No dia seguinte, as secções foram lavadas (3 X de 5 minutos) e, em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-camundongo produzido em coelho (1:500, *rabbit anti-mouse* IgG, Santa Cruz Biotechnology) por 2 h.

Para avaliar a expressão da iNOS, as secções foram incubadas (anticorpo policlonal de coelho anti iNOS (1:1000, *rabbit* anti iNOS, Abcam®). No dia seguinte à incubação, as secções foram lavadas (3 x de 5 minutos) e, então, incubadas em anticorpo secundário biotilado anti-coelho (1:500, *mouse anti rabbit*, Santa Cruz Biotechnology) também por 2 h.

Para aumentar a visualização da ligação foi empregada a revelação com marcadores enzimáticos ou método de marcação indireta onde, o anticorpo secundário carrega um marcador, nesse caso, a biotina. Em seguida, os tecidos foram incubados durante 2 horas em solução com o complexo avidina - peroxidase biotilada (solução A e B, Kit ABC, Vectastain, Vector Laboratories®), onde a avidina se liga às moléculas de biotina do anticorpo secundário. Esta solução foi preparada 30 min antes do uso para permitir a formação do complexo. Após a incubação com ABC, as secções foram lavadas em PBST (1 X de 5 minutos), e em Trisma Base 0,25 M, pH 7,4 (TB) (3 X de 5 minutos). Após as lavagens, a atividade da enzima peroxidase foi revelada por adição do cromógeno tetrahidroclorato de 3,3 diamino-benzidina 10mg (DAB) contendo 3µl peróxido de hidrogênio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30V (diluídos em 20ml de TB 0,1M, pH7,4), durante aproximadamente 10 minutos. Esta revelação ocorre por uma reação de oxidação, formando um composto insolúvel fortemente corado em marrom-róseo e eletrodenso, que se precipita, marcando assim o sítio do complexo antígeno – anticorpo.

As reações imunohistoquímicas para OX-42 e iNOS foram reveladas utilizando o realçador cromógeno sulfato de níquel. Este, adicionado à DAB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> forma um composto insolúvel fortemente corado em preto-azulado e eletrodenso (HOFFMAN et al., 2008). Depois de revelada a reação, as secções foram lavadas (3 X de 5 minutos) em TB, e finalmente, as secções foram distendidas em lâminas previamente gelatinizadas, onde permaneceram secando por três dias. Depois de secas, as lâminas foram desidratadas através de uma série de álcoois (70%, 80%, 90% e 100%, 3 minutos cada), clareadas no xilol (3 X de 3 minutos) e cobertas com *PermOUNT*® e lamínulas.

### 2.8.3 Quantificação

A presença de CR3 evidenciada pela marcação de OX-42 ocorreu em toda extensão da célula, incluindo o corpo celular e seus numerosos prolongamentos. A característica difusa da imunorreatividade à OX-42 (OX-42-IR) impossibilitou a quantificação manual do número de células positivas. Assim, a técnica utilizada para quantificação deste marcador foi a análise da densidade óptica integrada (DOI). Para tal, as secções processadas foram fotomicrografadas e analisadas quantitativamente por DOI das marcações positivas de OX-42. Para isso, todo processo imunohistoquímico seguiu regras de padronização e todas as revelações, de cada anticorpo, foram realizadas no mesmo ensaio, durante o mesmo tempo, e a partir da mesma solução reveladora.

As fotomicrografias foram realizadas utilizando um microscópio óptico (Leica DM 2500, Alemanha), equipado com uma câmera (Leica Camera Diagnostics, Alemanha) acoplada a um sistema computadorizado de captura e análise de imagem (Leica Application Suite 4.3, Alemanha). O aparelho permite captura de imagens de qualidade, sem perda de informações importantes para validação dos dados.

A qualidade das imagens capturadas permitiu a análise de resultados precisos e reprodutíveis, pois todos os padrões de luminosidade, foco e objetiva (40x) utilizada foram previamente estabelecidos e mantidos em todas as capturas. As imagens obtidas foram analisadas pelo *software* ImageJ v1.46r que permitiu a avaliação por DOI. Para análise das estruturas de interesse, SCPDL e NDR, foram delimitadas áreas pré-definidas, de forma que abrangessem toda a região em questão. Para a SCPDL, estrutura de ocorrência bilateral, a média dos valores dos dois hemisférios foi calculada. O *software* utilizado transformou cada imagem para escala de cinza, o *background* foi descontado, e a DOI foi obtida.

Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média (EPM) de 3 secções por estrutura, por animal.

A imunorreatividade à proteína iNOS (iNOS-IR) foi visualizada como coloração escura no citoplasma e prolongamentos principais das células que expressaram esta proteína, permitindo a visualização de cada célula marcada individualmente. A característica mais localizada deste tipo de marcação possibilitou a quantificação manual do número de células iNOS-IR positivas, com o auxílio do *software* ImageJ®.

As secções foram fotomicrografadas utilizando-se um microscópio óptico (Olympus BX41, America Inc., Estados Unidos), equipado com uma câmara de vídeo (Olympus Q-Color 3, America Inc., Estados Unidos) acoplada a um sistema de captura e análise de imagem computadorizado (Image ProPlus). As regiões de interesse foram quantificadas em áreas pré-estabelecidas (as mesmas utilizadas para a análise da OX-42-IR). Os resultados foram apresentados como número de células iNOS-IR por área (0,1 mm<sup>2</sup>). Para a quantificação foi utilizada a objetiva de 40 X.

## 2.9 DOSAGEM DE CITOCINAS

A dosagem das citocinas foi realizada por meio da metodologia Luminex™ xMAP (MAP = Perfil de Múltiplos Analitos), utilizando *kit* Milliplex (Millipore). Para a leitura, foi utilizado o leitor MagPix (MagPix Analyser) com *software* Xponente versão 4.2 / Analis (LUMINEX CORPORATION, 2011).

A Tecnologia Luminex™ xMAP envolve um processo que cora microesferas de poliestireno com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas destes dois fluoróforos, podem ser criados diferentes conjuntos de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex (LUMINEX CORPORATION, 2011).

Os *kits* MILLIPLEX™ contem estas microesferas e se fundamentam no imunoensaio. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, Estreptavidina-Ficoeritrina (PE) ligado ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal em cada microesfera (LUMINEX CORPORATION, 2011).

O *kit* utilizado foi adquirido pronto para uso, e continha todos os componentes necessários (incluindo padrões, controles de qualidade, microesferas exclusivas conjugadas a anticorpos, anticorpos de detecção, tampão de ensaio e tampão de lavagem) para ensaio de 96 poços em microplaca de titulação.

Devido à impossibilidade da dissecação da SCPDL e NDR separadamente, por serem estruturas muito pequenas nos ratos e estarem anatomicamente ligadas às regiões adjacentes, as dosagens de citocinas foram realizadas no mesencéfalo, menor região cerebral possível de ser dissecada que inclui a SCPDL e o NDR.

Foram quantificados os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias na região mesencefálica de animais dos grupos Controle, Intoxicado, Abst + Sal e, Abst + 1400W 1,5 ug/kg.

### **2.9.1 Coleta da amostra**

Após a realização da análise comportamental ou última exposição ao etanol, os animais foram anestesiados profundamente com uma overdose de tiopental sódico, sacrificados por decaptação e submetidos à sangria. Em seguida, o tecido cerebral foi dissecado e a região mesencefálica foi coletada, congelada em nitrogênio líquido ( $-200^{\circ}\text{C}$ ) e armazenada à temperatura  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise de citocinas.

Neste trabalho, as concentrações de dez citocinas foram determinadas: interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), intérferon gama (IFN  $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ , do inglês: *tumor necrosis factor alpha*) e fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF, do inglês: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*).

### **2.9.2. Técnica**

A técnica teve início com a adição de 25 $\mu\text{L}$  de solução de esferas contendo anticorpos e 200 $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem (TL) em cada poço da placa. O passo seguinte foi aguardar 30 segundos sem o suporte magnético, colocar a placa no suporte por 60 segundos e virar o conjunto (placa + suporte) para baixo, para que o conteúdo dos poços escoasse. Este passo foi repetido entre cada uma das etapas descritas. Em seguida, a placa foi lavada 2 vezes com 200  $\mu\text{L}$  de TL em cada poço, e então foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  tampão de incubação em todos os poços.

Seguindo a descrição da Figura 10, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do branco ou dos padrões diluídos nos poços indicados; e 50  $\mu\text{L}$  de diluente de ensaio nos poços restante (colunas 3 à 12), que foram completados com 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra. A placa foi mantida no escuro sob agitação (1000 rpm) por 2 horas e, em seguida, foi lavada com 200 $\mu\text{L}$  de TL, 2 vezes.

Adicionou-se 50 µl da solução de anticorpo biotilado em cada poço, e a placa foi novamente mantida no escuro sob agitação por 1 h e, em seguida, lavada com 200µL TL 2 vezes. O passo seguinte foi adicionar 50 µL da solução de streptavidina em cada poço da placa que foi mantida no escuro, sob agitação, por 1 hora e, então, lavada 3 vezes com 200µL de TL. Para finalizar, foi adicionado 125 uL do TL, a placa foi agitada por 3 minutos e levada ao aparelho MagPix para leitura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	8	9	11	12
A	B	B										
B	P7	P7										
C	P6	P6										
D	P5	P5										
E	P4	P4										
F	P3	P3										
G	P2	P2										
H	P1	P1										

**Figura 10:** Representação da distribuição das amostras na placa de 96 poços. B: branco (diluinte de ensaio); P7: padrão de concentração mais baixa; P1: padrão de concentração mais alta. Os poços restantes foram utilizados para as amostras em estudo.

Os resultados das citocinas foram expressos em picogramas /mL (pg/mL), sendo que todos os valores negativos ou abaixo dos limites detectáveis foram considerados como zero.

## 2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação do peso dos animais e consumo de etanol, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. O fator independente foi “grupo” (Controle, Intoxicado, Abst + Sal, Abst + 1400W 0,75, 1,5 ou 3,0 µg/kg), e o fator “dias” (1º a 15º dias) foi considerado a medida repetida.

Os resultados dos testes comportamentais, imunohistoquímicas e dosagem de citocinas foram analisados através da análise de variância de uma via (ONEWAY ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Valores de  $p < 0,1$ , foram considerados tendência estatística.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CONSUMO DE ETANOL

A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve diferença significativa no consumo total de etanol entre os grupos experimentais, ao longo do tratamento ( $F_{4,49}=1,03$ ;  $p>0,05$ ). O consumo de etanol na dieta foi de 5,9 à 12,1 g/kg/dia ao longo dos 15 dias de exposição. A ingestão da dieta líquida aumentou progressivamente a partir do 1º dia, até o consumo total do volume oferecido, a partir do 7º dia, até o final do tratamento. O consumo da dieta líquida pelos animais do grupo Controle foi de 100% do volume oferecido (60mL/animal/dia), durante todo o período de exposição.

#### 3.2 PESO CORPORAL

O peso corporal dos animais variou de 270,5 à 321,5 g no começo do tratamento e de 291,5 à 352,0 g no final. Considerando a variação de peso dos animais, estes foram divididos de forma que não se observou diferença entre as médias de peso dos grupos experimentais durante o período de exposição à dieta líquida ( $F_{4,49}=1,33$ ;  $p>0,05$ ).

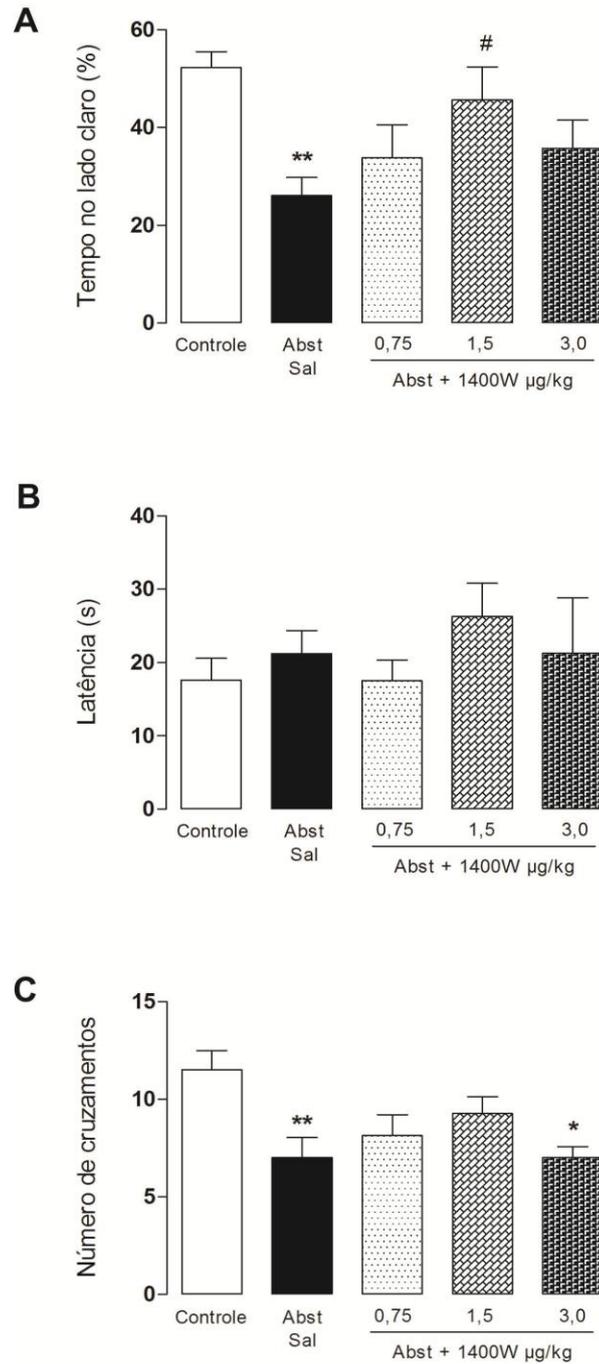
#### 3.3 DOSAGENS DAS CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DE ETANOL

As CSEs dos animais que receberam etanol foram de  $62\pm 2$  mg% durante o período de exposição (grupo Intoxicado). Para os grupos Abst, os níveis observados foram de  $6,0\pm 0,2$  mg%.

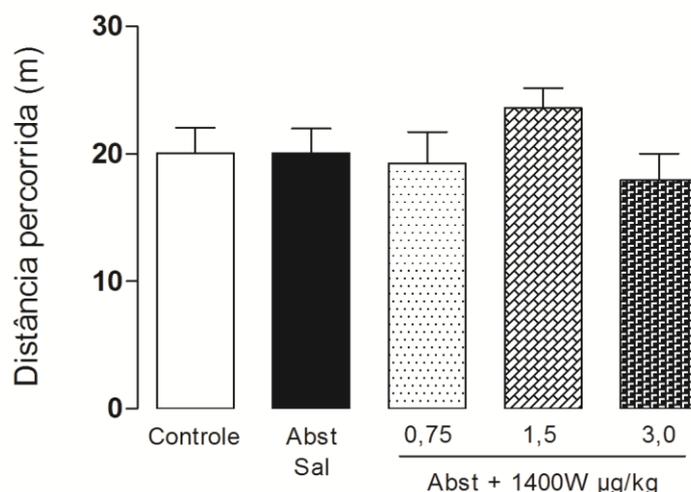
#### 3.4 EFEITOS COMPORTAMENTAIS

A análise de variância de uma via, ANOVA, mostrou que o grupo Abst + Sal apresentou uma diminuição significativa do tempo de permanência no lado claro da caixa claro/escuro, comparado com o grupo Controle, mostrando a validade do protocolo utilizado em induzir a ansiedade após exposição crônica ao etanol, seguida por abstinência por 24h. O tratamento com o inibidor seletivo da iNOS, 1400W, na dose de 1,5 µg/kg (Abst + 1400W 1,5 µg/kg) aumentou significativamente a porcentagem de tempo gasto no lado claro comparado com o grupo Abst + Sal ( $F_{4,49}=4,24$ ,  $p<0,01$ ) (Figura 11 A). A latência para primeira entrada no lado escuro não foi diferente para nenhum dos grupos experimentais ( $F_{4,49}=0,71$ ,  $p>0,05$ ) (Figura 11 B). Por outro lado, quando analisamos o número de cruzamentos entre os lados da caixa claro-escuro, observamos uma diminuição significativa nos grupos Abst + Sal e Abst + 1400W 3,0 µg/kg comparados ao grupo Controle (Figura 11 C).

Em relação à distância percorrida no teste do campo aberto, nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais foi observada ( $F_{4,49}=1,11$ ;  $p>0,05$ ) (Figura 12).



**Figura 11:** Efeitos da administração de 1400W (0,75-3,0 µg/kg i.p.) sobre o tempo de permanência no lado claro (A), latência para primeira entrada no lado escuro (B), e número de cruzamentos entre os lados da caixa claro-escuro (C), em ratos submetidos à abstinência de etanol por 24 h. As colunas representam as médias ± EPMS (8-13 animais por grupo) \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , comparados com o grupo Controle, # $p < 0,05$  comparado ao grupo Abst + Sal. ANOVA seguida por teste de Tukey.



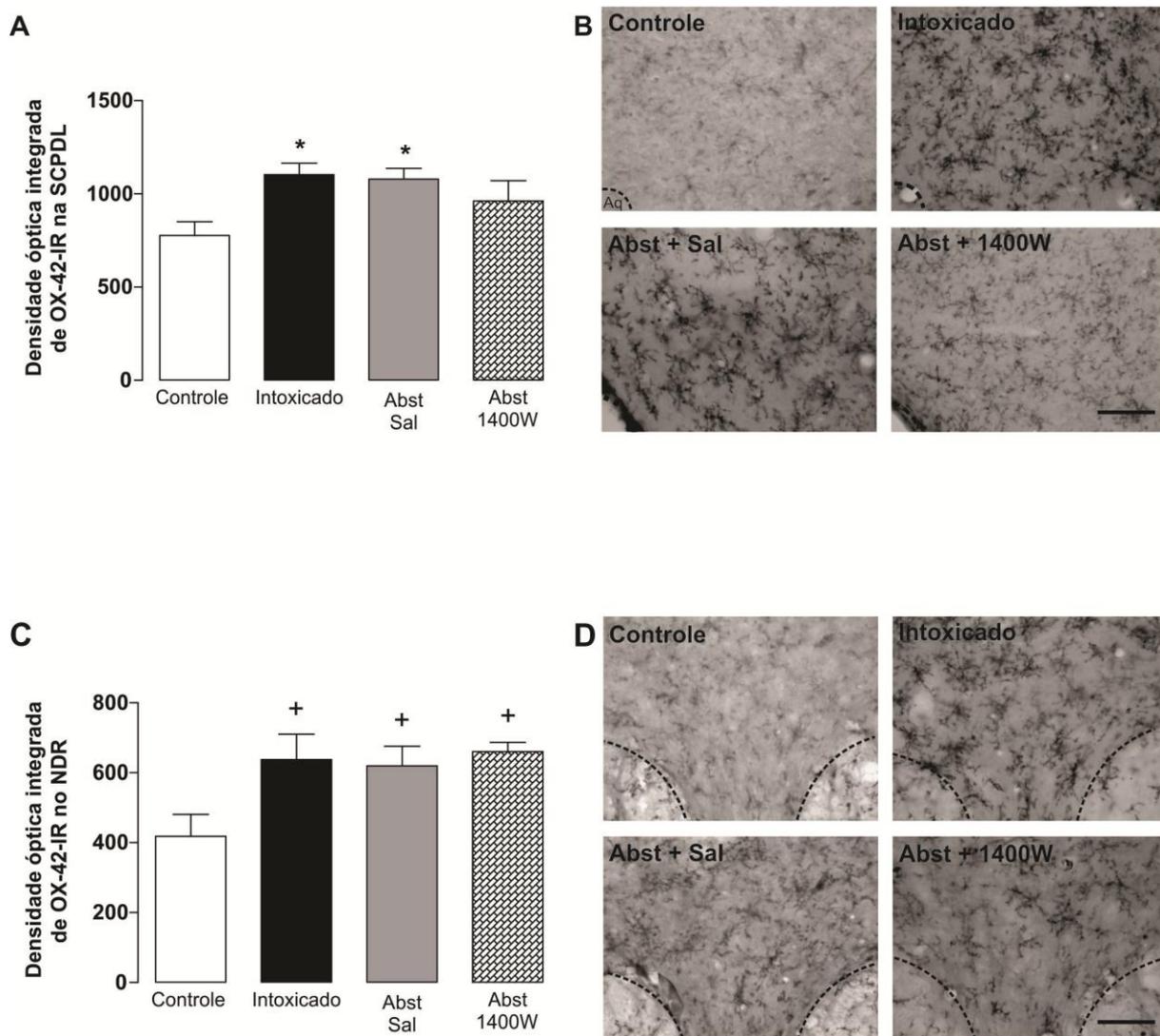
**Figura 12:** Efeito da administração de 1400W (0,75 - 3,0 µg/kg, *i.p.*) sobre a distância percorrida pelos animais no campo aberto por 5 min. As colunas representam as médias ± EPMS (8-13 animais por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. ANOVA seguida por teste de Tukey.

### 3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

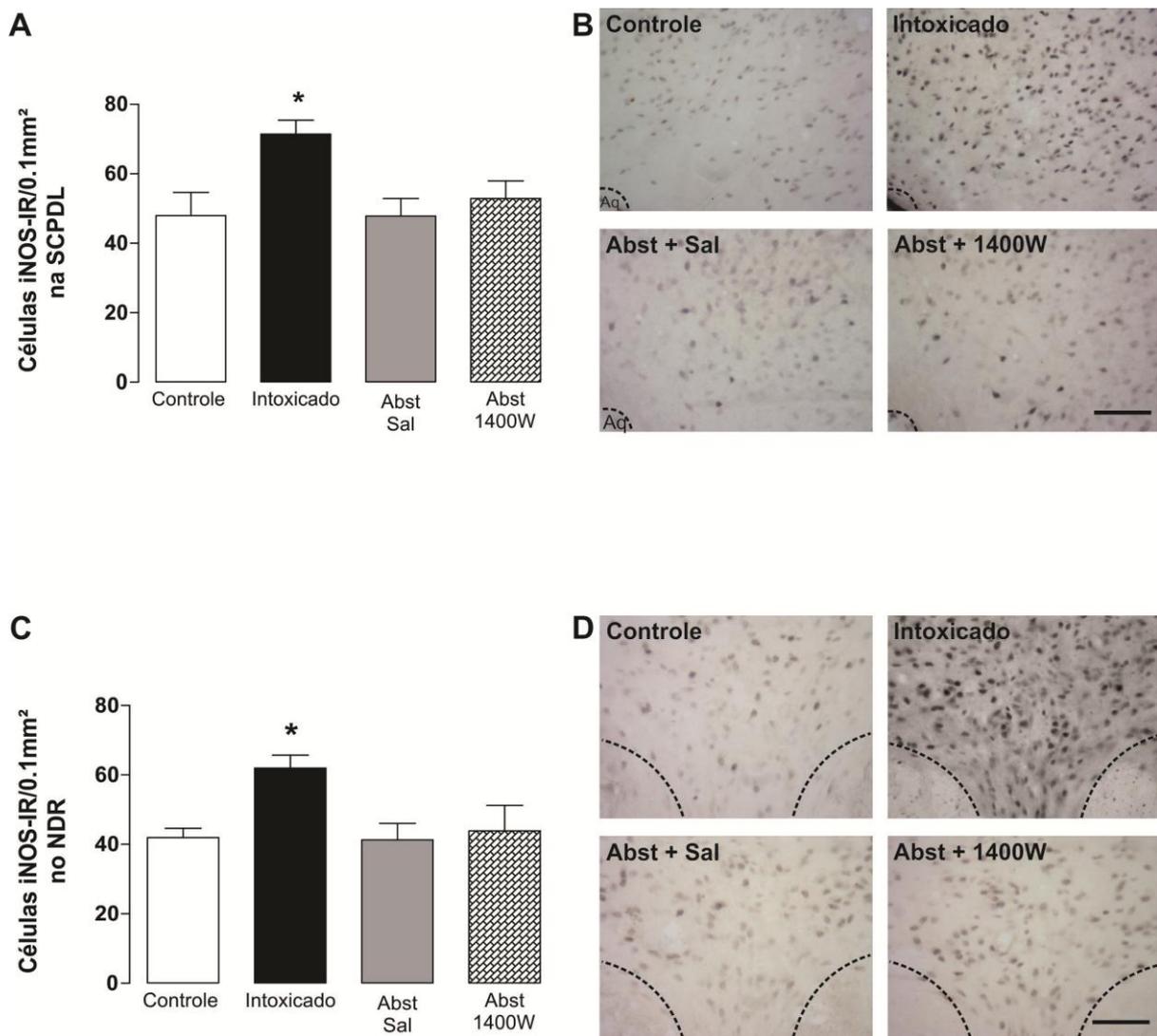
ANOVA detectou uma variação na OX-42-IR na SCPDL, evidenciada pelo aumento da DOI observado nos grupos Intoxicado e Abst + Sal, comparados com o grupo Controle ( $F_{3,19}=3,57$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 13 A e B). Uma variação quantitativa também pode ser visualmente observada, pelo aumento no tamanho das células e formato irregular, consistente com mudanças morfológicas observadas em micróglia ativadas. O grupo Abst+1400W 1.5 µg/kg, não foi estatisticamente diferente de nenhum dos outros grupos experimentais ( $P>0,05$ ) (Figura 13 A).

No NDR, uma tendência de aumento na OX-42-IR foi observada entre os grupos Intoxicado e Abst + Sal e Abst + 1400W, comparados com o Controle ( $F_{3,19}=1,25$ ;  $p<0,1$ ) (Figura 13 C).

Em relação à expressão de iNOS, o grupo Intoxicado apresentou um aumento no número de células marcadas na SCPDL ( $F_{3,19}=5,49$ ;  $p<0,05$ ), bem como no NDR ( $F_{3,19}=3,34$ ;  $p<0,05$ ), comparados com o grupo Controle (e respectivamente). Nos grupos Abst + Sal e Abst + 1400W 1,5 µg/kg, nenhuma alteração foi observada (Figura 14 A e C)



**Figura 13:** Expressão de densidade óptica integrada de OX-42-IR na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPDL) (A) e no núcleo dorsal da rafe (NDR) (C), de ratos durante a intoxicação (Intoxicado), abstinência de etanol com administração de salina (Abst + Sal) ou 1400W 1,5 µg/kg (Abst + 1400W). As colunas representam as médias ± EPMs de 4-6 animais. +  $p < 0,1$  e \* $p < 0,05$  comparado com o Controle (A e C). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da SCPDL (B) e NDR (D). Aqueduto de Sylvius (Aq). Barras horizontais=150µm (B e D)



**Figura 14:** Expressão de iNOS-IR na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPDL) (A) e no núcleo dorsal da rafe (NDR) (C), de animais intoxicados (Intoxicado), abstinentes ao etanol tratados com salina (Abst + Sal) ou 1400W 1,5 µg/kg (Abst + 1400W). As colunas representam as médias ± EPMS de 4-6 animais. \* $p < 0,05$  comparado com o Controle (A e C). Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da SCPDL (B) e NDR (D). Aqueduto de Sylvius (Aq). Barras horizontais=150µm (B e D).

### 3.6 CITOCINAS

A fim de testar o efeito da intoxicação e abstinência de etanol sobre mais um parâmetro de avaliação da neuroinflamação, os níveis de citocinas anti e próinflamatórias foram dosados no mesencéfalo. ANOVA mostrou que não houve variação significativa nos níveis de nenhuma das citocinas estudadas. Os resultados estão sumarizados na tabela 1.

Citocina	Controle	Intoxicado	Abstinente	
			Salina	1400W 1,5µg/kg
IL - 1α	36,09±2,08	34,75±0,71	35,86±2,74	35,54±9,28
IL - 1β	Nd	Nd	Nd	Nd
IL - 2	309,2±5,96	267,9±0,00	289,2±15,66	290,2±76,92
IL - 4	0,75±0,03	0,67±0,03	0,79±0,07	0,85±0,24
IL - 6	118,7±5,82	103,4±5,08	110,6±8,25	104,6±34,29
IL - 10	1349±61,12	1589±66,12	1482±93,76	1630±202,6
IL - 12	122±8,02	105,5±3,86	125,7±11,11	142,2±37,03
TNF α	8,73±0,61	5,19±0,72	13,48±1,93	12,88±6,91
INF γ	Nd	Nd	1,42±1,42	4,41±4,41
GM-CSF	69,47±1,90	59,46±3,36	66,57±4,11	55,90±20,14

**Tabela 1:** Níveis de citocinas (µg/mL) detectados do mesencéfalo de ratos durante a intoxicação e abstinência de etanol. nd = nível abaixo do limite detectável. Dados expressos como média±EPM. Não houve diferença entre os grupos experimentais para nenhuma das citocinas testadas,  $p>0,05$ , ANOVA seguida do Teste de Tukey.

#### 4 DISCUSSÃO

O presente trabalho confirmou que a retirada abrupta do etanol (abstinência) resultou em efeitos tipo-ansiolíticos detectados pela diminuição no tempo dispendido no lado claro, bem como no número de cruzamentos na caixa claro-escuro. Estes efeitos parecem ser independentes da atividade locomotora dos animais, uma vez que não foram detectadas alterações na distância percorrida dos mesmos no campo aberto. O tratamento sistêmico com o inibidor da iNOS, 1400W 1,5 ug/kg, aumentou o tempo gasto pelos animais no lado claro da caixa claro/escuro em relação aos animais abstinentes, o que indica um efeito tipo-ansiolítico do tratamento. Em animais intoxicados com etanol, observou-se um significativo aumento na expressão de OX-42 e iNOS na SCPDL, bem como uma tendência de aumento de OX-42 e um aumento significativo de iNOS no NDR, indicando ativação microglial e produção de NO local, respectivamente. Animais abstinentes apresentaram também significativo aumento na imunoreatividade para OX-42 na SCPDL e uma tendência no NDR. Nenhum efeito significativo foi detectado sobre a expressão de OX-42 e iNOS em animais tratados com o inibidor da iNOS, 1400W, quando comparados ao grupo Abst + Sal. Da mesma forma, nenhuma alteração foi detectada nos níveis de citocinas durante a intoxicação, abstinência ou tratamento de animais abstinentes com 1400W 1,5 ug/kg. Estes resultados indicam que a intoxicação pelo etanol leva à ativação microglial na SCPDL e NDR, a qual se manteve elevada 24 horas após a retirada de etanol. Já a expressão aumentada da iNOS prevaleceu apenas durante a intoxicação nas estruturas avaliadas.

Dentre os diversos testes que detectam os níveis de ansiedade e o possível efeito de drogas ansiolíticas/ansiolíticas, o teste do claro-escuro tem sido considerado um teste adequado para se avaliar efeitos da retirada ou abstinência ao etanol (KLIETHERMES, 2005). Uma diminuição no tempo dispendido no lado claro e no número de cruzamentos da caixa claro-escuro pode indicar efeito tipo-ansiolítico decorrente da abstinência de etanol (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; KLIETHERMES, 2005). De acordo, no presente estudo, animais abstinentes de etanol apresentaram diminuição em ambos os parâmetros acima citados, reforçando a validade do teste escolhido para se avaliar o comportamento tipo-ansioso. A administração de 1400W na dose de 1,5 ug/kg, preveniu os efeitos tipo-ansiolíticos detectados em animais abstinentes, indicando o envolvimento da iNOS na modulação da ansiedade induzida pela abstinência de etanol. No entanto, o efeito do 1400W foi modesto e limitado à dose de 1,5 ug/kg, sendo que doses de 0,75 e 3,0 mg/kg de 1400W, foram ineficazes para alterar o comportamento dos animais. Este perfil de efeitos farmacológicos do 1400W, isto é, uma curva dose-resposta em forma de “U invertido”, ou mesmo, efeito bifásico ou dual, é frequentemente observado com compostos que interferem com a neurotransmissão nitrérgica em diversos modelos animais de ansiedade, depressão e

atividade locomotora (GUIMARÃES et al., 1994; CZECH et al., 2003; MASOOD et al., 2003, DEL BEL et al., 2005). Por exemplo, administração de inibidores da NOS sistêmica ou diretamente na SCPDL ou amígdala medial, pode resultar em efeitos tipo-ansiolíticos (GUIMARÃES et al., 1994; FARIA et al., 1997; VOLKE et al., 1997, 2003; FORESTIERO et al., 2006) ou efeitos tipo-ansio gênicos (QUOCK; NGUYEN, 1992; DE OLIVEIRA et al., 1997; MONZON et al., 2001) em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (para revisão ver DE OLIVEIRA et al., 2001). No tocante aos efeitos dos inibidores da NOS na intoxicação e abstinência ao etanol, a administração sistêmica de L-NAME (inibidor não seletivo da NOS) e do 7-NI (inibidor seletivo da nNOS), diminuíram a gravidade dos sintomas de retirada, inibiram a hiperatividade locomotora e reduziram o desenvolvimento de convulsões audiogênicas em ratos abstinentes (ADAMS et al., 1995; UZBAY et al., 1997). Estes efeitos foram revertidos pela administração prévia do precursor L-Arg. No entanto, foi demonstrado que o 7-NI (20 mg/kg) atenuou os sinais da retirada (tremor e convulsões) somente quando administrado imediatamente após o término da exposição crônica ao etanol (18 dias de inalação de vapor), mas não apresentaram qualquer efeito quando administrado 6,5 h após a retirada (VASSILJEV et al., 1998). Ainda, a administração de 7-NI resultou em aumento do sono em camundongos intoxicados com etanol, o que foi atribuído a um possível efeito farmacocinético deste composto, diminuindo o *clearance* de etanol (POKK et al., 2011). No último estudo, os autores concluíram que a inibição da produção de NO teria efeitos depressores aditivos com etanol quando administrado durante a intoxicação, mas não causaria efeitos comportamentais significativos durante a abstinência.

No presente estudo, testamos a hipótese de que a intoxicação e abstinência ao etanol resultaria em aumento de produção de NO, através da indução da iNOS, e o uso de inibidores da iNOS poderiam resultar em efeitos tipo-ansiolítico. De fato, observamos efeitos tipo-ansiolíticos com a administração de 1400W 24 h após a retirada do etanol, o que concorda com evidências do envolvimento do NO na expressão dos sintomas da abstinência de drogas de abuso. Liu e colaboradores (2012) mostraram que a administração intratecal do inibidor seletivo da iNOS, aminoguanidina, diminuiu os sinais de abstinência à morfina, atenuando a alodinia (sensação dolorosa por estímulos que naturalmente não desencadeiam dor) e a expressão da proteína FOS na medula espinal. Recentemente Abdel-Zaher e colaboradores (2013), mostraram que camundongos tratados com timoquinona, uma substância presente no óleo essencial das sementes de *Nigella sativa*, que apresenta atividade inibidora da iNOS, apresentaram diminuição dos sinais de abstinência à morfina como *jumping*, *rearing*, tremor de patas e bater de dentes, sendo este efeito revertido pela administração concomitante de L-Arg. Juntos, estes resultados indicam que o NO participa na expressão da ansiedade desencadeada pela abstinência a drogas de abuso.

A administração de 1400W resultou em efeitos tipo-ansiolíticos apenas com a dose de 1,5 µg/kg. As razões para a ocorrência destes efeitos são desconhecidas. Sabe-se que as concentrações de NO podem variar de acordo com o estado funcional dos neurônios e a composição do líquido extracelular (CONTESTABILE, 2000). Em altas concentrações, inibidores da NOS podem ser convertidos a L-Arg (HECKER et al., 1990) ou interferir com a eNOS (ESPLUGUES, 2002). Além disto, altas concentrações de NO podem facilitar a liberação de diferentes neurotransmissores. Por exemplo, enquanto baixos níveis de NO estão relacionados com a facilitação, altos níveis podem resultar em redução da liberação de dopamina no estriado. O aumento de NO durante intoxicação e abstinência de etanol, poderia, assim, modular sinapses excitatórias e contribuir para o quadro de ansiedade aumentada observado na abstinência (SEGIETH et al., 2000; CHAPARRO-HUERTA et al., 1997).

Evidências experimentais sugerem que a exposição crônica ao etanol altera a função imune inata, gerando um estado proinflamatório no SNC (CREWS et al., 2011). Aumentos na expressão de iNOS, COX-2, e IL-1 $\beta$  foram detectados em culturas de astrócitos obtidos de córtex cerebral de ratos intoxicados com etanol. Em adição, a exposição ao etanol provocou um aumento tempo-dependente na indução de TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  em cultura de micróglia (FERNANDEZ et al., 2009). Recentemente, tem sido demonstrado que o estado neuroinflamatório induzido pela exposição ao etanol é mesmo exacerbado durante a abstinência. Freeman e colaboradores (2012) observaram uma expressão aumentada de citocinas e iNOS nos núcleos CeA e DVC 48 h após a retirada de etanol. Os autores relacionaram estes efeitos aos sinais autonômicos e comportamentais observados na abstinência. No presente estudo, observamos que durante a abstinência, medida 24 h após a retirada do etanol, apenas a expressão de OX-42 manteve-se aumentada. Nenhuma alteração significativa foi detectada na expressão da iNOS na SCPDL ou NDR de animais abstinentes ou de animais abstinentes tratados com 1400W (Abst + 1400W).

Vários trabalhos têm confirmado ativação microglial durante o consumo e abstinência de etanol (PASCUAL et al., 2007; PASCUAL et al., 2014). Esta ativação foi acompanhada de aumento na expressão de citocinas inflamatórias, detectadas no córtex parietal, córtex entorrinal, hipocampo e cerebelo de ratos após o tratamento crônico e intermitente com etanol (RIIKONEN et al., 2002; ZHAO et al., 2013). A ativação microglial induzida por etanol tem sido relacionada à ativação de receptores *tool-like* (TLR). Em 2010, Alfonso-Loeches e colaboradores demonstraram que, enquanto a ingestão crônica de etanol regula positivamente a ativação de micróglia e astrócitos, iNOS, COX-2 e citocinas, a deficiência de TLR4 em ratas *knockout*, protege contra a ativação glial e a indução de mediadores inflamatórios. A ativação de receptores TLR2 e TLR4 pelo etanol ainda foi capaz de supra regular a expressão dos mesmos em micróglia, levando à ativação destas células e com

consequente aumento da produção de citocinas (BLANCO et al.; 2008; FERNANDEZ-LIZARBE et al., 2008; FERNANDEZ-LIZARBE; MONTESINOS; GUERRI, 2013). Neste sentido, a administração do inibidor da ativação microglial, minociclina, impediu a sedação induzida pelo consumo agudo de etanol e reduziu o consumo da substância por camundongos submetidos ao modelo de dependência por livre escolha (AGRAWAL et al., 2001; WU et al., 2011), indicando o envolvimento da ativação microglial com as alterações comportamentais induzidas pelo consumo de etanol.

A ativação microglial foi acompanhada pelo aumento na expressão de iNOS na SCPDL e no NDR durante a intoxicação. Resultados semelhantes foram descritos por Valles e colaboradores (2004), que também mostraram um aumento nos níveis de iNOS e COX-2 em ratos submetidos à exposição crônica ao álcool. Recentemente, Alfonso-Loeches, Pacual e Guerri (2013), mostraram um aumento nos níveis desta enzima no córtex cerebral de camundongos machos e fêmeas após o consumo crônico de etanol por 5 meses. Estudos em cérebro humano *post mortem* também mostraram um aumento na expressão de marcadores para ativação microglial em várias regiões cerebrais, incluindo o mesencéfalo de alcoólatras (HE; CREWS, 2008).

Ainda que não observado no presente estudo, vários autores têm mostrado um aumento da iNOS também durante a abstinência de etanol. Em 2007, Pascual e colaboradores mostraram um aumento da expressão desta isoforma no neocórtex, hipocampo e cerebelo de camundongos adolescentes 24 h após a interrupção do consumo crônico de etanol. Freeman e colaboradores (2012), observaram ainda um aumento na expressão da iNOS no complexo vagal dorsal, e núcleo central da amígdala de ratos, 48h após a descontinuação da exposição crônica, por 35 dias, à dieta líquida contendo etanol. A razão das discrepâncias observadas entre o presente estudo e os outros acima citados, é desconhecida, mas pode envolver os diferentes métodos de indução de abstinência de etanol, bem como as medidas de citocinas.

Apesar do aumento na ativação microglial da expressão de iNOS terem sido observados na intoxicação, a dosagem das 10 citocinas analisadas no mesencéfalo não mostrou alteração em nenhum dos grupos experimentais quando comparados com o controle, em nenhum dos períodos observados. Estes resultados, embora inesperados, estão de acordo com outros estudos, que não descreveram alteração em nenhuma das 7 citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-13 e MCP-1), determinadas no soro, fígado ou cérebro de ratos adultos tratados com etanol 25% etanol por 4 dias e avaliados 4 e 24 h após a última administração (ZHR et al., 2010). Além de não observarem um aumento, Seo e colaboradores (2004) mostraram ainda que a exposição intermitente ao etanol por 5 dias inibiu o aumento de TNF- $\alpha$  e IL-6 induzido por lipopolissacarídeo bacteriano-LPS, no hipotálamo e hipófise de ratos. Qin e colaboradores (2008) avaliaram os níveis de TNF- $\alpha$ ,

proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), e IL-1 $\beta$  no cérebro, fígado e soro de camundongos, e observaram que o consumo crônico foi capaz de aumentar os níveis de TNF- $\alpha$  e MCP-1 no cérebro, porém o consumo agudo, por si só, não aumentou os níveis de citocinas em nenhum dos tecidos estudados. Além disso, tanto o consumo agudo como crônico foram capazes de aumentar os níveis dos três marcadores induzidos pela administração prévia de LPS. Evidências de aumento nos níveis de citocinas durante a abstinência também foram observadas por Valles e colaboradores (2004), que mostraram um aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  e iNOS no córtex cerebral de ratos tratados com etanol por 5 meses, e em cultura de astrócitos exposta à mesma substância por 7 dias; e Whitman e colaboradores (2013), observaram ainda um aumento no RNAm de TNF- $\alpha$ , MCP- e IL-1 $\beta$  em ratos após consumo crônico de dieta líquida contendo etanol por 15 dias, seguida por 24h de abstinência. No mesmo período se observou ainda um aumento no RNAm de TLR4, mas não de NF-kB que, apesar disso, mostrou um aumento de ligação ao DNA. O consumo agudo ou exposição crônica sem abstinência também foram avaliados pelos autores, porém não apresentaram variação nos parâmetros analisados.

A divergência entre os resultados mostrados nos diversos trabalhos pode ser atribuída a diferenças na região (cérebro, fígado, soro, etc) e material analisados (tecido ou cultura de células), protocolo de exposição e abstinência de etanol, bem como a espécie animal utilizada no estudo. Camundongos podem ser mais susceptíveis à expressão de TNF- $\alpha$  que ratos, uma administração diária pode ser percebida como exposição intermitente, dado o intervalo de 24h entre as doses, e a análise do todo o cérebro pode não ser fiel em revelar uma variação sutil nos níveis de citocinas em núcleos cerebrais específicos. A falta de significância estatística nas análises pode ainda ser atribuída a uma limitação do estudo em relação ao número de animais (n= 4 a 6 por grupo) que, embora tenha sido semelhante a outros estudos (n=4, QIN et al., 2008; n=6 VALLES et al., 2004), pode não ter sido suficiente para detectar a variação neste caso. Adicionalmente, a escolha de apenas uma estrutura, no caso o mesencéfalo, pode ter reduzido a chance de se detectar determinadas variações nos níveis das citocinas avaliadas, possivelmente pela quantidade de material analisado e, em alguns casos, apresentar níveis menores que os limites de detecção da técnica. E por fim, a MCP-1, citocina chave previamente descrita como responsiva ao etanol em estudos com humanos e animais, não foi quantificada neste estudo (HE; CREWS, 2008). Assim, os níveis de citocinas observados no mesencéfalo não foram alterados, porém estes resultados não descartam a participação destes mediadores na neuroinflamação induzida por etanol. É possível que outras citocinas em outras regiões do cérebro não avaliadas, tenham tido seus níveis aumentados. Futuros estudos ampliando as regiões de avaliação e avaliando outras citocinas serão necessários para esclarecer estas questões.

Por fim, os resultados discutidos mostram que a exposição crônica ao etanol induziu a ativação de micróglia e aumentou a expressão de iNOS em regiões cerebrais relacionadas à elaboração de respostas aversivas, reforçando evidências da neuroinflamação durante a intoxicação, e mostrando que estas regiões são, de fato, afetadas por este processo. Um aumento na ansiedade foi observado em animais abstinentes, o que foi revertido pela administração do inibidor seletivo da iNOS, mostrando uma possível relação entre o aumento da expressão desta enzima na intoxicação e alterações comportamentais observadas na abstinência. Os níveis de citocinas observados no mesencéfalo não foram alterados, porém estes resultados não descartam a participação destes mediadores na neuroinflamação induzida por etanol. É possível que outras citocinas em outras regiões do cérebro não avaliadas, tenham tido seus níveis aumentados. Futuros estudos ampliando as regiões de avaliação e incluindo a análise de outras citocinas são necessários para esclarecer estas questões.

## **CAPÍTULO II**

### **EFEITOS DA INIBIÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO INDUZIDO PELA ABSTINÊNCIA DE ETANOL EM RATOS**

---

## 1 INTRODUÇÃO

A substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPDL) é parte de um sistema neural envolvida em inúmeros processos fisiológicos incluindo regulação cardiovascular, modulação da dor e respostas comportamentais a estímulos aversivos (BANDLER; SHIPLEY, 1994). A estimulação elétrica desta região em humanos produz ansiedade, terror, desejo de fuga, palpitação e hiperventilação (NASHOLD; WILSON; SLAUGHTER, 1969, AMANO et al., 1978). Além disso, a estimulação elétrica ou química desta mesma estrutura cerebral em gatos e roedores resulta em respostas autonômicas, somáticas e comportamentais caracterizadas como reações de defesa (BANDLER; CARRIVE 1988; BITTENCOURT et al., 2005). Estas respostas se assemelham muito aos efeitos observados durante a abstinência de etanol em ratos (KLIETHERMES, 2005; CABRAL et al., 2006). A SCPDL também está envolvida em efeitos ansiolíticos de diferentes classes de drogas, incluindo benzodiazepínicos (SCHENBERG; GRAEFF, 1978; RUSSO et al., 1993), que são clinicamente usados para aliviar os sintomas da abstinência ao etanol (CHICK; NUTT, 2012; CLAPP, 2012).

A abstinência ao etanol representa um agente estressor capaz de promover respostas incondicionadas e ativação de várias estruturas cerebrais, em particular aquelas envolvidas na modulação e expressão de comportamentos defensivos e ansiedade tais como o hipotálamo, amígdala e SCPDL (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001; KNAPP et al., 2007; VILPOUX et al., 2009; BONASSOLI; MILANI; DE OLIVEIRA, 2011). Ratos submetidos à estimulação elétrica da SCPDL durante a abstinência de etanol exibiram redução do limiar de estimulação necessário para desencadear respostas de “congelamento” e fuga, bem como diminuição do número e duração de vocalizações ultrassônicas (CABRAL et al., 2006). Neste contexto, a SCPDL tem sido reconhecida como o gatilho mesencefálico para a expressão de ansiedade incondicionada desencadeada por situações aversivas como a abstinência ao etanol (BRANDÃO et al., 1999; LEITE; NOBRE, 2012).

A SCPDL tem uma densa conexão com uma rede de subnúcleos hipotalâmicos como os núcleos hipotalâmicos anterior e ventromedial e núcleo paramamilar dorsal, os quais influenciam as respostas defensivas (CANTERAS; SWANSON, 1992; CAMERON et al., 1995). A SCPDL também compartilha conexões diretas e recíprocas com o núcleo central da amígdala (CeA) (RIZVI et al., 1991), o qual parece mediar comportamentos relacionados à abstinência ao etanol (GILPIN, 2012). O CeA envia projeções inibitórias para o hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal, o que poderia explicar o aumento da ansiedade observada em ratos abstinentes ao etanol.

Evidências sugerem que um aumento na neurotransmissão glutamatérgica deve contribuir para a excitabilidade neuronal na SCPDL durante a abstinência de etanol. Antagonistas de receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) ou ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico administrados na SCPDL bloquearam a susceptibilidade de ratos desenvolverem convulsões audiogênicas durante abstinência ao etanol (YANG et al., 2003; LONG et al., 2007) e diminuíram o consumo voluntário de etanol em ratos abstinentes (LEITE; NOBRE, 2012).

A ativação de receptores NMDA pelo glutamato está relacionada à produção de óxido nítrico (NO) (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988). Esta molécula é sintetizada por enzimas dependentes de nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), denominadas NO sintases (NOSs, do inglês *nitric oxide synthase*), que catalisam a conversão de L-arginina (L-Arg) à L-citrulina e NO (BREDT; SNYDER, 1994). As ações fisiológicas do NO são mediadas principalmente pela estimulação da guanilato ciclase solúvel que, por sua vez, aumenta os níveis de guanosina-3', 5'-monofosfato (cGMP) (SCHUMAN; MADISON, 1991). As NOSs existem em três isoformas: NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS) (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990; MURPHY et al., 1993; FÖRSTERMANN et al., 1995; GUIX et al., 2005). As isoformas nNOS e eNOS são caracterizadas como constitutivas, e suas atividades dependem da  $Ca^{2+}$  – calmodulina. Já a iNOS é uma enzima independente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina que tem sua atividade regulada pela sua síntese, que é induzida por estimulação imunológica ou inflamatória (LYONS; ORLOFF; CUNNINGHAM, 1992; ZHOU et al., 2009).

Estudos funcionais indicam um aumento na produção de NO e na atividade da NOS durante a abstinência de etanol. A administração sistêmica de NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não específico da NOS (MONCADA; HIGGS; FURCHGOTT, 1997), atenua muitos sinais de abstinência de etanol e diminui a ingestão da substância por ratos dependentes de etanol (ADAMS et al., 1995; UZBAY et al., 1997; 2000). Além disso, o pré-tratamento com L-NAME bloqueia o aumento das concentrações de L-citrulina no estriado de ratos durante a abstinência de etanol (GÖREN et al., 2001). A intoxicação e abstinência de etanol também induzem processos inflamatórios no cérebro por meio de estimulação de vias de sinalização intracelular que desencadeiam a indução de citocinas e ciclooxigenase-2 (COX-2) e expressão de iNOS (PASCUAL et al., 2007).

A SCPDL tem sido histologicamente caracterizada pela presença de uma população bem delimitada de neurônios NOS positivos (VINCENT; KIMURA, 1992; ONSTOTT; MAYER; BEITZ, 1993). O NO, nesta região cerebral, parece estar sistematicamente envolvido na modulação de comportamento tipo ansioso em roedores (GUIMARÃES et al., 2005). Injeções intra-SCPDL de inibidores da NOS (GUIMARÃES et al., 1994), inibidores da guanilato ciclase (DE OLIVEIRA; GUIMARÃES, 1999; GUIMARÃES et al., 2005; AGUIAR;

MOREIRA; GUIMARÃES, 2006), e sequestrantes de NO (AGUIAR; MOREIRA; GUIMARÃES, 2006) exerceram efeito ansiolítico, enquanto a administração de doadores de NO na mesma estrutura produziram comportamento de fuga e reações defensivas em ratos (DE OLIVEIRA et al., 2000a). Adicionalmente, a expressão e atividade de NOS aumentou na SCPDL de ratos submetidos ao estresse por contenção (KISHIMOTO et al., 1996; DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000b, 2001; SMALLS; OKERE, 2012) e de ratos que expressam respostas de medo frente um predador (CHIAVEGATTO; SCAVONE; CANTERAS, 1998). Recentemente, Bonassoli e colaboradores (2011) mostraram que neurônios NADPH-d positivos na SCPDL foram ativados 24 e 48 horas após a descontinuação do etanol. Estes autores sugerem que o NO nesta estrutura deve estar envolvido no desenvolvimento e expressão da ansiedade induzida por abstinência ao etanol.

Experimentos utilizando a administração de compostos que interferem com o NO diretamente na SCPDL durante a abstinência de etanol ainda não foram descritos. Dado que o comportamento relacionado à ansiedade deve estar associado com um aumento na transmissão de NO na SCPDL, nós consideramos a hipótese de que este aumento durante a abstinência provocaria um aumento da ansiedade.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de que o NO na SCPDL estaria envolvido na expressão de comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência de etanol em ratos. Considerando que a produção de NO pode ocorrer pela atividade tanto da isoforma constitutiva, nNOS, como da induzida, iNOS, nós testamos os efeitos de inibidores seletivos da nNOS 1-(2-[trifluorometil]fenil)imidazol (TRIM), e da iNOS, dihidroclorato de N-([3-(aminometil)fenil] metil) etanimidamida (1400W), injetados diretamente na SCPDL de ratos durante a abstinência ao etanol.

## 2 MATERIAIS E MÉTODO

### 2.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), pesando 250–300 g, foram mantidos em grupos de três por caixa, sob ciclo claro/escuro de 12/12-h (claro as 7:00 AM) e temperatura de 23±1°C, com livre acesso à água. Os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento para o Cuidado e Uso de animais de Laboratório e aprovados pelo Comitê de ética para experimentação animal local (CEAE 031/2010).

### 2.2 DROGAS

As seguintes drogas e doses foram usadas:

- O sequestrador de NO, 2-(4-carboxifenil)-4, 5, 5-tetrametilimidazol-1-óxido (Carboxi-PTIO; 1, 3, e 10 nmol) (AGUIAR; MOREIRA; GUIMARÃES, 2006 et al., 2006; GUALDA et al., 2011);
- O precursor de NO, L-Arg (100 nmol) (FORESTIERO et al., 2006; SPIACCI et al., 2008);
- O inibidor não seletivo da NOS, L-NAME (50, 100, e 200 nmol) (CALIXTO et al., 2008);
- O inibidor seletivo da nNOS, 1-(2-trifluorometilfenil)-imidazol (TRIM) (40, 80 e 160 nmol) (HALL; BEHBEHANI, 1998);
- O inibidor seletivo da iNOS, dihidroclorato de N-([3-(aminometil)fenil]metil)etanimidamida (1400W) (0,1, 0,3, e 1,0 nmol) (KALINCHUK et al., 2006).

Todas as drogas foram adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, USA) e dissolvidas em salina estéril imediatamente antes do uso. As doses selecionadas foram baseadas em estudos prévios que utilizaram injeções intracerebrais.

### 2.3 ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL

O consumo crônico de etanol se deu por um procedimento forçado de auto administração de dieta líquida contendo etanol (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001; CABRAL et al., 2006; BONASSOLI; MILANI; DE OLIVEIRA, 2011). Os animais tiveram acesso às garrafas (aproximadamente 180ml cada, i.e. 17,1g de Sustagem por 60mL de água por rato por dia) que continham a dieta básica composta por Sustagem M (sabor chocolate: Mead Johnson, São Paulo, Brasil). Esta dieta constitui uma formulação

nutricionalmente completa que fornece proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais minerais, que correspondem a 1.1 kcal/mL. A dieta líquida foi a única fonte de alimento disponível diariamente para os animais, e foi preparada e oferecida diariamente no mesmo horário (14:00 h). Inicialmente, a dieta líquida sem etanol foi disponibilizada para os ratos por 2 dias.

Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos experimentais: Controle e Abstinentes ao etanol. Para o grupo de animais controle, a dieta líquida sem etanol, acrescida de sacarose, foi oferecida até o final do tratamento. Para os grupos abstinentes ao etanol, nos primeiros dois dias de tratamento, a concentração de etanol foi de 6% (vol/vol), a qual foi aumentada para 8% (vol/vol) até o final do tratamento. Os animais receberam etanol por 15 dias consecutivos, seguidos por 24 h de abstinência, em que o etanol foi retirado na dieta por substituição desta pela dieta sem o etanol.

Este método de administração de etanol resulta em concentrações sanguíneas de etanol (CSE) de 80 a 132 mg% durante o consumo de etanol (BALDWIN et al., 1991; CABRAL et al., 2006). Usando o mesmo protocolo, nós também detectamos previamente CSE de  $80 \pm 14$  mg% em ratos tratados com etanol e quantidades muito baixas 24 h após a retirada ( $4 \pm 2$  mg%) (BONASSOLI; MILANI; DE OLIVEIRA, 2011). O peso dos animais foi verificado a cada 2 dias e o volume ingerido foi medido diariamente e expresso em gramas por quilo de animal.

#### 2.4 CIRURGIA E ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS

Seis dias antes do teste comportamental, os animais foram anestesiados com 45mg/kg de tiopental *i.p.* (Thiopentax; Cristália, São Paulo, Brasil) e imobilizados em aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA, USA). Uma cânula guia de aço inoxidável (diâmetro externo de 0.7 mm) foi implantada diretamente na SCPDL de cada animal, tendo o bregma como referência para cada plano estereotáxico (anterior/posterior, 1.7 mm; medial/lateral, 0.7 mm; dorsal/ventral, 4.5 mm), de acordo com o atlas de Painhos & Watson (1997). A ponta da cânula guia foi posicionada 1 mm acima da SCPDL e fixada ao crânio com resina acrílica e dois parafusos de aço inoxidável. Em seguida, foi introduzido um mandril dentro da cânula guia para reduzir a incidência de oclusão. Ao fim da cirurgia, os animais receberam uma dose de antibiótico intramuscular (Pentabiótico, 1 mg/kg; Fort Dodge, São Paulo, Brazil) para prevenir possíveis infecções.

As injeções intracerebrais foram realizadas utilizando agulhas dentais (diâmetro externo de 0,3 mm) 1 mm mais longas que a cânula guia, e no momento da administração, foram conectadas a uma micro seringa de 2 $\mu$ L (7002H, Hamilton, Reno, NV, USA). Cada agulha foi cuidadosamente introduzida na cânula guia e um volume de 0,3  $\mu$ L foi injetado, utilizando a micro seringa controlada por uma bomba de infusão (BI200 Insight

Equipamento, Ribeirão Preto, Brazil). Um cateter de polietileno foi interposto entre a extremidade superior de cada agulha dental e a microseringa. Para tratamentos combinados, os animais receberam a primeira microinjeção de salina ou L-NAME (200 nmol), seguida por uma segunda micro injeção de L-Arg (100 nmol) ou salina 10 min depois.

## 2.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os animais foram divididos em diferentes grupos experimentais de acordo com o tratamento farmacológico. Seis dias após a cirurgia e 24 h após a retirada do etanol, os animais foram transportados para uma sala pouco iluminada (40 lux), com atenuação de ruídos e temperatura controlada ( $23\pm 1$  °C) onde permaneceram em repouso por pelo menos 1 h antes do teste. Eles foram então individualmente avaliados na caixa claro/escuro e, em seguida, no teste do campo aberto 10 min após a administração da droga. Depois de cada teste, a caixa claro/escuro e o campo aberto foram limpos com solução de álcool 70%.

Para confirmar os efeitos comportamentais da abstinência de etanol, dois grupos experimentais não operados adicionais foram incluídos: (1) grupo controle não operado que recebeu dieta líquida sem etanol e (2) um grupo em abstinência ao etanol não operado que recebeu uma dieta líquida com etanol. Todos os procedimentos comportamentais foram idênticos aos conduzidos para ratos operados na SCPDL.

Todas as sessões comportamentais foram conduzidas durante o período diurno (entre 8:00 e 12:00 h) e filmadas para análises posteriores utilizando um *software* de análise de imagem (ANY-maze version 1.9; Stoelting, Wood Dale, USA).

### 2.5.1 Caixa claro/escuro

O aparato consistiu de uma caixa de madeira (80x40x20 cm) dividida em dois lados iguais (40x40x20 cm) por uma barreira com uma porta de (8x12 cm). Um dos compartimentos era preto e escuro, e o outro branco e bem iluminado. Os animais foram colocados no meio do compartimento claro, de frente para o lado escuro, e foi permitido explorar livremente a caixa por 5 min. A latência (em segundos) para entrar no compartimento escuro com as 4 patas, número de transições entre os lados do aparato, e tempo (em segundos) gasto no lado claro foram manualmente contados.

### 2.5.2 Campo aberto

Após o teste da caixa claro/escuro, cada animal foi imediatamente exposto ao aparato do campo aberto que consistiu de uma caixa preta de madeira (80x80x50 cm), por 10 min. O software detectou a posição do animal no campo aberto e calculou a distância percorrida (em metros).

## 2.6 HISTOLOGIA

Após os testes comportamentais, os ratos foram anestesiados com uma *overdose* de tiopental (Thiopentax; Cristália, São Paulo, Brazil) e transcardiacamente perfundidos com salina seguida por uma solução de formaldeído 10%. Os cérebros foram removidos e imersos na mesma solução de formaldeído 10% por no mínimo 3 dias. Utilizando um micrótomo criostato, os cérebros foram cortados e foram obtidas secções coronais de 40 $\mu$ m (Criocut CM 1850; Leica, Bensheim, Germany). As secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas e coradas com corante de Nissl. Em algumas secções adjacentes, foi realizada histoquímica para NADPH-diaforase para visualizar a expressão de neurônios nitrérgicos. Os sítios de injeção foram identificados utilizando o atlas Paxinos e Watson (1997).

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças de peso e consumo de etanol entre os grupos foram analisadas usando análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, sendo o grupo a variável independente e dias (1 a 15) como medida repetida. Os dados obtidos na caixa claro/escuro e no teste do campo aberto foram analisados por teste T de Student's ou ANOVA de uma via. Testes *post hoc* foram realizados utilizando teste de Tukey para comparações múltiplas. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

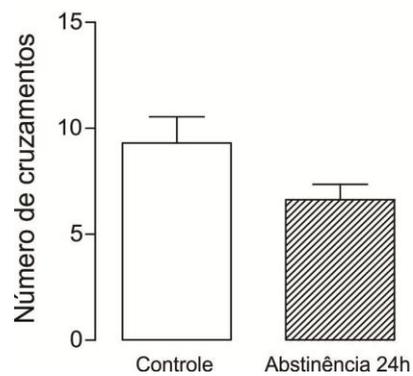
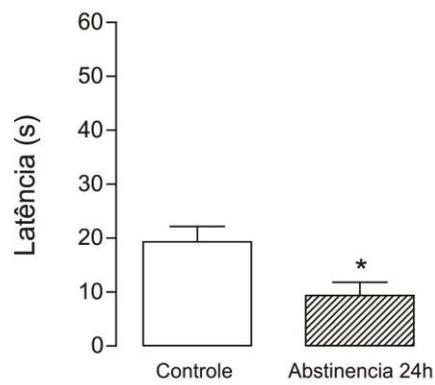
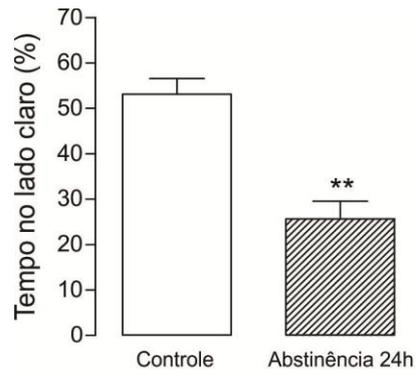
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CONSUMO DE ETANOL E PESO

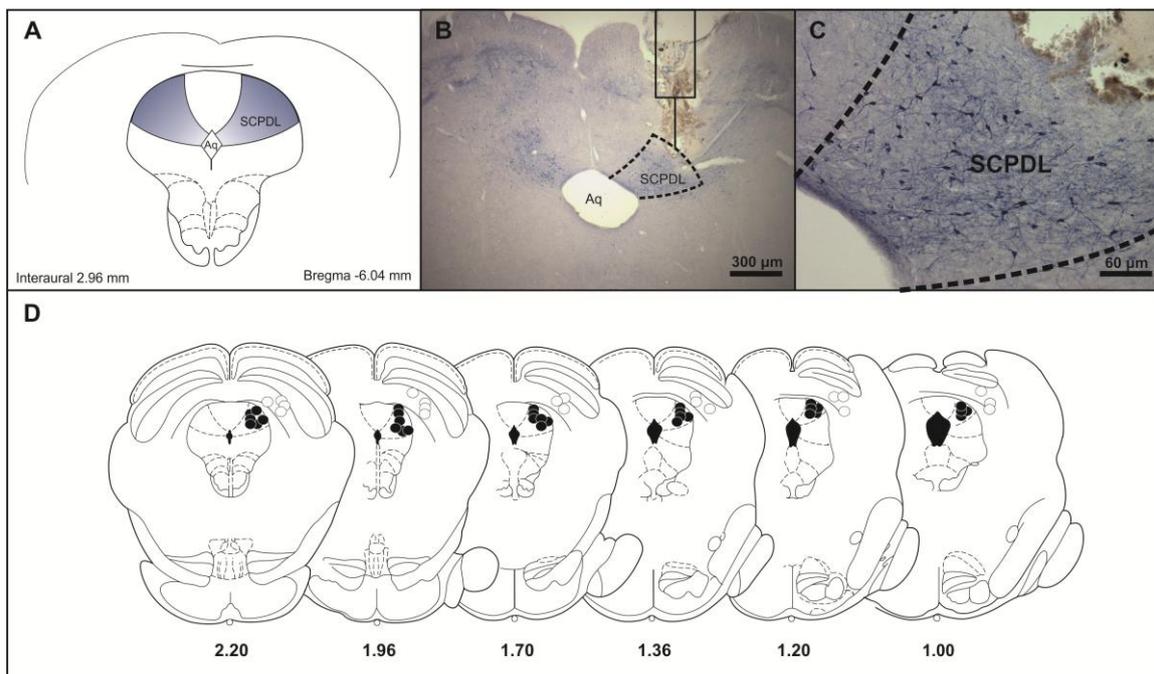
A ingestão diária de etanol variou de 6,4 – 12,6 g/kg/dia ao longo dos 15 dias de tratamento. O peso corporal dos animais variou de 262,5 a 282,7g no início do tratamento a 304,5 – 323,0g após a retirada do etanol. Nenhuma diferença nos pesos corporais foi observada entre os grupos comportamentais ( $F_{14,149}=1,33$ ,  $p=0,19$ ). Foi observada uma interação grupos X dias ( $F_{14,149}=1,79$ ,  $p<0,001$ ). A partir do 7º dia, todos os grupos experimentais apresentaram um ganho de peso comparado ao primeiro dia.

#### 3.2 PADRONIZAÇÃO DO MODELO COMPORTAMENTAL

Como mostrado na figura 15, a abstinência de etanol diminuiu a latência ( $t_{16}=2,57$ ;  $p<0,05$ ) e porcentagem de tempo no lado claro ( $t_{16}=5,33$ ,  $p<0,01$ ) da caixa claro/escuro comparado com o controle. Uma diminuição no número de cruzamentos entre os dois lados da caixa também foi observada nos animais abstinentes comparado com o controle, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa ( $t_{16}=1,74$ ;  $p=0,10$ ). Uma diferença significativa na distância percorrida no campo aberto também foi observada nos animais em abstinência comparados com os controles ( $t_{16}=2,79$ ;  $p=0,02$ ) (Tabela 2). A figura 16 mostra diagramas representativos e fotomicrografias dos sítios de injeção na SCPDL. Os animais que receberam injeções fora da SCPDL foram excluídos da análise estatística.



**Figura 15:** Efeitos da abstinência de etanol sobre a porcentagem de tempo no lado claro, latência para entrar no lado escuro e número de cruzamentos na caixa claro/escuro. Os dados estão expressos como média±EPM (n=6/grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01 comparado com o controle, Teste t de Student.

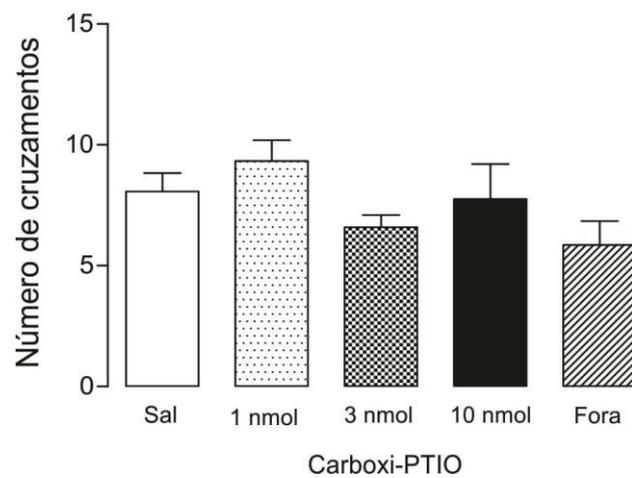
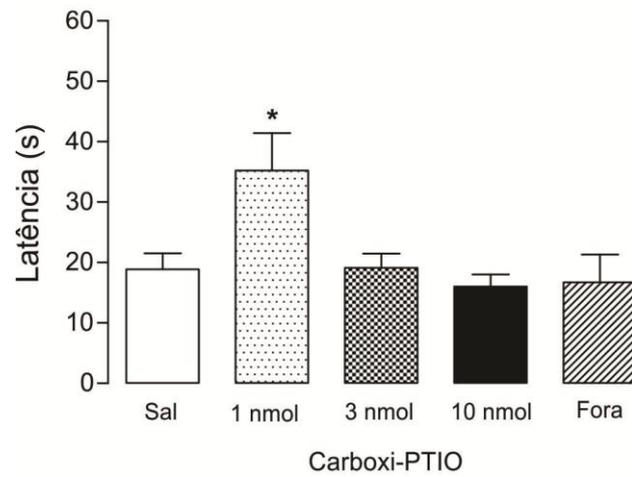
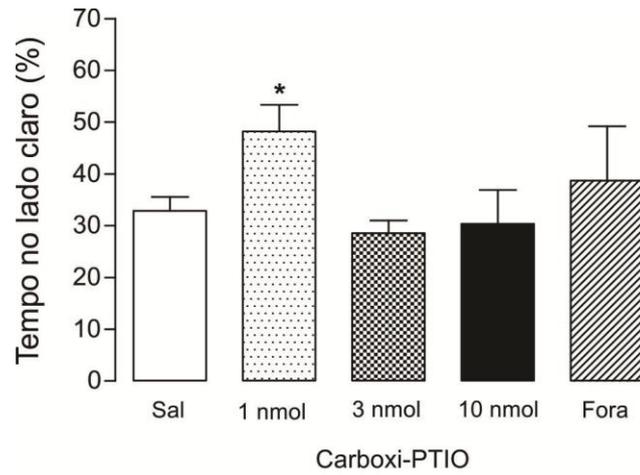


**Figura 16:** Diagrama representativo da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPDL), modificado do Atlas Paxinos e Watson (1997) (A). Fotomicrografias de seções coronais (40µm) de cérebro de ratos com a cânula guia implantada na SCPDL. Nota-se a presença de neurônios NADPH-diaforase positivos que delimitam a coluna dorsal da SCPDL (B e C) Aq: Aqueduto de Sylvius. Diagramas representativos mostrando a localização dos sítios de micro injeção dentro (círculos pretos) e fora da SCPDL (círculos brancos) (D). Os números em cada seção indicam a distância a partir do bregma (PAXINOS; WATSON, 1997).

### 3.3 EFEITOS COMPORTAMENTAIS DE DROGAS QUE ATUAM NOS SISTEMAS NITRÉRGICOS

#### 3.3.1 Carboxi-PTIO

A análise estatística revelou que o sequestrador de NO Carboxi-PTIO (1 nmol) aumentou a latência para primeira entrada no lado escuro da caixa ( $F_{3,43}=2,91$ ;  $p=0,05$ ) e a porcentagem de tempo gasto no lado claro da caixa claro/escuro ( $F_{3,43}=2,72$ ;  $p=0,05$ ) comparado com o grupo salina (Figura 17), indicando que este tratamento diminuiu o comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência de etanol em ratos. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos experimentais em relação ao número de cruzamentos entre os lados da caixa claro escuro ou distância percorrida no teste do campo aberto (Tabela 2).



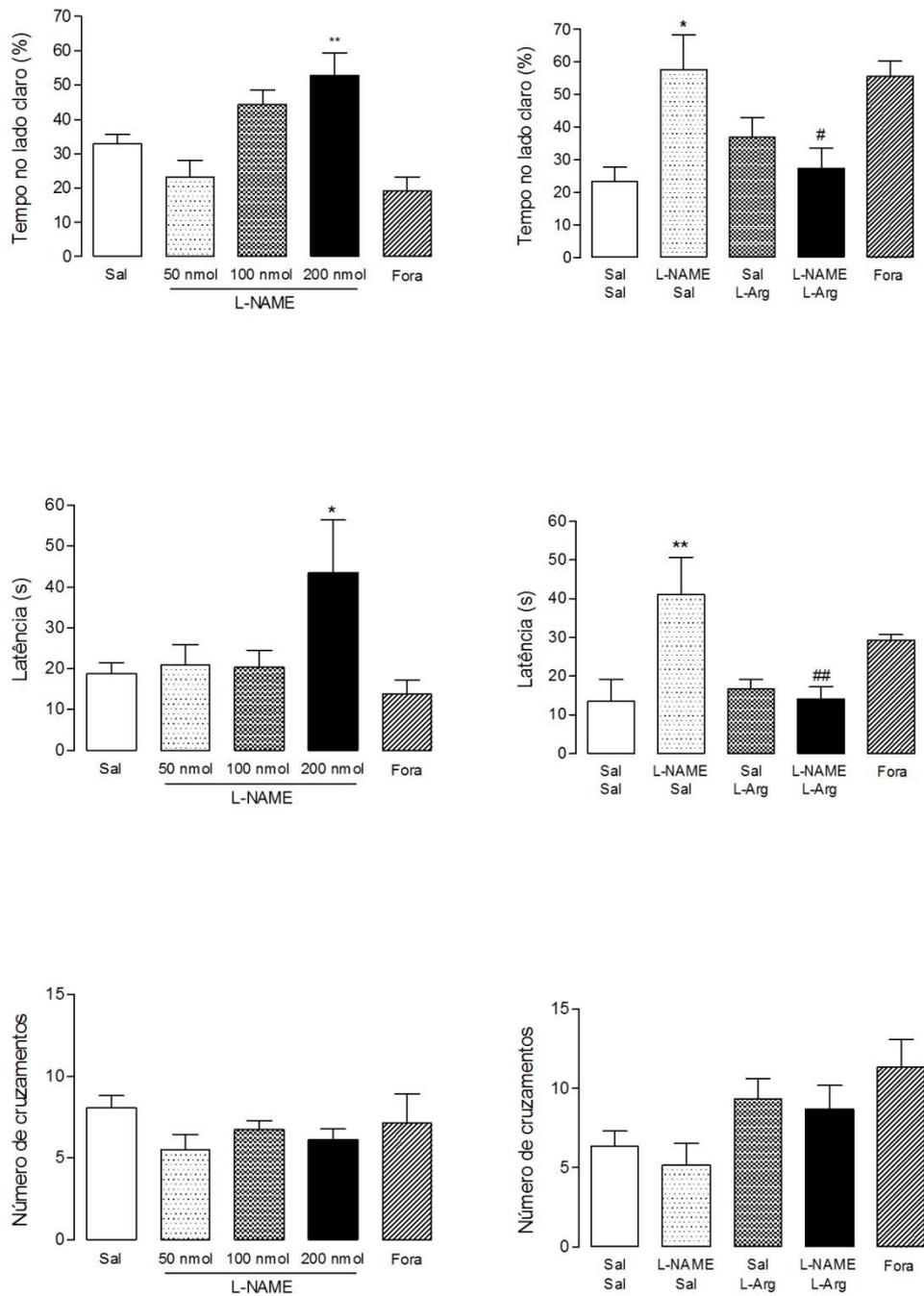
**Figura 17:** Efeitos do Carboxi-PTIO (1nmol) injetado na SCPDL de ratos testados na caixa claro/escuro. Dados estão expressos como médias  $\pm$  EPM (n=8-15 por grupo). Ratos que receberam injeções de Carboxi-PTIO fora da SCPDL (n=7) estão representados com grupo "Fora". \*p<0,05 comparado com o grupo salina (Sal), ANOVA seguida de teste de Tukey.

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Distância percorrida (metros) no campo aberto (média ± EPM)</b>
Controle não operado	46,90 ± 2,36
Abstinente não operado	20,25 ± 5,87 *
Salina	21,08 ± 1,51
Carboxi-PTIO (1 nmol)	14,57 ± 3,47
Carboxi-PTIO (3 nmol)	15,62 ± 2,11
Carboxi-PTIO (10 nmol)	15,13 ± 3,12
Fora	15,11 ± 1,60
L-NAME (50 nmol)	16,92 ± 2,40
L-NAME (100 nmol)	22,58 ± 2,24
L-NAME (200 nmol)	23,74 ± 4,85
Fora	22,49 ± 4,39
Salina + Salina	19,24 ± 2,10
L-NAME (200 nmol) + Salina	18,98 ± 3,22
Salina + L-Arg (100 nmol)	18,04 ± 3,06
L-NAME (200 nmol) + L-Arg (100 nmol)	14,23 ± 2,18
Fora	17,27 ± 3,81
TRIM (20 nmol)	24,38 ± 1,78
TRIM (40 nmol)	19,39 ± 2,81
TRIM (80 nmol)	17,98 ± 2,20
Fora	29,74 ± 5,52
1400W (0,1nmol)	17,81 ± 2,53
1400W (0,3 nmol)	23,85 ± 4,00
1400W (10 nmol)	23,21 ± 2,98
Fora	19,93 ± 2,09

**Tabela 2:** Efeitos do Carboxi-PTIO (1-10 nmol), L-NAME (50-200 nmol), TRIM (20-80 nmol), 1400W (0,1-1,0 nmol), e L-NAME (200nmol) + L-Arg (100nmol) administrados na SCPDL de ratos testados no campo aberto. Os dados estão expressos como média±EPM (n=6-15). Ratos que receberam injeções de compostos ativos fora da SCPDL estão representados nos grupos "Fora" \*p<0,05 comparado com o controle não operado, Teste t de Student.

### 3.3.2 L-NAME e L-Arg

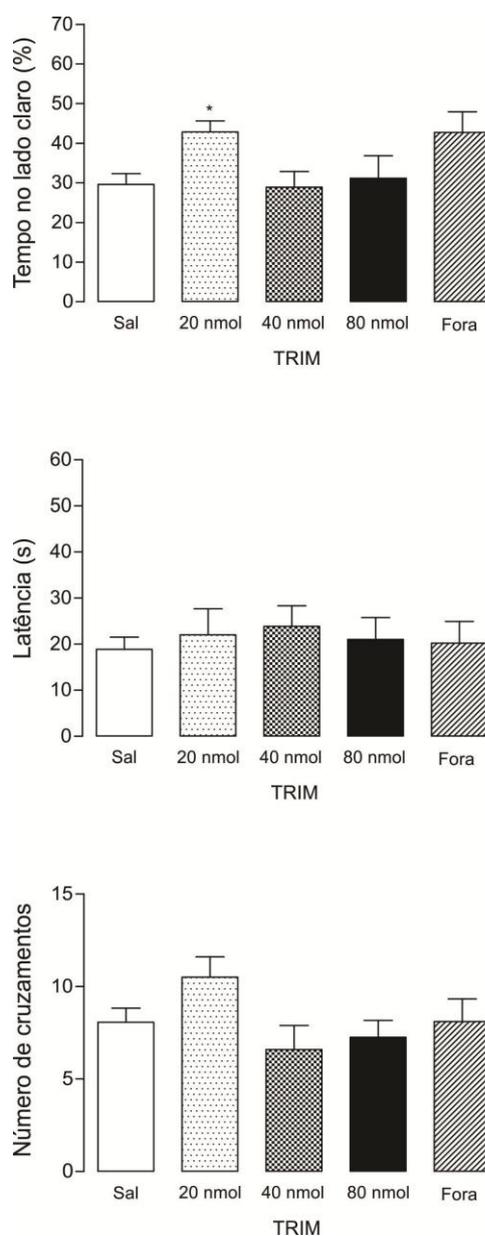
Quando L-NAME foi testado, observou-se que a administração de 200 nmol aumentou a latência para primeira entrada no lado escuro ( $F_{3,46}=3,24$ ;  $p=0,03$ ) e a porcentagem de tempo gasto no lado claro da caixa claro/escuro ( $F_{3,46}=7,93$ ,  $p<0,001$ ) comparado com o grupo salina. Uma tendência para a diminuição do número de transições na caixa claro/escuro também foi detectada ( $F_{3,46}=2,24$ ,  $p=0,10$ ) (Figura 18). Nenhuma diferença significativa foi observada na distância percorrida no teste do campo aberto (Tabela 2). O efeito do L-NAME sobre a latência e a porcentagem de tempo gasto no lado claro foi revertido pela administração de L-Arg ( $F_{3,30}=5,45$ ;  $p=0,005$  e  $F_{3,30}=4,03$ ;  $p=0,017$ , respectivamente), reforçando o envolvimento do NO nos efeitos observados. Nenhuma alteração foi detectada no número de transições e distância percorrida no teste do campo aberto.



**Figura 18:** Efeitos do L-NAME (50-200nmol) ou L-NAME (200nmol) seguido de salina ou L-Arg (100nmol) administrados na SCPDL de ratos testados na caixa claro/escuro. Ratos que receberam injeções de compostos ativos fora da SCPDL (L-NAME n=6, e grupos de tratamento combinados com L-NAME n=3) estão representados como "Fora". Os dados são expressos como média ± EPM (n=8-15 por grupo) e analisados por ANOVA seguido do teste de Tukey. \*p<0,05, \*\*p<0,001 comparado com o grupo Sal ou Sal+Sal e #p<0,05, ##p<0,001 comparado com o grupo L-NAME (200nmol) + Sal.

### 3.3.3 TRIM

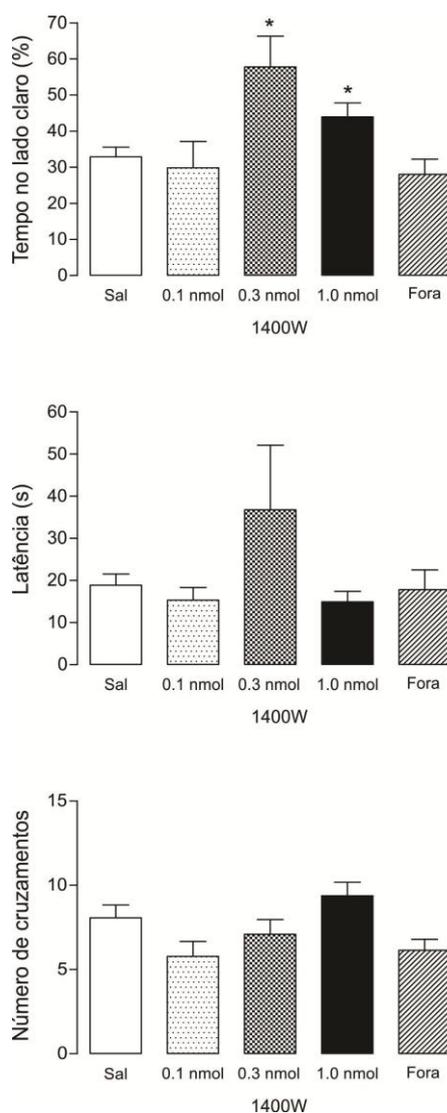
O tratamento com o inibidor seletivo da nNOS, TRIM (20 nmol), aumentou a porcentagem de tempo no lado claro ( $F_{3,42}=3,19$ ;  $p=0,034$ ) (Figura 19). Uma tendência para o aumento no número de transições também foi detectada com a mesma dose ( $F_{3,42}=2,58$ ,  $p=0,07$ ). ANOVA não revelou nenhuma diferença na latência ou distância percorrida no campo aberto comparado com o grupo salina.



**Figura 19:** Efeitos do TRIM (20-80 nmol) administrado na SCPDL de ratos testados na caixa claro/escuro. Ratos que receberam injeções de TRIM fora da SCPDL estão representados no grupo “Fora”. Os dados estão expressos como médias $\pm$ EPM ( $n=8-15$  por grupo) e analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo Sal.

### 3.3.4 1400W

O inibidor seletivo da iNOS, 1400W, na dose de 0,3 e 1 nmol aumentou significativamente a porcentagem de tempo no lado claro da caixa claro/escuro comparado com o grupo salina ( $F_{3,39}=6,26$ ;  $p=0,002$ ). Nenhuma diferença foi observada em relação à latência para primeira entrada no lado escuro, número de transições (Figura 20) ou distância percorrida no teste do campo aberto quando comparado com o grupo salina (Tabela 2).



**Figura 20:** Efeitos do 1400W (0,1-1,0 nmol) administrado na SCPDL de ratos testados na caixa claro/escuro. Ratos que receberam injeções de 1400W fora da SCPDL estão representados pelo grupo “Fora”. Os dados estão expressos como média±EPM (n=7-15 por grupo).\* $p<0,05$  comparado com o grupo Sal, ANOVA seguida do teste de Tukey.

## 4 DISCUSSÃO

A SCPDL tem sido envolvida na expressão do comportamento tipo ansioso observado durante a abstinência de etanol em ratos (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001; YANG et al, 2003; CABRAL et al., 2006; LONG et al., 2007; BONASSOLI; MILANI; DE OLIVEIRA, 2011). Nossos resultados sugerem que estes comportamentos podem ser atribuídos ao aumento dos níveis de NO na SCPDL. No presente estudo, a administração direta na SCPDL de carboxi-PTIO e L-NAME, um sequestrante de NO e um inibidor não seletivo da NOS, respectivamente, diminuíram o efeito tipo ansiogênico da abstinência ao etanol em ratos submetidos ao teste da caixa claro/escuro. Considerando que L-Arg, um precursor do NO, reverteu os efeitos do L-NAME, estes achados reforçam a hipótese de que a produção de NO na SCPDL desempenha um papel na modulação do comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência de etanol em ratos. Nossos resultados demonstraram ainda que a síntese de NO mediada pela iNOS na SCPDL está predominantemente envolvida na expressão da ansiedade durante a abstinência ao etanol.

A interrupção abrupta do consumo de etanol aumenta comportamentos típicos de ansiedade em roedores sujeitos à diferentes testes comportamentais, e pode refletir diferentes aspectos da dependência ao etanol em humanos (KLIETHERMES, 2005). Avaliações comportamentais na caixa claro/escuro mostram manifestação de ansiedade aguda de 10 a 48 h após a descontinuação do etanol (COSTALL; KELLY; NAYLOR, 1988; KLIETHERMES; CRONISE; CRABBE, 2004; KLIETHERMES, 2005). Efeitos tipo-ansiogênicos têm sido caracterizados por uma diminuição da latência para entrar no lado escuro e tempo gasto no lado claro (BOURIN; HASCOËT, 2003). O número de cruzamentos entre os lados da caixa claro/escuro tem sido utilizado como indicador de atividade/exploração e, em geral, sendo este parâmetro diminuído durante a abstinência ao etanol (COSTALL et al., 1993; KLIETHERMES; CRONISE; CRABBE, 2004). Nós verificamos que ratos abstinentes ao etanol exibiram diminuição na latência e tempo gasto no lado claro da caixa claro/escuro 24h após a retirada do etanol comparado com os animais controle. Uma tendência estatística para a diminuição da distância percorrida no campo aberto também foi detectada em animais abstinentes ao etanol, comparado com seus controles.

Estes resultados estão de acordo com resultados prévios (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001; BONASSOLI; MILANI; DE OLIVEIRA, 2011) mostrando que a abstinência ao etanol diminui significativamente a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto. Por outro lado, tendências para o aumento do número de transições na caixa claro/escuro foram observadas após a administração diretamente na SCPDL de TRIM

(20 nmol), L-Arg (100 nmol), ou L-Arg + L-NAME. Este aumento no número de transições na caixa claro/escuro deve indicar uma diminuição no efeito ansiogênico induzido pela abstinência ao etanol.

Os efeitos do NO na SCPDL parecem ocorrer por meio da liberação de mediadores uma vez que a inibição do NO endógeno pelo sequestrante de NO carboxi-PTIO ou inibidores das NOS diminuíram o efeito tipo- ansiogênico induzido pela abstinência ao etanol. Curiosamente, dois perfis de efeito distintos de drogas que interferem com o NO, foram observados em ratos abstinentes ao etanol submetidos à caixa claro/escuro. Os efeitos do sequestrante de NO, carboxi-PTIO, e TRIM foram evidentes somente nas doses mais baixas testadas (i.e., 1 e 20 nmol, respectivamente), e o efeito do inibidor não seletivo da NOS L-NAME e inibidor seletivo da iNOS 1400W, foram obtidos com altas doses (i.e., 200 e 0,1-0,3 nmol, respectivamente). As razões para estas discrepâncias não estão claras. A ausência de efeito de doses altas de TRIM é consistente com estudos prévios que observaram curva dose respostas em forma de U invertido para inibidores da NOS injetados na SCPDL (GUIMARÃES et al., 1994; TONETTO et al., 2009).

Injeções locais na SCPDL de carboxi-PTIO (2 nmol) resultaram em efeito tipo ansiolítico no teste de conflito de Vogel, enquanto um tratamento similar (Carboxi-PTIO, 1 e 3 nmol) falhou em prevenir reações defensivas induzidas pela administração de NMDA diretamente na SCPDL (AGUIAR; MOREIRA; GUIMARÃES, 2006). Além disso, carboxi-PTIO, um potente sequestrante de NO, acentua os efeitos do doador de NO, cloridrato de 3-morfolinossilnomina em cultura de células endoteliais por induzir a formação de peroxinitrito (PFEIFFER et al., 1997). O peroxinitrito pode exercer efeitos fisiológicos semelhantes ao NO, como o relaxamento de músculo liso vascular (LIU; BECKHAN; KU, 1994), inibição da agregação plaquetária (MORO et al., 1994), e estimulação de guanidina monofosfato cíclico (GMPc) solúvel (MAYER et al., 1995). Portanto, se um aumento de peroxinitrito induzido por carboxi-PTIO ocorre na SCPDL de ratos durante a abstinência ao etanol, este efeito poderia neutralizar as propriedades sequestrantes do carboxi-PTIO.

No entanto, não podemos excluir a possível participação de outras moléculas na cascata NO-GMPc e efetores moleculares no comportamento tipo ansioso, induzido pela abstinência de etanol. O GMPc age como um segundo mensageiro, amplificando sinais recebidos por receptores pós-sinápticos e ativando efetores moleculares que resultam em mudanças na expressão gênica e respostas neuronais específicas. Estes aspectos merecem uma investigação mais aprofundada e serão questão de trabalho futuro em nosso laboratório.

Efeitos ansiolíticos e antidepressivos têm sido largamente atribuídos à inibição seletiva da nNOS por 7-NI (YILDIZ et al., 2000), TRIM (VOLKE et al., 2003), e N-propil-L-arginina (MONTEZUMA et al., 2012). Achados pré-clínicos e clínicos, como o aumento da

expressão de nNOS em regiões límbicas de animais estressados (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001) e pacientes depressivos (DE OLIVEIRA; GUIMARÃES; DEAKIN, 2008), têm também ajudado a relacionar a nNOS com comportamentos tipo ansioso e fenótipo depressivo em linhagem de ratos Flinders sensíveis (WEGENER; VOLKE, 2010). Um estudo recente verificou que inibidores da iNOS também induzem um efeito tipo antidepressivo em camundongos (MONTEZUMA et al., 2012).

Apesar da presença das 3 isoformas de NOS no cérebro, o papel de eNOS na ansiedade experimental, incluindo comportamento de ansiedade induzido pela abstinência ao etanol em ratos, ainda não está claro. Uma razão para esta falta de informações é a carência de inibidores de alta afinidade para a eNOS no mercado. A seletividade de alguns inibidores da nNOS tem sido atribuída à presença de interações entre cargas causadas por conformação estendida da nNOS, enquanto que a seletividade dos inibidores específicos da iNOS, pode ser explicada pela formação de um subsítio para ligação (OLIVEIRA et al., 2012). Nossos resultados sugerem que ambas isoformas nNOS e iNOS contribuem para a ação do NO, sendo a iNOS a principal fonte de NO na SCPDL durante a abstinência ao etanol. Isto é consistente com a potência farmacológica de ambos TRIM e 1400W em inibir as isoformas da NOS. TRIM tem sido descrito como um inibidor seletivo da nNOS em cérebro de ratos sob condições fisiológicas normais (HANDY et al., 1996). No entanto, a capacidade do TRIM para inibir tanto a isoforma nNOS ( $K_i = 27 \text{ mM}$ ) como a iNOS ( $K_i = 28,2 \text{ uM}$ ) é equivalente (HANDY et al., 1995). Já o 1400W tem sido considerado ser um inibidor irreversível e específico da iNOS ( $K_i = 7 \text{ nM}$ , ou seja, 5.000 e 200 vezes mais potente sobre iNOS que eNOS e nNOS, respectivamente) (GARVEY et al., 1997). No presente estudo, TRIM foi menos efetivo que o 1400W em diminuir o comportamento de ansiedade induzido pela abstinência ao etanol. No entanto, as ações de ambos, 1400W e L-NAME em ratos abstinentes ao etanol, rendeu perfis de comportamento semelhantes, indicando que a isoforma iNOS na SCPDL pode desempenhar um papel predominante na modulação da ansiedade durante a retirada do etanol.

No cérebro, a produção de NO pode ocorrer como resultado da atividade dominante das isoformas constitutivas nNOS ou iNOS, e a produção de NO pode ser induzida por ambas isoformas sob condições de estresse. Em geral, a super-expressão de iNOS tem sido associada com a presença de processos inflamatórios e infecciosos (GUIX et al., 2005; BROWN, 2007). No entanto, vários estudos têm apontado a expressão constitutiva da iNOS no cérebro e levantam a possibilidade de que o NO derivado de astrócitos participaria de processos fisiológicos (AMITAI, 2010). iNOS foi detectada no hipocampo de ratos jovens e idosos sob circunstâncias basais, em estreita proximidade com células recém formadas (PINNOCK et al., 2007; ADACHI et al., 2010). A expressão de iNOS também tem sido descrita no neocórtex, corpo estriado, amígdala, hipotálamo e tronco cerebral, onde estaria

envolvida na modulação de atividade e transmissão sináptica (AMITAI, 2010). Recentemente, Montezuma e colaboradores, (2012) demonstraram que a inibição seletiva da iNOS, ou a falta desta enzima em camundongos *knockout*, resultava em efeito antidepressivo, o que sugeriu que a síntese de NO mediada pela iNOS poderia estar envolvida na modulação de efeitos comportamentais induzidos por estresse. Adicionalmente, níveis aumentados de iNOS e COX-2 foram descritos no hipocampo, córtex e cerebelo de ratos 24 h após a retirada do etanol após padrão cíclico de exposição. Estes achados foram associados com déficits no desenvolvimento cognitivo e motor (PASCUAL et al., 2007). Níveis elevados de glutamato tem sido diretamente associados com o aumento da expressão de iNOS e ativação glial no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de ingestão aguda de etanol (WARD et al., 2009).

No presente estudo, 1400W administrado diretamente na SCPDL diminuiu o comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência ao etanol. Em conjunto, estes resultados apoiam a hipótese que a produção de NO na SCPDL estaria envolvida na modulação de ansiedade durante a retirada do etanol. Sinais comportamentais da abstinência de etanol em roedores são consequências de processos neuroadaptativos desencadeados pela interrupção do consumo após exposição prolongada ao etanol (COWEN; LAWRENCE, 2006; KLIETHERMES, 2005).

Durante a abstinência de etanol, a transmissão excitatória aumenta na tentativa de manter a homeostase em resposta ao reforço da inibição exercida pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) mediado por etanol (DE WITTE et al., 2003; KOOB, 2004). Evidências crescentes sugerem que o receptor de glutamato NMDA é supra regulado durante a abstinência de etanol, o que tem sido relacionado com a ocorrência de sinais de abstinência ao etanol, como convulsões e comportamento típicos de ansiedade (GRANT et al., 1990; NAGY et al., 2005; KOTLINSKA; BOCHENSKI, 2008).

Um aumento na função glutamatérgica tem sido mostrado durante a abstinência ao etanol em estruturas cerebrais relacionadas ao controle e expressão da ansiedade, como hipocampo (WHITTINGTON; LAMBERT; LITTLE, 1995; DAHCHOUR; DE WITTE, 2003), amígdala basolateral (LÄCK et al., 2007; McCOOL et al., 2010; CHRISTIAN et al., 2012), e leito do núcleo da estria terminal (KASH et al., 2009). A transmissão glutamatérgica aumentada também foi detectada no hipocampo de ratos em abstinência de benzodiazepínicos (VAN SICKLE; XIANG; TIETZ, 2004; DAS et al., 2008). Souza-Pinto e colaboradores (2007), mostraram que a inibição da transmissão glutamatérgica na SCPDL reduz os efeitos ansiogênicos observados em ratos em abstinência de diazepam, um achado que implicou o envolvimento da transmissão excitatória na SCPDL na modulação do estado aversivo induzido por abstinência de benzodiazepínicos. Dada a semelhança entre o mecanismo de ação dos benzodiazepínicos e do etanol, efeitos neuroquímicos semelhantes

poderiam também ocorrer na SCPDL durante a abstinência ao etanol. Contudo, esta hipótese ainda não foi investigada.

Os mecanismos pelos quais o NO influencia a função da SCPDL durante a abstinência de etanol são desconhecidos. A sinalização intracelular do NO envolve a ativação da guanilato ciclase, mas ele também interage com a proteína quinase ativada por mitógenos, proteínas relacionadas a apoptose e cadeia respiratória mitocondrial (GUIX et al., 2005). Na SCPDL, interações complexas entre NO e sistemas glutamatérgicos, gabaérgicos ou serotoninérgicos têm sido relacionadas à modulação da ansiedade (GUIMARÃES et al., 2005; MOREIRA et al., 2012), pressão arterial (CHAITOFF et al., 2012; HALL; BEHBEHANI 1998), e nocicepção (HAMALAINEN; LOVICK, 1997). Recentemente, uma interação entre o NO e sistema canabinóide na SCPDL, atuando na modulação do comportamento defensivo tem sido também proposta (LISBOA; GUIMARÃES, 2012).

Dado o importante papel da ansiedade na etiologia da dependência ao etanol, futuros estudos são necessários para desvendar os mecanismos moleculares específicos através dos quais a transmissão do NO na SCPDL contribui para a ansiedade durante a retirada do etanol.

Em conclusão, o presente estudo mostrou que a inibição da iNOS na SCPDL diminuiu o comportamento de ansiedade induzido pela abstinência ao etanol em ratos, uma observação que reforça o envolvimento do NO na SCPDL na modulação e expressão do comportamento ansioso.

## **CONCLUSÃO GERAL**

---

O presente trabalho mostrou que a exposição crônica ao etanol induziu a ativação de micróglia e aumentou a expressão de iNOS na SCPDL e NDR, estruturas cerebrais relacionadas à ansiedade, reforçando evidências da neuroinflamação durante a intoxicação, e mostrando que estas regiões são, de fato, afetadas por este processo. Os níveis de citocinas analisados no mesencéfalo não foram alterados durante a intoxicação ou abstinência de etanol, porém estes resultados não descartam a participação destes mediadores na neuroinflamação induzida por etanol. É possível que outras citocinas em outras regiões do cérebro não avaliadas neste trabalho, tenham tido seus níveis aumentados. Futuros estudos ampliando as regiões de avaliação e incluindo outras citocinas serão necessários para esclarecer estas questões.

Um aumento no comportamento tipo ansioso foi observado em animais abstinentes, o que foi revertido pela administração sistêmica do inibidor seletivo da iNOS, mostrando uma possível relação entre o aumento da expressão desta enzima na SCPDL e NDR durante a intoxicação e o aumento da ansiedade observado na abstinência.

O presente estudo mostrou ainda que a administração do sequestrador de NO carboxi-PTIO, do inibidor não seletivo da NOS, L-NAME, do inibidor seletivo da nNOS, TRIM e da iNOS, 1400W, diretamente na SCPDL, diminuíram o comportamento tipo ansioso induzido pela abstinência de etanol em ratos, e o tratamento concomitante com o precursor de NO, L-Arg, reverteu o efeito observado com o inibidor não seletivo. Apesar de o efeito ansiolítico ter sido observado com a administração de TRIM, este efeito foi mais expressivo com o tratamento com 1400W. Estes dados reforçam o envolvimento do NO na SCPDL na modulação e expressão do comportamento tipo ansioso na abstinência, e sugerem que, pelo menos em parte, o efeito ansiolítico observado deve ser mediado pela inibição da iNOS.

Considerando o importante papel da ansiedade na etiologia da dependência de etanol, futuros estudos serão necessários para desvendar as estruturas cerebrais envolvidas e os mecanismos moleculares específicos pelos quais a neuroinflamação e o sistema nitrérgico contribuem para a ansiedade observada durante a retirada do etanol.

## REFERÊNCIAS

---

ABDEL-ZAHER, O. A. et al. Inhibition of brain oxidative stress and inducible nitric oxide synthase expression by thymoquinone attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. *European Journal of Pharmacology*, 28;702(1-3):62-70, 2013.

ADACHI, M. et al. Role of inducible or neuronal nitric oxide synthase in neurogenesis of the dentate gyrus in aged mice. *Metabolic Brain Disease*, v.25, p.419–424, 2010.

ADAMS, L. M.; CÍCERO, T. J. Alcohol Intoxication and Withdrawal: The Role of Nitric Oxide. *Alcohol*. v.16, n.2, p.153-158, 1997.

ADAMS, M. L. Nitric oxide-related agents alter alcohol withdrawal in male rats. *Alcohol: Clinical and Experimental Research*, v.19, n.1, p.195–199, 1995.

AGRAWAL, R. G. et al. Minocycline reduces ethanol drinking. *Brain Behaviour and Immunity*, v.25 Suppl 1, p.165-9, 2011.

AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, v.83, n.2, p.296–301, 2006.

ALFONSO-LOECHES, S. et al. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *The Journal of Neuroscience*, v.30, p.8285–8295, 2010.

ALFONSO-LOECHES, S.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. Gender differences in alcohol-induced neurotoxicity and brain damage. *Toxicology*, v.311, n.1-2, p.27-34, 2013.

AMANO, K. Single neuron analysis of the human midbrain tegmentum. Rostral mesencephalic reticulotomy for pain relief. *Applied Neurophysiology*, v.41, p.66–78, 1978.

AMAT, J. et al. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nature Neuroscience*, v.8, n.3, p.365-71, 2005.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V), 5<sup>th</sup> edition, 2013. Washington DC, *American Psychiatry Association*, 2013.

AMITAI, Y. Physiologic role for “inducible” nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. *Glia*, v.58, n.15, p.1775–1781, 2010.

ANTHONY, J.C. Consumo nocivo de álcool: dados epidemiológicos mundiais. In : *Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual*. São Paulo: *Minha Editora*, 2009.

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, v.179, n.3, p.641-67, 1978.

BALDWIN, H. A. CRF antagonist reverses the “anxiogenic” response to ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, v.103, n.2, p.227–232, 1991.

BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Research*, v.439, n.1–2, p.95–106, 1988.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends in Neuroscience*, v.7, n.9, p.379–389, 1994.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, v.4, n.7, p.309-38, 1984.

BATISTELA, R. B. Inibição da síntese do óxido nítrico no núcleo dorsal da rafe sobre o efeito ansiogênicos induzido pela abstinência de etanol em ratos. Dissertação de mestrado. *Programa de pós graduação em psicobiologia*, 59p, 2009.

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, n.4, p.347-55, 2006.

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.

BITTENCOURT, A. S. Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience*, v.133, n.4, p.873–892, 2005.

BLANCO, A. M. et al. Ethanol-induced iNOS and COX-2 expression in cultured astrocytes via NF-κB. *Neuroreport*, v.15, p.681-685, 2004.

BLANDER, A.; WISE, R. A. Anatomical mapping of brain stimulation reward sites in the anterior hypothalamic area: special attention to the stria medullaris. *Brain Research*, v.483, n.1, p.2-6, 1989.

BONASSOLI, V. T.; MILANI, H.; DE OLIVEIRA, R. M. W. Ethanol withdrawal activates nitric oxide-producing neurons in anxiety-related brain areas. *Alcohol*, v.45, n.7, p.641–652, 2011.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. (2003) The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, v.463, n.1–3, p.55–65, 2003.

BRANDÃO, M. L. Neurochemical mechanisms of the defensive behaviour in the dorsal midbrain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.23, p.863–875, 1999.

BRASIL, 2007. I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. *Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas*, 2007.

BRAZ, L. G. et al. Clonidina Como Droga Adjuvante no Tratamento da Síndrome de Abstinência Alcoólica em Unidade de Terapia Intensiva. Relato de Caso. *Revista, Brasileira de Anestesiologia*, v.53, n.6, p.802-807, 2003.

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.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, v.347, n.6295, p.768–770, 1990.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry*, v.63, p.175–195, 1994.

BREESE, G. R. et al. Repeated lipopolysaccharide (LPS) or cytokine treatments sensitize ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, v.33, p.867–876, 2008.

BROWN, G. C. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochemistry Society Transactions*, v.35, n.5, p.1119–1121, 2007.

BROWN, J. et al. Binge ethanol-induced neurodegeneration in rat organotypic brain slice cultures: effects of PLA2 inhibitor mepacrine and docosahexaenoic acid (DHA). *Neurochemical Research*, v.2, p.260–267, 2009.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman. Mc Graw Hill , Artmed, AMGH Editora. São Paulo, 2012.

CABRAL A. 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, n.1, p.200–208, 2006.

CALIXTO, A. V. Nitric oxide involvement and neural substrates of the conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. *Behaviour Brain Research*, v.189, n.2, p.341–349, 2008.

CAMERON, A. A. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. I. Ascending projections. *Journal of Comparative Neurology*, v.351, p.568–584, 1995.

CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.89, p.10089-10093, 1992.

CARLINI, E. A. et al. Levantamento domiciliar de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005. Cebrid/Unifesp, São Paulo, 2005.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavior Brain Research*, v.58, n.1-2, p.27-47, 1993.

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.

CHAITOFF, K. A. Effects of inducible nitric oxide synthase blockade within the periaqueductal gray on cardiovascular responses during mechanical, heat, and cold nociception. *Neurological Sciences*, v.33, n.1, p.69–78, 2012.

CHAPARRO-HUERTA, V. et al. Nitric oxide involvement in regulating the dopamine transport in the striatal region of rat brain. *Neurochemistry International*, v.31, n.4, p.607-16, 1997.

CHIAVEGATTO, S.; SCAVONE, C.; CANTERAS, N. S. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. *Neuroreport*, v.9, n.4, p.571–576, 1998.

CHICK, J.; NUTT, D. J. Substitution therapy for alcoholism: time for a reappraisal? *Journal of Psychopharmacology (Oxford)*, v.26, n.2, p.205–212, 2012.

CHIVA-BLANCH, G. et al. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol and Alcoholism*, v.48, n.3, p.270-7, 2013.

CHRISTIAN, D. T. et al. Thalamic glutamatergic afferents into the rat basolateral amygdala exhibit increased presynaptic glutamate function following withdrawal from chronic intermittent ethanol. *Neuropharmacology*, v.65, p.134–142, 2012.

CHUNG, Y. C. et al. MMP-3 Contributes to Nigrostriatal Dopaminergic Neuronal Loss, BBB Damage, and Neuroinflammation in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Mediators of Inflammation*, 11p, 2013.

CLAPP, P. Current progress in pharmacologic treatment strategies for alcohol dependence. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v.5, n.4, p.427–435, 2012.

CONTESTABILE, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Research Reviews*, v.32, n.2-3, p.476-509, 2000.

COSTALL, B. The effect of the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, RS-42358-197, in animal models of anxiety. *European Journal of Pharmacology*, v.234, p.91–99, 1993.

COSTALL, B.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J. The anxiolytic and anxiogenic actions of ethanol in a mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.40, n.3, p.197–202, 1988.

COWEN, M. S.; LAWRENCE, A. J. Alcoholism and neuropeptides: an update. *CNS Neurological Disorders - Drug Targets*, v.5, n.2, p:233–239, 2006.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, v.13, n.2, p.167-70, 1980.

CREWS, F. et al. BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v.30, n.11, p.1938–1949, 2006.

CREWS, F. T.; QIN, L.; SHEEDY, D.; VETRENO, R.P.; ZOU, J. High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biological Psychiatry*, v.73, p.602–612, 2013.

CREWS, F. T.; ZOU, J.; QIN, L. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain, Behavior, and Immunity*, v.25, p.4–12, 2011.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical Microbiology Reviews*, v.10, p.742-780, 1997.

DAHCHOUR, A.; DE WITTE, P. Excitatory and inhibitory amino acid changes during repeated episodes of ethanol withdrawal: an in vivo microdialysis study. *European Journal of Pharmacology*, v.459, n.2–3, p.171–178, 2003.

DAS, P. et al. Increased AMPA receptor GluR1 subunit incorporation in rat hippocampal CA1 synapses during benzodiazepine withdrawal. *Journal of Comparative Neurology*, v.511, n.6, p.832–846, 2008.

DAWS, L. C. et al. Ethanol inhibits clearance of brain serotonin by a serotonin transporter-independent mechanism. *Journal of Neuroscience*, v.26, n.24, p.6431-8, 2006.

DE MARTINIS, B. S. et al. Alcohol distribution in different postmortem body fluids. *Human & Experimental Toxicology*, v.25, p. 93- 97, 2006.

DE OLIVEIRA R. W.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, v.32, n.12, p.1529–1532, 1999.

DE OLIVEIRA, C. L.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, v.56, n.1, p.55-9. 1997.

DE OLIVEIRA, R. M. et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neuroscience Letters*, v.289, n.2, p.123–126, 2000.

DE OLIVEIRA, R. M. W.; GUIMARÃES, F. S.; DEAKIN, J. F. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, v.41, p.333–341, 2008.

DE OLIVEIRA, R. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.25, n.7–8, p.679–685, 2001.

DE OLIVEIRA, R. W.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Research Bulletin*, v.51, n.6, p.457–464, 2000.

DE WITTE, P. Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.27, n.3, p.189–197, 2003.

DEL BEL, E. A. et al. Role of nitric oxide on motor behavior. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v.25, n.2, p.371-92, 2005.

DESCARRIES, L. et al. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *Journal of Comparative Neurology*, v.207, n.3, p.239-54, 1982.

DUNCAN, A. J.; HEALES, S. J. Nitric oxide and neurological disorders. *Molecular Aspects of Medicine*, v.26, n.1-2, p.67-96, 2005.

EL-MAHMOUDY, A. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *International Immunopharmacology*, v.2, n.11, p.1603-11, 2002.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. *British Journal of Pharmacology*, v.135, n.5, p.1079-95, 2002.

EYER, F. Risk assessment of moderate to severe alcohol withdrawal-predictors for seizures and delirium tremens in the course of withdrawal. *Alcohol and Alcoholism*. v.4, p.427–433, 2011.

FARIA, M. S. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *European Journal of Pharmacology*, v.323, n.1, p.37-43, 1997.

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.

FERNANDEZ-LIZARBE, S. et al. Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. *Molecular Immunology*, v.45, n.7, p.2007-16. 2008.

FERNANDEZ-LIZARBE, S.; MONTESINOS, J.; GUERRI, C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *Journal of Neurochemistry*, v.126, n.2, p.261-73, 2013.

FERNANDEZ-LIZARBE, S.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *The Journal of Immunology*, v.7, p.4733–4744, 2009.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 284, 2003.

FLOREANI, N. A. Alcohol-induced interactive phosphorylation of src and toll-like receptor regulates the secretion of inflammatory mediators by human astrocytes. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v.4, p.533–545, 2010.

FORESTIERO, D. et al. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v.184, n.2, p.166–172, 2006.

FÖRSTERMANN U. Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. In: Mayer B, ed. *Handbook of Experimental Pharmacology—Nitric Oxide*. Berlin:Springer, p.71–91, 2000.

FÖRSTERMANN, U. et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochemical Pharmacology*, v.50, n.9, p.71-91, 1995.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function, *European Heart Journal Advance Access*, 2011.

FREEMAN, K. et al. Temporal changes in innate immune signals in a rat model of alcohol withdrawal in emotional and cardiorespiratory homeostatic nuclei. *Journal of Neuroinflammation*, v.9, n.97, 2012.

FULTON D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, v.399, p.597–601, 1999.

GALLASSI, A. D. Custos dos problemas causados pelo abuso do álcool. *Revista Psiquiatria Clínica*, v.35, supl 1; p.25-30, 2008.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell–cell signalling in the nervous system. *Trends in Neurosciences*, v.14, p.60–67, 1990.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endotheliumderived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, v.336, n.6197, p.385–388, 1988.

GARVEY, E. P. et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, v.272, n.8, p.4959–4963, 1997.

GARZÓN, J.; RODRÍGUEZ-MUÑOZ, M.; SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P. Direct association of Mu-opioid and NMDA glutamate receptors supports their cross-regulation: molecular implications for opioid tolerance. *Current Drug Abuse Reviews*, v.5, n.3, p.199-226, 2012.

GILPIN, N. W. Corticotropin-releasing factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY): effects on inhibitory transmission in central amygdala, and anxiety- & alcohol-related behaviors. *Alcohol*, v.46, n.4, p.329–337, 2012.

GÖREN, M. Z. Investigation of extracellular L-citrulline concentration in the striatum during alcohol withdrawal in rats. *Neurochemical Research*, v.26, n.12, p.1327–1333, 2001.

GRAEBER, M. B. Changing face of microglia. *Science*, v.5; n.330. p783-8, 2010.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, v.27, n.4, p.811-29, 1994.

GRANT, K. A. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *European Journal of Pharmacology*, v.176, n.3, p.289-96, 1990.

GRAY, J.A. McNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety. Oxford, England: *Oxford University Press*; 2000.

GUALDA, L. B. et al. 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor modulation of locomotor activity induced by nitric, oxide in the rat dorsal raphe nucleus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.44, n.4, p.332–336, 2011.

GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport*, v.5, n.15, p.1929–1932, 1994.

GUIMARÃES, F. S. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, v.29, n.8, p.1313–1322, 2005.

GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology*, v.76, n.2, p.126–152, 2005.

HALL, C. W, BEHBEHANI, M. M. Synaptic effects of nitric oxide on enkephalinergic, GABAergic, and glutamatergic networks of the rat periaqueductal gray. *Brain Research*, v.805, n.1–2, p.69–87, 1998.

HAMALAINEN, M. M.; LOVICK, T. A. Role of nitric oxide and serotonin in modulation of the cardiovascular defence response evoked by stimulation in the periaqueductal grey matter in rats. *Neurosciences Letters*, v.229, n.2, p.105–108, 1997.

HANDY, R. L. Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2- trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) in vitro: antinociceptive and cardiovascular effects. *British Journal of Pharmacology*, v.119, n.2, p.423–431, 1996.

HANDY, R. L. The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in vitro, in the mouse. *British Journal of Pharmacology*, v.116, n.5, p.2349–2350, 1995.

HE, J.; CREWS, F. T. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Experimental Neurology*, v.210, p.349–358, 2008.

HECKER, M. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.87, n.21, p.8612-6, 1990.

HENEKA, M. T. Temporal, regional, and cell-specific changes of iNOS expression after intrastriatal microinjection of interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v.18, n.4, p.167-79, 2000.

HERMANN, D. M. et al. Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars alpha demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit. B). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v.13, p.1-221, 1997.

HOFFMAN, G. E.; LE, W. W.; SITA, L. V. The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley [et al.]* Chapter 2: Unit 2 12, 2008.

HUNSPERGER, R. W. Affective behavior patterns elicited by electrical stimulation of the brain stem and forebrain. *Journal of Physiology (Paris)*, v.55, p.45-98, 1963.

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 abril, 2014

IZUMI, Y.; CLIFFORD, D. B.; ZORUMSKI, C. F. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science*, v.257, p.1273–1276, 1992.

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.

JOCHUM, T. et al. Impaired cerebral autoregulation during acute alcohol withdrawal. *Drug and Alcohol Dependence*, v.3, p.240–246, 2010.

JOHNSON, M. D.; MA, P. M. Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, v.332, n.4, p.391-406, 1993.

KALÉN, P.; KARISON, M.; WIKLUND, L. Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[H3] aspartate tracing. *Brain Research*, v.360, p. 285-297, 1985.

KALINCHUK, A. V. et al. Inducible and neuronal nitric oxide synthases (NOS) have complementary roles in recovery sleep induction. *European Journal of Neurosciences*, v.24, n.5, p.1443–1456, 2006.

KARAMI, M. et al. Nitric oxide in central amygdala potentiates expression of conditioned withdrawal induced by morphine. *Indian Journal of Pharmacology*, v.46, n.1, p.57-62, 2014.

KASH, T. L. et al. Alcohol exposure alters NMDAR function in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology*, v.34, n.11, p.24,20-25, 2009.

KEAY, K. A.; BANDLER R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.25, n.7-8, p.669-78, 2001.

KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Alcoholism and inflammation: neuroimmunology of behavioral and mood disorders. *Brain Behaviour and Immunity*, v.25, p.13–20, 2011.

KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Alcoholism and inflammation: neuroimmunology of behavioral and mood disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, Suppl 1, p.13-20, 2011.

KISHIMOTO J. et al. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Brain Research*, v.720, n.1–2, p.159–171, 1996.

KLIETHERMES, C. L. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.28, n.8, p.837–850, 2005.

KLIETHERMES, C. L.; CRONISE, K.; CRABBE, J. C. Anxiety-like behavior in mice in two apparatuses during withdrawal from chronic ethanol vapor inhalation. *Alcohol: Clinical and Experimental Research*, v.28, n.7, p.1012–1019, 2004.

KNAPP, D. J. Cytokine involvement in stress may depend on corticotrophin releasing factor to sensitize ethanol withdrawal anxiety. *Brain, Behavior, and Immunity*, v.25, p.146–154, 2011.

KNAPP, D. J. et al. The amygdala regulates the antianxiety sensitization effect of flumazenil during repeated chronic ethanol or repeated stress. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, v.31, n.11, p.1872–1882, 2007.

KNAPP, D. J.; CREWS, F. T. Induction of cyclooxygenase-2 in brain during acute and chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, v.23, n.4, p.633–643, 1999.

KNOWLES, R. G. et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.86, p.5159–5162, 1989.

KOFLER, J.; WILEY, C. A. Microglia: key innate immune cells of the brain. *Toxicologic pathology*, v.39, n.1, p.103-14, 2011.

KOOB, G. F. A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol. *Biochemical Pharmacology*, v.68, n.8, p.1515–1525, 2004.

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.

- KOTLINSKA, J.; BOCHENSKI, M. The influence of various glutamate receptors antagonists on anxiety-like effect of ethanol withdrawal in a plus-maze test in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.598, n.1–3, p.57–63, 2008.
- LÄCK, A. K. Chronic ethanol and withdrawal differentially modulate pre- and postsynaptic function at glutamatergic synapses in rat basolateral amygdala. *Journal of Neurophysiology*, v.98, n.6, p.3185–3196, 2007.
- LARANJEIRA, R. et al. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA) e o seu tratamento. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.22, n.2, p.62-71, 2000.
- LEE, J. J. et al. Roles of protein kinase A and C in the opioid potentiation of the GABA<sub>A</sub> response in rat periaqueductal gray neuron. *Neuropharmacology*, v.44, n.5, p.573-83, 2003.
- LEITE, L. E.; NOBRE, M. J. The negative effects of alcohol hangover on high-anxiety phenotype rats are influenced by the glutamate receptors of the dorsal midbrain. *Neuroscience*, v.28, n.213, p.93–105, 2012.
- LEITE, M. C. P. Alcoolismo – Dependência do álcool. *Informedicals Policlínica*. Disponível em: <http://www.policlin.com.br/drpoli/061/>. Acesso em 12 fev, 2014.
- LEITE-PANISSI C. R. A. et al. Endogenous opiate analgesia induced by tonic immobility in guinea pigs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.34, p.245-250, 2001.
- LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, v.127, p.117-126 2000.
- LING, E. A. et al. Immunocytochemical localization of CR3 complement receptors with OX-42 in amoeboid microglia in postnatal rats. *Anatomy and embryology (Berl)*, v.182, n.5, p.481-6, 1990.
- LISBOA, S. F.; GUIMARÃES, F. S. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray, *Neuropharmacology*, v.62, n.8, p.2455-62, 2012.
- LIU, B.; DU, L.; HONG, J. S. Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.293, n.2, p.607–617, 2000.
- LIU, H. L.; QIAN, Y. N.; LI, X. C. The role of the spinal cord inducible nitric oxide synthase in morphine dependence and naloxone-precipitated withdrawal rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, v.28, n.1, p.49-52, 2012.
- LIU, L.; QIAN, Y. N. The different roles of the spinal protein nNOS and iNOS in morphine naloxone-precipitated withdrawal response. *Neuroscience Letters*, v.536, p.29-34, 2013.
- LIU, S.; BECKMAN, J. S.; KU, D. D. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.268, n.3, p.1114–1121, 1994.
- 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.

LONG, C. et al. Excitatory amino acid receptor-mediated responses in periaqueductal gray neurons are increased during ethanol withdrawal. *Neuropharmacology*, v.52, n.3, p.802–811, 2007.

LUMINEX CORPORATION. Magpix: Manual do utilizador e de instalação do hardware. *Technology Boulevard*, Austin, EUA, 2011.

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

LYONS, C. R.; ORLOFF, G. J.; CUNNINGHAM, J. M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *The Journal of Biological Chemistry*, v.267, n.9, p.6370–6374, 1992.

MA, R.; XU, G.Y. Involvement of *locus coeruleus* and dorsal raphe nucleus in the reduction of intragastric pressure induced by ACR stimulation. *Sheng Li Xue Bao*. 1991.

MAGUIRE, E. P. et al. Extrasynaptic glycine receptors of rodent dorsal raphe serotonergic neurons: a sensitive target for ethanol. *Neuropsychopharmacology*, v.39, n.5, p.1232-44, 2013.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, v.29, n.4-5, p.829-41, 2005.

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.

MASOOD, A. et al. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.458, n.1-2, p.135-9, 2003.

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.

MAYER, B. et al. Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation. *Journal of Biological Chemistry*, v.270, n.29, p.17355-60,1995.

McCOOL, B. A. et al. Glutamate plasticity in the drunken amygdala: the making of an anxious synapse. *International Review of Neurobiology*, v.91, p.205–233, 2010.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. International Union of Pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacologicals Reviews*, v.49, n.2, p.137–142, 1997.

MONTE, R. et al. Analysis of the factors determining survival of alcoholic withdrawal syndrome patients in a general hospital. *Alcohol and Alcoholism*, v.2, p.151-158, 2010.

MONTEZUMA, K. et al. Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. *Neuropharmacology*, v.62, n.1, p.485–491, 2012.

MONZÓN, M. E.; VARAS, M. M.; DE BARIOGLIO, S,R. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides*, v.22, n.7, p.1043-7, 2001.

- MOREIRA, F. A. et al. Neuroanatomical substrates involved in cannabinoid modulation of defensive responses. *Journal of Psychopharmacology*, v.26, n.1, p.40–55, 2012.
- MORO, M. A. et al. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.91, n.14, p.6702–6706, 1994.
- MUNCIE, JR. H. L.; YASINIAN, Y.; OGE, L. Outpatient Management of Alcohol Withdrawal Syndrome. *American Family physician*, v.88, 2013.
- MURPHY, S. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends in Neurosciences*, v.16, n.8, p.323–328, 1993.
- NAGY, J. et al. Role of altered structure and function of NMDA receptors in development of alcohol dependence. *Current Neuropharmacology*, v.3, n.4, p.281–297, 2005.
- NAMKOONG, K.; JUNG, Y. C. Pharmacotherapy for Alcohol Dependence: Anticraving Medications for Relapse Prevention. *Yonsei Medical Journal*, v.47, n.2, p.167-178, 2006.
- NASHOLD, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery*, v.30, p.14–24, 1969.
- NASIF, F. J. et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents alterations in medial prefrontal cortex excitability induced by repeated cocaine administration. *Psychopharmacology (Berl)*, v.218, n.2, p.323-30, 2010.
- NATHAN C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, v.6, n.12, p.3951-64, 1992.
- NATHAN N, XIE, Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell Press*, v.78, n.6, p.915-918, 1994.
- NEVO, I.; HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochemistry International*, v.26, n.4, p.305-336, 1995.
- OKERE, C. O.; WATERHOUSE, B.D. Nicotine withdrawal upregulates nitrenergic and galaninergic activity in the rat dorsal raphe nucleus and locus coeruleus. *Neuroscience Letters*, v.536, p.29-34, 2013.
- OLIVEIRA, B. L. et al. Insights into the structural determinants for selective inhibition of nitric oxide synthase isoforms. *Journal of Molecular Modeling*, v.19, n.4, p.1537-1551, 2012.
- ONSTOTT, D.; MAYER, B.; BEITZ, A. J. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Research*, v.610, n.2, p.317–324, 1993.
- OVERSTREET, D. H. et al. Reduction in repeated ethanol-withdrawal-induced anxiety-like behavior by site-selective injections of 5-HT1A and 5-HT2C ligands. *Psychopharmacology (Berl)*, v.187, n.1, p.1-12, 2006.
- 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.

PASCUAL, M. et al. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain, Behavior, and Immunity*, v.25, p.80–91, 2011.

PASCUAL, M. et al. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes longterm behavioural alterations in adolescent rats. *European Journal of Neuroscience*, v.25, p.541–550, 2007.

PASCUAL, M. et al. Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol and Alcoholism*, v.49, n.2, p.187-92, 2014.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3rd. *Academic Press*, San Diego, CA, 1997.

PFEIFFER, S. Interference of carboxy-PTIO with nitric oxide- and peroxynitrite- mediated reactions. *Free Radical Biology & Medicine*, v.22, n.5, p.787–794, 1997.

PINNOCK, S. B. Interactions between nitric oxide and corticosterone in the regulation of progenitor cell proliferation in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuropsychopharmacology*, v.32, p.493–504, 2007.

POKK, P. et al. The effects of the nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on the behaviour of mice after chronic ethanol administration. *Alcohol and Alcoholism*, v.36, n.3, p.193-8, 2001.

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.

QIN, L. et al. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *Journal of Neuroinflammation*, v.5, n.10, 2008.

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

QUOCK, R. M.; NGUYEN, E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sciences*, v.51, n.25, p.255-260, 1992.

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.

RAWLS, S. M. et al. A nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) attenuates abstinence-induced withdrawal from both cocaine and a cannabinoid agonist (WIN 55212-2) in Planaria. *Brain Research*, v.1099, n.1, p.82-87, 2006.

REHM, J. et al. The cost of alcohol, illegal drugs and tobacco in Canada 2002. *Journal of Studies on Alcohol Drugs*, v.66, p.886-895, 2007.

RIIKONEN, J. et al. Intermittent ethanol exposure increases the number of cerebellar microglia. *Alcohol*, v.37, n.5, p.421-426, 2002.

RIZVI, T. A. et al. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *Journal of Comparative Neurology*, v.303, p.121–131, 1991.

- RÖSNER, S. et al. Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane database of systematic reviews*, v.12, 2010.
- RUSSO, A. S. et al. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, v.110, n.1–2, p.198–202, 1993.
- SANTAMARTA, M. T.; ULIBARRI, I.; PINEDA, J. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance in rats. *Synapse*, v.57, n.1, p.38-46, 2005.
- SCHENBERG, L. C.; GRAEFF, F. G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1978; 9(3):287–295.
- SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, v.254, n.5037, p.1503–1506, 1991.
- SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V. Nitric oxide and synaptic function. *Annual Review of Neuroscience*, v.17, p.153-183, 1994.
- SEGIETH, J. et al. Nitric oxide-mediated regulation of dopamine release in the hippocampus in vivo. *Neuropharmacology*, v.39, n.4, p.571-577, 2000.
- SEO, D. O.; LEE, S.; RIVIER, C. Prolonged exposure to intermittent alcohol vapors decreases the ACTH as well as hypothalamic nitric oxide and cytokine responses to endotoxemia. *Alcohol: Clinical and Experimental Research*, v.28, n.6, p.848-854, 2004.
- SHIPLEY, M. T. et al. Topographical specificity of forebrain inputs to the midbrain periaqueductal gray: evidence for discrete longitudinally organized input columns. In: Depaulis A, Blander R (editores). *The midbrain periaqueductal gray matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization*. Plenum Publishing Corporation, New York, 1991.
- SHIRAFUJI, S. et al. QT interval dispersion and cardiac sympathovagal balance shift in rats with acute ethanol withdrawal. *Alcohol: Clinical and Experimental Research*, v.2, p.223–230, 2010.
- SHPARGEL, K. B. et al. Preconditioning paradigms and pathways in the brain. *Cleveland Journal of Clinical Medicine*, v.75, p.77-82, 2008.
- SILVA, C. J.; GARBE, G. G. Animações em dependência química. Disponível em: (<http://www.virtual.epm.br/material/depquim/4aflash.htm>). Acesso em: 16 de fevereiro, 2014.
- SIMON O'BRIEN, E. et al. Fluoxetine, desipramine, and the dual antidepressant milnacipran reduce alcohol self-administration and/or relapse in dependent rats. *Neuropsychopharmacology*, v.36, n.7, p.1518-1530, 2011.
- SMALLS, S. L.; OKERE, C. O. Acute restraint increases varicosity density and reduces the inter-varicosity distance in NADPH diaphorase-containing neurons in the rat dorsolateral periaqueductal graymatter. *Neuroscience Letters*, v.511, n.1, p.23–27, 2012.
- SNYDER, S. H.; BREDET, D. S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, v.266, n.5, p.68-77, 1992.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, chemokines and pain. In: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F. et al. *Pharmacology of Pain*. 1 ed. Seattle, IASP Press, p.279-302, 2010.

SOSA, R. A.; FORSTHUBER, T. G. The critical role of antigen-presentation-induced cytokine crosstalk in the central nervous system in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, v.31, n.10, p.753-768, 2011.

SOUZA-PINTO, L. F. S. et al. The blockade of AMPA-kainate and NMDA receptors in the dorsal periaqueductal gray reduces the effects of diazepam withdrawal in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, v.87, n.2, p.250–257, 2007.

SPIACCI Jr., A. et al. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, v.88, n.3, p.247–255, 2008.

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

STEINBUSCH, H. W. et al. Serotonergic and non-serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the caudate-putamen complex in the rat, studied by a combined immunofluorescence and fluorescent retrograde axonal labeling technique. *Neuroscience Letters*, v. 19, n.2, p.137-142, 1980.

STOLL, G.; JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progress in Neurobiology*, v.58, p.233–247, 1999.

THIBEAULT, I.; LAFLAMME, N.; RIVEST, S. Regulation of the gene encoding the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in the mouse and rat brain in response to circulating LPS and proinflammatory cytokines. *Journal of Comparative Neurology*, v.4, p.461–477, 2001.

TODA, N. et al. Interactions between morphine and nitric oxide in various organs. *Journal of Anesthesia*, v.119, n.1, p.166-181, 2009.

TOMAZ, C. et al. Flight behavior induced by microinjection of GABA antagonists into periventricular structures in detelencephalated rats. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, v.30, n.2, p.337-42, 1988.

TONETTO, L. L. et al. Inhibition of the NMDA receptor/Nitric Oxide pathway in the dorsolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-like effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *Behaviour Brain Functions*, v.5, n.40, 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, I. T. et al. Effects of agmatine on ethanol withdrawal syndrome in rats. *Behaviour and Brain Research*, v.107; n.1-2; p.153-9, 2000.

UZBAY, I. T. L-NAME precipitates catatonia during ethanol withdrawal in rats. *Behaviour and Brain Research*, v.119, n.1, p.71–76, 2001.

UZBAY, I. 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.

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

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

VALLES, S. L. et al. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathology*, v.4, p.365–371, 2004.

VALLES, S. L. et al. Chronic ethanol consumption enhances interleukin-1-mediated signal transduction in rat liver and in cultured hepatocytes. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, v.27, p.1979–1986, 2003.

VAN SICKLE, B. J.; XIANG, K.; TIETZ, E. I. Transient plasticity of hippocampal CA1 neuron glutamate receptors contributes to benzodiazepine withdrawal-anxiety. *Neuropsychopharmacology*, v.29, n.11, p.1994–2006, 2004.

VASSILJEV, V. et al. The effects of the nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on ethanol pharmacokinetics in rats after acute and chronic ethanol administration. *Alcohol and Alcoholism*, v.33, n.6, p.609-15, 1998.

VASUDEVA, R. K. et al. Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitrergic cell groups. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v.41, n.4, p.281-93, 2011.

VEENING, J. et al. Hypothalamic projections to the PAG in the rat: topographical, immune electronmicroscopical and functional aspects, In: Depaulis, A.; Blander, R. (eds.), *The midbrain periaqueductal gray matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization*. Plenum Publishing Corporation, New York, 1991.

VERTES, R. P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, v.313, p.643-668, 1991.

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.

VILPOUX, C. et al. Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, v.33, p.945–969, 2009.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, v.46, n.4, p.755–784, 1992.

VOLKE, V. et al. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. *Behaviour and Brain Research* v.140, p.141–147, 2003.

WARD, R. J. et al. Identification of the nuclear transcription factor NFkappaB in rat after in vivo ethanol administration. *FEBS Letters*. v.389, n.2, p.119–122, 1996.

WARD, R. J. ET al. Neuro-inflammation induced in the hippocampus of 'binge drinking' rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. *Journal of Neurochemistry*, v.111, n.5, p.1119–1128, 2009.

WEGENER, G.; VOLKE, V. Nitric oxide synthesis inhibitors as antidepressants. *Pharmaceuticals*, v.3, p.273–279, 2010.

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

WEITZ, T. M.; TOWN, T. Microglia in Alzheimer's Disease: It's All About Context. *International Journal of Alzheimer's Disease*", v.31, n.4, 2012.

WHITTINGTON, M. A.; LAMBERT, J. D.; LITTLE, H. J. Increased NMDA receptor and calcium channel activity underlying ethanol withdrawal hyperexcitability. *Alcohol and Alcoholism* v.30, n.1, p.105–114, 1995.

WU, Y. et al. JWA regulates chronic morphine dependence via the delta opioid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.490, p. 520-525, 2011.

YANG, L. et al. Neurons in the periaqueductal gray are critically involved in the neuronal network for audiogenic seizures during ethanol withdrawal. *Neuropharmacology*, v.44, n.2, p.275–281, 2003.

YILDIZ, F. et al. Antidepressant like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology*, v.149, n.41–44, 2000.

YU, C.H. et al. Pro - and anti-inflammatory cytokine expression and histopathological characteristics in canine brain with traumatic brain injury. *Journal of Veterinary Science*, v.3, p.299–301, 2011.

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

ZAHR, N. M. et al. Measurement of Serum, Liver, and Brain Cytokine Induction, Thiamine Levels, and Hepatopathology in Rats Exposed to a 4-Day Alcohol Binge Protocol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v.34, n.11, 2010.

ZALESKI, M. et al. Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da Síndrome de Abstinência do Álcool. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.26, sup.1, São Paulo, 2004.

ZHANG J. M. Cytokines, inflammation, and pain. *International Anesthesiology Clinics*, v.45, p.27-37, 2007.

ZHANG Y. et al. Identification of CXCR4 as a new nitric oxide-regulated gene in human CD34+ cells. *Stem Cells*, v.25, n.1, p.211-9, 2007.

ZHAO, Y. et al. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behavioural Brain Research*, v.236, p.270– 282, 2013.

ZHOU, D. et al. Design and synthesis of 2-amino-4-methylpyridine analogues as inhibitors for inducible nitric oxide synthase and in vivo evaluation of [18F]6-(2-fluoropropyl)-4-methylpyridin-2-amine as a potential PET tracer for inducible nitric oxide synthase. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.52, n.8, p.2443–2453, 2009.

ZHOU, L.; ZHU, D.Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, n.20, 2009.

ZOU, J.; CREWS, F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v.26, n.4, p.385–405, 2006.

ZOU, J.; CREWS, F. Induction of innate immune gene expression cascades in brain slice cultures by ethanol: key role of NF-kappaB and proinflammatory cytokines. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 34, n. 5, p. 777–789, 2010.

**ANEXO**

---