

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**INFLUÊNCIA DE VIAS DEPENDENTES DO ÓXIDO NÍTRICO
PRESENTES NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DORSO-LATERAL NO EFEITO ANSIOLÍTICO DO ÁLCOOL**

ROBERTA MOURA ORTIGA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dra. Gina Struffaldi Morato

Florianópolis, SC, Brasil
Janeiro/2002

**INFLUÊNCIA DE VIAS DEPENDENTES DO ÓXIDO
NÍTRICO PRESENTES NA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSO-LATERAL NO EFEITO
ANSIOLÍTICO DO ÁLCOOL**

POR

ROBERTA MOURA ORTIGA

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pela Orientadora e membros
da Banca Examinadora *ad hoc*, composta
pelos Professores Doutores:**

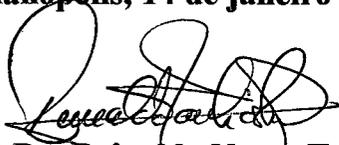
**Gina Struffaldi Morato
Orientadora – PGFMC – UFSC**

**Jamil Assreuy
PGFMC - UFSC**

**Antônio de Pádua Carobrez
PGFMC - UFSC**

**Francisco Silveira Guimarães
Depto. de Farmacologia – FMRP/USP**

Florianópolis, 14 de janeiro de 2002.



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa**

ORIENTADORA

Prof. Dra. Gina Struffaldi Morato

Esta dissertação foi realizada no laboratório de Psicofarmacologia do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (Brasil), durante o Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, nível Mestrado.

AGRADECIMENTOS

- ↪ Aos professores do Departamento de Farmacologia (UFSC), pelo aprendizado.

- ↪ A professora Gina Struffaldi Morato, pela orientação e incentivo durante o mestrado..

- ↪ Aos funcionários e colegas, pela contribuição no decorrer do Curso de Pós Graduação.

- ↪ Aos meus amigos de laboratório, em especial Elizabeth e Vânia, pela colaboração e amizade.

- ↪ As minhas irmãs, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me e incentivando-me.

EDICATÓRIA ESPECIAL

Este trabalho é dedicado exclusivamente aos meus Pais Edson Carlos Ortiga e Elza Moura Ortiga, meu namorado Átila Ricardo de Lima e meus Tios Elizabete Ortiga e Luis Carlos Gaspar por acreditarem em mim e pela paciência nos momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. ÁLCOOL E ALCOOLISMO.....	1
1.1 Mecanismo de Ação Álcool.....	5
2. ÓXIDO NÍTRICO.....	12
2.1 Óxido Nítrico e Sistema Nervoso Central.....	15
2.2 Óxido Nítrico e Álcool.....	18
3. ANSIEDADE.....	20
3.1 Ansiedade e Álcool.....	22
3.2 Modelos Animais de Ansiedade.....	24
4. SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL.....	28
4.1 Substância Cinzenta Periaquedutal e Comportamento Defensivo..	30
II. OBJETIVO.....	35
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
a) Animais.....	37
b) Drogas.....	37
c) Labirinto em cruz elevado (LCE) e arena.....	38
d) Cirurgia estereotáxica.....	40

e) Cânulas.....	43
f) Microinjeções intracerebral.....	43
g) Histologia.....	44
h) Procedimento experimental.....	44
i) Análise estatística.....	46
IV. RESULTADOS.....	48
a) Efeitos da administração intraperitoneal de diferentes doses de etanol no comportamento de ratos no LCE.....	48
b) Localização histológica dos sítios das injeções intracerebrais	50
c) Efeitos da administração intraperiaquedutal de 7-NI no comportamento de ratos tratados com etanol.....	51
d) Efeitos da administração intraperiaquedutal de 7-NI juntamente com L-arginina ou D-arginina no comportamento de ratos tratados com etanol.....	54
e) Efeitos de inibidores da guanilato ciclase solúvel no comportamento de ratos tratados com etanol.....	58
f) Efeitos do 8-Bromo-GMPc no efeito ansiolítico do etanol.....	62
g) Efeito de doador de NO no comportamento de ratos tratados com etanol.....	64
V. DISCUSSÃO.....	66
VI. CONCLUSÕES.....	75
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
VIII. ANEXOS (TABELAS).....	94

ABREVIACES MAIS USADAS

7-NI	7-Nitroindazol
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
APA	Associação Americana de Psiquiatria
DSM-VI	Manual de diagnostico e estatística das desordens mentais
GABA	cido gama aminobutírico
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	xido nítrico
NOS	xido nítrico sintase
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
SCP	Substância cinzenta periaquedutal
SCPd	Substância cinzenta periaquedutal dorsal
SCPdl	Substância cinzenta periaquedutal dorso lateral
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Nitroprussiato de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese do óxido nítrico.....	13
Figura 2 – Labirinto em cruz elevado.....	40
Figura 3 – Aparelho estereotáxico.....	42
Figura 4 – Administração i.p. de etanol em ratos testados no LCE.....	49
Figura 5 – Secção de um cérebro de rato.....	50
Figura 6 – Corte histológico mostrando o sítio da injeção de droga.....	50
Figura 7 – Efeito do 7-NI na ação do etanol.....	53
Figura 8 – Efeito da L-arginina na ação do 7-NI em ratos tratados com etanol.....	56
Figura 9 – Efeito da D-arginina na ação do 7-NI em ratos tratados com etanol.....	57
Figura 10 – Efeito do ODQ na ação do etanol.....	60
Figura 11 – Efeito do LY83.583 na ação do etanol.....	61
Figura 12 – Efeito do 8-Bromo-GMPc na ação do etanol.....	63
Figura 13 – Efeito do NPS na ação do etanol.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios diagnóstico da dm-IV , da Associação Americana de Psiquiatria (APA), para dependência de substâncias.....	94
Tabela 2 – Classificação dos distúrbios da ansiedade, conforme a APA e DSM-IV.....	96

RESUMO

Estudos anteriores obtidos por nosso laboratório mostraram que microinjeções intrahipocâmpais de drogas que interferiam nas vias dependentes do óxido nítrico (NO) influenciaram o efeito ansiolítico produzido pelo etanol. Em nossos estudos, examinamos a função das vias dependentes do NO da substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral (SCPdl) no efeito ansiolítico do álcool em ratos, usando o teste de labirinto em cruz elevado. Nós estudamos o efeito do 7-nitroindazol (7-NI, 40 nmol), um inibidor preferencial do óxido nítrico síntese neuronal (NOSn), e a influência da L-arginina (600 nmol) e D-arginina (600 nmol) naquele efeito. Nós também estudamos o efeito de inibidores da guanilato ciclase solúvel, ODQ (1 nmol) e LY83.583 (5 ou 10 nmol); análogo do GMPc, 8-Bromo-GMPc (40 nmol), e doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP, 40 ou 80 nmol), administrados na SCPdl no efeito ansiolítico do etanol. Os resultados mostraram que o ODQ, LY83.583 e 7-NI aumentaram a porcentagem de entradas e o tempo de exploração nos braços abertos em ratos injetados intraperitonealmente com EtOH 1,0 g/kg, dose que não produz efeito ansiolítico *per se*. L-arginina preveniu o efeito do 7-NI. Enquanto que microinjeções de 8-Bromo-GMPc ou SNP bloquearam o efeito ansiolítico

produzido pela dose de 1,2 g/kg de etanol. Nossos resultados sugerem a participação das vias dependentes de NO da SCPdl no efeito ansiolítico do etanol em ratos.

ABSTRACT

Previous study from our laboratory showed that the intrahippocampal microinjection of drugs acting at the nitric oxide (NO)-dependent pathways influenced the anxiolytic effect of ethanol. In this study, we examined the role of NO-dependent pathways of dorsolateral periaqueductal gray on the anxiolytic effect of ethanol in rats, using the elevated plus-maze (EPM) test. We tested the effects of 7-nitroindazole (7-NI), a preferential inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and the influence of L- and D-arginine on this effect. We also studied the effects of the soluble guanylate cyclase inhibitors, ODQ and LY83.583; the cyclic guanylate monophosphate (cGMP) analogue, 8-Bromo-cGMP and the NO donor sodium nitroprusside (SNP) on ethanol anxiolysis or all these drugs were injected by dorsolateral periaqueductal gray. The results showed that ODQ, LY83.583 and 7-NI increased the percentage of open arm entries and time spent on open arms of the EPM in rats injected with EtOH 1.0 g/kg (i.p.), dose that did not produce an anxiolysis per se. L-arginine prevented the effect of 7-NI. Additional experiments were performed with a dose of 1.2 g/kg (i.p.) of EtOH, which clearly produced an anxiolytic effect. Microinjection of 8-Bromo-cGMP or SNP blocked the anxiolytic effect of this dose of EtOH. Taken together, the

results suggest the participation of NO-dependent pathways of dorsolateral periaqueductal gray in the anxiolytic effects of EtOH in rats.

INTRODUÇÃO

1. ÁLCOOL E ALCOOLISMO

O etanol ou álcool etílico é uma droga psicoativa que tem sido consumida pela humanidade durante milênios, pelas suas propriedades psíquicas e reforçadoras. Os efeitos prejudiciais do álcool sobre o organismo humano têm sido alvo de interesse de pesquisadores. O uso freqüente de doses elevadas de álcool interfere em várias funções orgânicas, sendo associado a altas taxas de câncer (principalmente no esôfago e estômago), úlceras, hepatite, cirrose, entre outras funções comportamentais como prejuízo nos relacionamentos familiares e no trabalho (Schuckit, 1985). A ingestão aguda do álcool também interfere numa variedade de sistemas como o sensorial, motor, endócrino, cardiovascular e gastrointestinal.

O uso abusivo e a dependência ao álcool são conhecidos como alcoolismo. É um distúrbio crônico que resulta de uma variedade de fatores genéticos, psicosociais e ambientais (Morse e Flavin, 1992). Segundo os critérios diagnósticos do DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), da Associação Americana de Psiquiatria (APA), a dependência se caracteriza pela presença de pelo menos três critérios, ocorrendo a qualquer momento no mesmo período de 12 meses (Tabela 1).

A etiologia do alcoolismo é multifatorial, e nenhuma causa isolada explica a doença. Biologicamente, consegue-se encontrar uma predisposição genética no indivíduo que parece conferir uma maior vulnerabilidade ao alcoolismo. Psicologicamente, tanto alterações estruturais do ego como traços mórbidos de personalidade (depressão, ansiedade, etc) têm sido relacionados como antecedentes do alcoolismo (Masur e Monteiro, 1983).

O alcoolismo tem sido um dos grandes problemas mundiais em Saúde Pública, e uma das maiores causas de morte em muitos países (Williams *et al.*, 1992). Nos Estados Unidos, onde existem maiores informações referentes ao assunto, em torno de 20% de todas as admissões hospitalares envolvem complicações médicas provocadas pelo uso abusivo de álcool, com um custo socioeconômico anual em torno de 70-100 bilhões de dólares por ano (Shalala, 1993; Diamond e Gordon, 1997). Cabe enfatizar que um dos fatores positivos na redução do consumo de etanol nos Estados Unidos é a proibição da venda de bebidas alcoólicas para menores de 21 anos.

No Brasil ainda são escassos os dados estatísticos da população geral relacionado aos distúrbios do alcoolismo. Alguns estudos com populações isoladas são demonstrados através do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas - CEBRID (2000; 2001a, b, c), com informações

obtidas em hospitais e clínicas, sendo analisadas 726.429 internações, das quais o álcool foi responsável por cerca de 90% no período de 1988 a 1999 (CEBRID, 2001c). Um estudo anterior, realizado em 24 cidades do estado de São Paulo, demonstrou uma população média de 6,6% de dependentes de álcool, sendo 10,9% da população masculina e 2,5% da feminina (CEBRID, 2000). Outro estudo mais recente, realizado no Rio Grande do Sul, com 518 adolescentes, demonstrou que o álcool foi experimentado pela quase totalidade (91,5%) (CEBRID, 2001a). Em um terceiro estudo realizado em Coari – AM, com estudantes da rede pública do ensino fundamental e médio, apresentou um total de 4.699 alunos dentre os quais 19,1% classificaram-se como bebedores e 22% como ex-bebedores. Entre os bebedores, 8,4% bebiam semanalmente, sendo a faixa de 10 a 15 anos a idade de primeiro uso para 54% deles (CEBRID, 2001b).

O Departamento de Psicobiologia da UNIFESP, realizou um trabalho enfocando a visão que o paciente dependente de droga tem sobre seu problema. Os dependentes de álcool tenderam a associar seu problema com enfrentamento de situações, enquanto os dependentes de outras drogas relataram utilizá-las por prazer (Silva *et al.*, 2001).

Em relação aos estudos clínicos brasileiros, o alcoolismo está relacionado com a elevação da pressão arterial (Faintuch, 1995; Cordeiro *et*

al., 1998), pancreatite crônica (Mott *et al.*, 1989; Porto *et al.*, 1999), doenças hepáticas (Cotrim *et al.*, 1988) e carcinomas do trato respiratório e sistema digestivo (Hanada *et al.*, 1991; Schlecht *et al.*, 1999). Mas pouco se encontra sobre estudos clínicos relacionados com o sistema nervoso central (SNC).

Algumas linhas de pesquisa experimental de nosso país se dedicam na ação do álcool no SNC, como: a avaliação de respostas comportamentais relacionadas à atividade ansiolítica do etanol (Ferreira e Morato, 1996, 1997, 1999), efeitos reforçadores (Blatt e Takahashi, 1999), efeitos da tolerância à incoordenação motora (Barreto *et al.*, 1998; Zaleski *et al.*, 2001; Barbosa e Morato, 2001), estimulação locomotora e sensibilização produzida pela associação do álcool e outras drogas (Gevaerd e Takahashi, 1999) e problemas associados à Síndrome Fetal do Álcool, devido a ingestão dessa droga por mães grávidas provocam sérios problemas ao recém-nascido e ao longo do seu desenvolvimento (Silva *et al.*, 1981; Grinfeld *et al.*, 1999). As pesquisas neste sentido auxiliam na compreensão dos mecanismos de ação envolvidos, bem como situações em que levam as pessoas a começar a beber, porque algumas bebem em excesso e porque outras são incapazes de controlar o consumo diante de conseqüências prejudiciais.

Assim, observa-se que, embora não existam muitos dados epidemiológicos sobre o alcoolismo no Brasil, os estudos indicam uma

situação preocupante, pois alguns desses estudos mostram claramente o grande consumo de bebida alcoólica pela população em geral, sem restrição de idade. E os grupos de pesquisa que ainda mantêm a contribuição para um melhor entendimento de um distúrbio tão complexo como o alcoolismo, tem como intuito de futuramente amenizar um problema mundial.

1.1 Mecanismos de Ação do Álcool

O etanol é uma molécula orgânica pequena, que consiste de uma cadeia de dois carbonos rodeados por átomos de hidrogênio, com um grupo hidroxila ligado a um deles. O grupamento hidroxila confere ao etanol suas propriedades hidrofílicas, enquanto que a cadeia hidrocarbônica, as hidrofóbicas.

O etanol é rapidamente absorvido logo após sua ingestão, sendo 90% metabolizado pelo corpo e 5 a 10% são excretados sem modificação. A biotransformação do etanol se dá principalmente no fígado, sofrendo ação de três diferentes enzimas: a álcool desidrogenase, as enzimas do sistema microsômico de oxidação do etanol (MEOS) e a catalase. Elas estão localizadas em diferentes compartimentos subcelulares: a álcool desidrogenase está principalmente no citosol, a MEOS localiza-se no

retículo endoplasmático rugoso e a catalase, nos peroxissomos (Tabakoff e Hoffman, 1996).

O álcool é uma droga capaz de afetar todas as células do organismo e os seus principais efeitos ocorrem dentro do sistema nervoso central (SNC). O etanol apresenta uma capacidade de interagir e dissolver-se tanto em água quanto em lipídeos. Esta propriedade anfótera fortalece a hipótese de que o álcool atue através da alteração da estrutura lipídica da membrana celular, de forma inespecífica (Seeman, 1972; Tabakoff e Hoffmam, 1983). A “hipótese da membrana”, proposta inicialmente por Meyer em 1901, sugeria que os efeitos do etanol, de outros álcoois e de anestésicos poderiam ser explicados com base no coeficiente de partição óleo/água. Quanto mais lipossolúvel a substância, maior a potência em produzir anestesia, sugerindo que os lipídeos da membrana seriam o lugar de ação destas drogas. As alterações membranares desencadeariam os efeitos observados na intoxicação pelo álcool. Embora esta “hipótese da membrana” explique apenas os efeitos anestésicos de altas doses, a mesma não justificaria o que ocorre em baixas doses (efeito ansiolítico, prejuízo cognitivo, incoordenação motora, euforizante), como também para o desenvolvimento de tolerância e dependência dessa droga (Chin & Goldstein, 1977; Littleton, 1980; Franks e Lieb, 1984).

Outros estudos demonstram a participação de diversos sistemas de neurotransmissão nas ações fisiológicas e farmacológicas do etanol, principalmente sobre os canais iônicos e os receptores de membrana (Leslie *et al.*, 1990). Evidências recentes sugerem que as proteínas envolvidas na transdução de sinais podem ser os mais importantes alvos do etanol administrado aguda e cronicamente (Alling, 1999). Componentes da cascata de transdução de sinais que parecem ser influenciados incluem canais iônicos (Snell *et al.*, 2000), segundos mensageiros (Pandey, 1998), proteínas G (Davis-Cox *et al.*, 1996), reguladores de expressão gênica (Wilke *et al.*, 1994), neurotransmissores e seus receptores (Finn *et al.*, 2000) e também o óxido nítrico (NO) (Ikeda *et al.*, 1999).

Ainda, o etanol pode influenciar, ativando ou inibindo, a liberação de vários neurotransmissores, tais como a acetilcolina (Erickson e Grahan, 1973), serotonina (Tabakoff *et al.*, 1977), dopamina (Kiiianmaa e Tabakoff, 1983) e noradrenalina (Shefiner e Tabakoff, 1985). O mecanismo dopaminérgico e noradrenérgico, juntamente com os sistemas de opióides endógenos, parecem estar envolvidos com os efeitos reforçadores do etanol, através da ativação de vias de reforço positivo (Koob *et al.*, 1993). Por outro lado, o sistema serotoninérgico parecem atuar nas vias de reforço negativo. Vários ligantes dos receptores dopaminérgico, serotoninérgico e

opioidérgico têm demonstrado alguma relação com comportamentos que levam ao consumo, à preferência ou aos sintomas da síndrome de abstinência ao etanol (Imperato e Di Chiara, 1986; Nevo e Hamon, 1995).

Vários estudos foram realizados, buscando demonstrar o envolvimento da acetilcolina nos prejuízos cognitivos, induzidos pelo etanol (Drachman, 1977; Hoffman *et al.*, 1986). A administração crônica de etanol, provocou a perda de memória e prejuízo cognitivo no homem (Lishman, 1990), bem como distúrbios nos processos de memória em vários modelos animais (Hodges *et al.*, 1991).

Outros trabalhos têm sugerido o envolvimento do sistema noradrenérgico com a auto-administração de etanol e outras drogas (Brown e Amit, 1977). Lesões neuroquímicas, de neurônios noradrenérgicos ou inibição da síntese de noradrenalina resultam na supressão do consumo voluntário de etanol. A ingestão crônica dessa droga resulta em um aumento dos níveis de noradrenalina no cérebro durante o tempo em que o animal está intoxicado e permanece até vinte quatro horas após a dissipação do efeito dela (Hoffman e Tabakoff, 1985).

Estudos realizados por Nevo e Hamon (1995) comprovaram a interferência diferenciada do consumo agudo e crônico de etanol nos processos de neurotransmissão, e que o principal sistema neurotransmissor

inibitório é o ácido gama-aminobutírico (GABA) e o principal neurotransmissor excitatório é o glutamato. Sabe-se que o consumo agudo de etanol facilita a transmissão GABAérgica (aumentando a condutância do cloreto através do receptor GABA_A) e inibe a função glutamatérgica (diminuindo a condutância catiônica através do receptor N-metil-D-aspartato – NMDA). O desenvolvimento da tolerância ao efeito depressor do etanol, associado ao seu consumo crônico, leva a uma redução na função GABAérgica e um aumento da função glutamatérgica e do número de receptores NMDA, além de aumentar o número de canais de Ca⁺⁺ voltagem-dependente (Tabakoff and Hoffman, 1996; Dingledine *et al.*, 1999; Narita *et al.*, 2001).

O GABA é o neurotransmissor inibitório mais abundante no cérebro e seus efeitos são mediados, principalmente, por receptores GABA_A, que estão acoplados diretamente aos canais de ânions (Tabakoff *et al.*, 1996). Esses receptores possuem sítios de ação para drogas sedativas, anestésicas e ansiolíticas, como barbitúricos e benzodiazepínicos. Segundo alguns autores, o efeito do etanol sobre esse tipo de receptor pode contribuir para sua ação ansiolítica e sedativa (Allan e Harris, 1987; Allan *et al.*, 1991; Mihic, 1999).

Os receptores glutamatérgicos têm sido implicados, pelo menos em parte, nos mecanismos através dos quais o etanol produz grande parte dos

seus efeitos agudos e crônicos. Entre os receptores glutamatérgicos o mais estudado é o receptor ionotrópico sensível a ação do N-metil-D-aspartato (NMDA). Quando administrado agudamente o etanol inibe a ação desse receptor, bloqueando as ações dos canais aniônicos neuronais. Entretanto, quando administrado cronicamente ele promove um aumento compensatório no número de canais iônicos e aumenta a sensibilidade dos neurônios àqueles canais (Danysz *et al.*, 1992; Harris, 1999). Diferentes estudos sugerem que este sistema está envolvido nos efeitos do etanol, como o efeito ansiolítico (Ferreira e Morato, 1996 e 1997), anticonvulsivantes (Choi, 1988), aprendizado e memória (Castellano e Populin, 1990), potenciação a longo prazo (Morrisett e Swartzwelder, 1993) e tolerância (Barreto *et al.*, 1998; Morato e Khanna, 1996). Além desse receptor, o etanol pode também interferir nas respostas dos receptores kainatos (Valenzuela *et al.*, 1998) e AMPA (Lovinger, 1993), sugerindo que os receptores não-NMDA também sejam sensíveis ao etanol.

O complexo receptor NMDA é controlado por vários sítios regulatórios, entre eles: sítio para glutamato; sítio modulatório para glicina; sítios para cátions divalentes (magnésio e zinco); um sítio para modulação do canal pelas poliaminas e outro para os antagonistas, como a fenciclidina, cetamina ou o MK-801 (Mayer e Westbrook, 1987; Collingridge e Lester,

1989; Watkins *et al.*, 1990). Parece existir também no receptor regiões pH-sensíveis que podem resultar em uma interação com o íon hidrogênio (Traynelis e Cull-Candy, 1990; Lynch e Guttman, 2001) e um sítio sensível ao óxido nítrico (NO), mas sua função gera controvérsias (Recasesns, 1995). A atuação do glutamato em terminais pós-sinápticos do receptor NMDA promove a ativação da enzima oxido nítrico sintase (NOS), através do complexo cálcio-calmodulina, formando NO, o qual pode difundir-se para terminais pré-sinápticos ativando a guanilato ciclase (GC) (Garthwaite, 1991). Dados obtidos na literatura sugerem que o NO esteja relacionado com o desenvolvimento de dependência física de substâncias de abuso, como o álcool (Uzbay e Oglesby, 2001). Em estudos agudos, a inibição da NOS diminui os sintomas da abstinência ao álcool (Uzbay *et al.*, 1997) e acentuou os efeitos ansiolíticos de etanol (Ferreira *et al.*, 1999).

2. ÓXIDO NÍTRICO

O Óxido Nítrico (NO), foi conhecido por muitas décadas apenas como um gás tóxico, derivado da fumaça do cigarro. Furchgott e Zawadzki (1980), demonstraram que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina era dependente da integridade do endotélio vascular. Estudos adicionais, demonstraram que este relaxamento ocorria pela formação de um fator lábil, com capacidade de se difundir para o músculo liso vascular, sendo este fator denominado como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF, Endothelium-derived relaxing factor). Anos após a descoberta do EDRF, foi demonstrado que suas ações biológicas eram indistinguíveis daquelas promovidas pelo NO (Ignarro *et al.*, 1988; Palmers *et al.*, 1987).

O NO é um gás de pequeno tamanho, lipossolúvel, instável. Produzido em vários tecidos do SNC e periféricos. Diferente dos neurotransmissores clássicos, por ser sintetizado de acordo com sua demanda (Hökfelt *et al.*, 1994; Moore, 1996; Moncada *et al.*, 1994). O NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina e do oxigênio molecular pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS), requerendo ainda fosfato-dinucleotídeo-adenina-nicotinamida reduzida (NADPH) e 5 cofatores ou grupos protéticos (dinucleotídeo de adenina flavina – FAD, mononucleotídeo de flavina –

FMN, calmodulina, tetrahydrobiopterina – BH4 e o grupamento heme) (Know *et al.*, 1990; Knowles e Moncada, 1994) (Figura 1).

O mecanismo responsável pelo término da ação do NO envolve uma rápida reação com oxigênio em solução aquosa, produzindo ânions inativos nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) (Vincent, 1994). A concentração sérica de nitratos pode ser mensurada por cromatografia líquida de alta resolução e utilizada como ferramenta para avaliação geral do nível de atividade da NOS (Muscará e De Nucci, 1996).

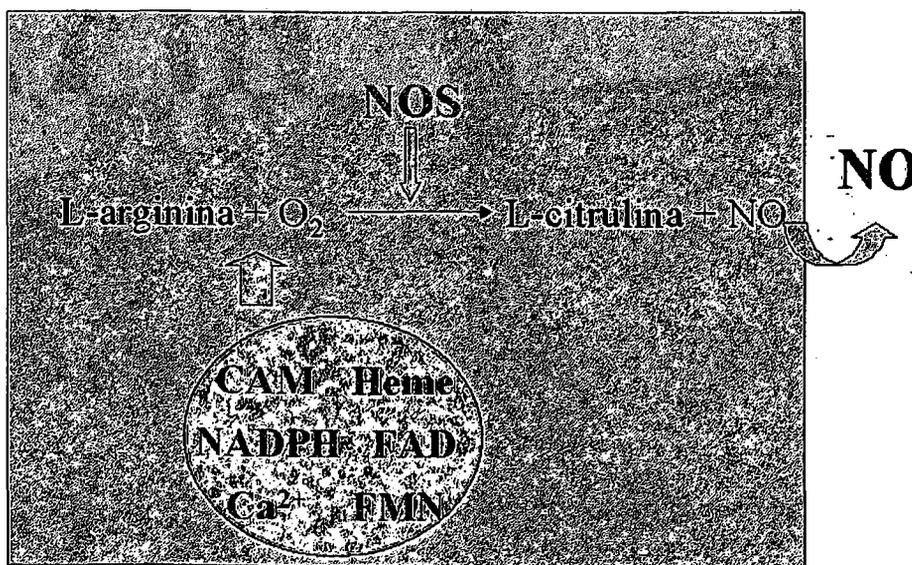


Figura 1: Síntese do Óxido Nítrico (NO). O NO é formado a partir do substrato L-arginina e pelo oxigênio molecular, utilizando como cofatores NADPH, BH₄, FMN, FAD, calmodulina e grupamento heme, e pela ação da enzima NOS.

As isoformas de NOS já foram clonadas em tecido cerebral (Bredt *et al.*, 1991) e endotélio vascular (Lamas *et al.*, 1992). Além disso,

macrófagos (Lowenstein *et al.*, 1992), hepatócitos (Geller *et al.*, 1993), e uma ampla variedade de tecidos tais como coração, pulmões, e baço também exibem atividades NOS, demonstrando assim, a grande importância fisiológica dessa via metabólica. As isoformas diferem entre si pelo número de aminoácidos da cadeia e possuem alguns sítios de ligação em comum, entre eles, dois sítios para NADPH, dois sítios para FAD, um sítio para FMN e um sítio para calmodulina (Bredt *et al.*, 1991; Lammas *et al.*, 1992).

De modo geral, as NOS podem ser divididas em dois grupos, o grupo das enzimas constitutivas (cNOS), que se encontra sob a forma inativa até o complexo cálcio-calmodulina ligue-se as mesmas ativando-as. Esta ativação determina a liberação contínua de pequenas quantidades (pmol) de NO, que atua como um mecanismo de transdução de sinal, resultando em várias respostas fisiológicas como efeito final. O segundo grupo é denominado o das enzimas induzível (iNOS), pois é expressa após a ação de determinados estímulos, tais como citocinas e o lipopolissacarídeo de parede bacteriana em macrófagos, além de células endoteliais, células da musculatura lisa vascular, miócitos e hepatócitos, entre outras células. Este grupo é independente do complexo cálcio-calmodulina e libera grandes quantidades (nmol) de NO podendo permanecer ativa por várias horas (Schuman e Madison, 1994).

Dentro do grupo das NOS constitutivas dependentes de cálcio-calmodulina, inclui-se uma enzima neuronal, a NOS_n (também chamada de NOS₁), encontrada no cérebro (cerebelo, córtex, estriado, bulbo olfatório, hipocampo, hipotálamo e prosencéfalo basal), e também na medula dorsal, sistema nervoso periférico e musculatura esquelética. A outra NOS constitutiva é a endotelial, a NOS_e (também chamada de NOS₃), identificada primeiramente no endotélio vascular. A induzida é conhecida como NOS_i (também chamada de NOS₂) (Bredt *et al.*, 1991; Vincent e Kimura, 1992; Marletta, 1994).

2.1 Óxido Nítrico e Sistema Nervoso Central

O emprego de técnicas de marcação permitiu estudar-se a co-localização dos cofatores com as NOS, visto que as enzimas apresentam atividades dependentes dos mesmos. Através de reações histoquímicas, a atividade da NADPH-diaforase, que está geralmente co-localizada à imunoreatividade da NOS, foi utilizada para fazer o mapeamento da distribuição da NOS no SNC de ratos (Vincent e Kimura, 1992; Schmidt *et al.*, 1992). Outros estudos demonstraram que sítios de formação de monofosfato cíclico d guanosina (GMPc) no cérebro de ratos apresentavam-se positivos para NADPH-diaforase, após o uso de doadores de NO

(Southam e Garthwaite, 1993). Em particular, destacamos a presença de grande número de regiões que expressam NOS no SNC que basicamente estão envolvidas na organização do comportamento de defesa, constituindo-se no substrato anatômico dos estados de medo e ansiedade, tais como: porção ventral posterior do núcleo da amígdala, divisão lateral posterior do núcleo intersticial da estria terminal, setor medial rostro-dorsal da região perifornical, setor intermédio-lateral da área hipotalâmica lateral, núcleo pré-mamilar dorsal, camadas intermediárias e profundas do colículo superior e substância cinzenta periaquedutal dorso lateral (Davis *et al.*, 1992; Graeff, 1994).

Evidências indicam que o NO parece influenciar, de alguma forma, comportamentos relacionados à ansiedade. Quando administrado N^G-nitro-L-arginina metil-ester (L-NAME), um inibidor da NOS, diretamente na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) de ratos, houve aumento da exploração, pelos animais, nos braços abertos do labirinto em cruz elevado sem nenhuma alteração no número de entradas nos braços fechados, uma resposta característica de composto com atividade ansiolítica (Guimarães *et al.*, 1994). Resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se inibidores da NOS administrados por via sistêmica em ratos submetidos aos modelos de LCE e interação social (Volke *et al.*, 1995; Faria *et al.*, 1997; Faria, 1998).

No entanto, resultados contrários foram obtidos ao se demonstrar que o pré-tratamento sistêmico com L-N^G-nitro-arginina (L-NOARG) antagonizou o efeito ansiolítico do benzodiazepínico clordiazepóxido em camundongos testados no LCE. Estes dados sugeriram que a produção de NO pode mediar os efeitos de alguns ansiolíticos (Quock e Nguyen, 1992). Além disso, a administração de L-NOARG em ratos reduziu significativamente o aumento da exploração nos braços abertos do LCE induzido pelo gás anestésico óxido nítrico. Este antagonismo dos efeitos do óxido nítrico também foi revertido pelo pré-tratamento intracerebroventricular com L-arginina, mas não com D-arginina, mostrando a participação do NO mediando o efeito ansiolítico daquele gás (Caton *et al.*, 1994). Essas aparentes contradições indicam que o papel do NO, na modulação da ansiedade experimental em roedores, necessita de estudos complementares para que estas informações fiquem mais claras.

Outros estudos demonstram a existência do sistema NO-GMPc estabelecida previamente por vários experimentos que mostram a correlação entre o aumento da síntese de NO e o acúmulo de GMPc (Knowles *et al.*, 1989; Southam e Garthwaite, 1993; Garthwaite, 1995; Lizasoain *et al.*, 1995). Foi também demonstrado um aumento da atividade da NOS e acúmulo de GMPc na SCPd, após exposição de ratos ao seu predador

natural, o gato, sugerindo o envolvimento da via NO-GMPc em respostas do medo inato (Chiavegatto *et al.*, 1998). Devido às informações anteriores, é possível supor, o envolvimento do NO em comportamento ligados à ansiedade e a outros distúrbios como o alcoolismo.

2.2 Óxido Nítrico e Álcool

O consumo excessivo de álcool por um longo tempo, causa mudanças comportamentais, estruturais e funcionais em várias regiões cerebrais, como cerebelo, hipocampo, colículo superior e SCP (Walker *et al.*, 1981; Popp *et al.*, 1999; Freund e Andreson, 1999; Phillips *et al.*, 2000). Estas alterações pela exposição ao álcool tanto podem ocorrer durante a fase de desenvolvimento com também na fase adulta (Bredt *et al.*, 1990). O cerebelo de ratos é região rica em NOSn (Matsumoto *et al.*, 1993). Entretanto, esta enzima, presente em grande quantidade na substância cinzenta periaquedutal dorso lateral, parece ser também influenciada pela ação do álcool (Phillips *et al.*, 2000).

Trabalhos com inibidores e doadores do óxido nítrico associados ao uso de álcool demonstram que alguns efeitos de álcool são mediados pela via do NO. O pré-tratamento de ratos com L-NAME, inibidor da NOS, aumentou latência para perda dos reflexos posturais induzida pelo álcool,

enquanto o uso de dinitrato de isosorbida, doador de NO, diminuiu a duração da perda daqueles reflexos. Esses resultados, juntamente com outros complementares, sugerem que a via do NO têm alguma participação no efeito sedativo do álcool (Adams *et al.*, 1994). Outros estudos demonstraram a eficácia da L-NOARG, inibidor da NOS, e do 7-Nitroindazol (7-NI), inibidor preferencial da NOSn, em prevenir o desenvolvimento da tolerância rápida a incoordenação motora induzida pelo álcool, enquanto um excesso de substrato L-arginina reverteu as ações dos inibidores relacionadas aquelas respostas (Khanna *et al.*, 1993; 1995; Wazlawik e Morato, 2001). O NO parece também exercer um papel importante em respostas comportamentais da ansiedade. O uso de um inibidor da NOS, o 7-NI, melhorou a resposta ansiolítica do álcool em ratos testados no LCE, visto que melhorou a exploração nos braços abertos do labirinto. Enquanto que doadores de NO, como SNAP e SNP, impediram o efeito ansiolítico induzido pelo etanol, pois diminuíram o aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE induzido pelo etanol. Entretanto, estas drogas quando administradas isoladamente não afetaram a exploração dos animais no LCE (Ferreira *et al.*, 1999). Embora muitos resultados demonstrem a participação do NO em efeitos agudos e crônicos de álcool, são necessários estudos complementares para esclarecer melhor esta ligação.

3. ANSIEDADE

A palavra ansiedade provém do latim *anxietas*; *anxietatem*: ânsia, angústia, aflição, incerteza afetiva, atribulação causada pelo receio de que sobrevenha alguma desgraça, desejo ardente ou veemente, sofreguidão e impaciência (Faria, 1962). Ela pode ser definida como um estado emocional desagradável no qual existem sentimentos de perigo iminente, caracterizado por inquietação, tensão ou apreensão (Kaplan e Sadock, 1984). Traduz-se, frequentemente, por reações físicas, tais como: aumento de frequência respiratória, do pulso, da pressão arterial, transpiração excessiva, tensão da musculatura esquelética, alteração gastro-intestinais (dor, náuseas, vômitos) e disfunção genito-urinária (polaciúria, disúria, impotência) (Eisendrath e Brophy, 1995). A diferença entre medo e ansiedade tem um valor relativo e limitado. Praticamente, entende-se por medo, a resposta a um perigo real, e por ansiedade, ao resultado de causas obscuras, irracionais ou indefinidas (Solomon e Patch, 1975).

A ansiedade constitui-se em uma das desordens psiquiátricas mais comuns surgidas em consequência da complexidade do mundo e da vida contemporânea. A ansiedade, quando fisiológica, decorre de processos de adaptação do homem a situações estressantes e é extremamente importante

para a vida do indivíduo e suas relações interpessoais ou com o meio ambiente, criando condições para melhor adaptação a situações novas, que acenem com a possibilidade de risco e perigo, diminuindo ou evitando as conseqüências de tal ameaça (Solomon e Patch, 1975; Graeff, 1989).

A ansiedade patológica manifesta-se por um estado psíquico desagradável de temor, exagerada expectativa, grande tensão e supervigilância, acompanhado de pronunciadas manifestações somáticas neurovegetativas e neuroendócrinas. Esta ansiedade excessiva não somente torna o indivíduo infeliz, como atua de modo deletério sobre seu desempenho (Solomon e Patch, 1975).

O julgamento da ansiedade fisiológica ou patológica dependerá de sua intensidade e duração, e das circunstâncias que a provocam. A ansiedade é considerada como patológica quando parece ser desencadeada por alguma razão mínima, ou sem causa conhecida ou, quando é inusitadamente severa e persistente. A cronicidade da ansiedade é uma evidência de que não está mais atuando como um sinal de perigo, mas que se tornou ela mesma uma ameaça (Eisendrath e Brophy, 1995).

Sempre foi uma preocupação dos psiquiatras estabelecer critérios para o diagnóstico diferencial das diferentes manifestações da ansiedade, e isto pode ser notado desde a identificação original de síndrome de ansiedade

proposta por Hecker (1893) e Freud (1894). A APA em 1980 introduziu no DSM-III os critérios para o diagnóstico das desordens de ansiedade. Revisões e atualizações posteriores desta publicação (DSM-IV) introduziram pequenas alterações, melhorando os critérios para diagnosticar as diferentes desordens de ansiedade: Desordem de Ansiedade Generalizada, Agorafobia sem História de Desordem de Pânico, Fobia Específica, Fobia Social, Desordem de Pânico com ou sem Agorafobia, Distúrbios Obsessivos Compulsivos, Desordem de Stress Pós-traumático, Desordem de Ansiedade Decorrente de Condição Médica, Desordem de Ansiedade Induzida por Drogas e Desordem de Ansiedade Ainda Não Especificada (Tabela 2).

3.1 Ansiedade e Álcool

A ingestão excessiva de álcool pode estar relacionada para alguns indivíduos a um medo particular, bem como à depressão, à ansiedade e a problemas situacionais (Ludwing, 1972). A partir disso, vários estudos têm sugerido que o álcool possa reduzir os estados de ansiedade, frustração ou estresse (Wilson e Abrams, 1977, Lepola, 1994).

Em 1956, Conger defendeu formalmente a teoria da redução da ansiedade ou tensão, pelo álcool, e até os dias atuais, muitos pesquisadores procuram testar esta hipótese (Kalodner *et al.*, 1989). Outros estudos mais

recentes analisaram a co-ocorrência da dependência do álcool em pacientes com fobia social, onde descreveram a redução da ansiedade com o uso agudo do álcool (Lipscomb *et al.*, 1980; Regier *et al.*, 1990; Himle *et al.*, 1999). De acordo com o trabalho de Mannuzza *et al.* (1995), pacientes com síndrome do pânico (SP) generalizada apresentavam uma maior frequência para o abuso do álcool, do que pacientes com uma desordem não-generalizada. Esta hipótese está de acordo com outros estudos, onde descreveram a dificuldade de pacientes com SP em controlar o consumo do álcool nos períodos de maior stress, mostrando que o maior consumo do álcool está relacionado com a severidade dos sintomas da fobia social e a melhor socialização e desinibição (Lepine e Pelissolo, 1996; Perugi *et al.*, 2002). Muitos dos indivíduos que bebem socialmente, como também aqueles que apresentam problemas com o álcool, atribuem o uso dessa droga a sua propriedade redutora de tensão, sendo o consumo mais prevalente entre os dependentes (Edwards, 1972; Goldman *et al.*, 1987). Os indivíduos que bebem socialmente relatam razões de celebração e sociabilidade para beber, sugerindo-se que o álcool funcione como reforço positivo (Farber *et al.*, 1980). O reforço positivo por proporcionar a sensação de prazer (recompensa), torna-se repetitivo, contribuindo para a continuidade do consumo da droga, predispondo ao alcoolismo (Koobs, 1997; Valenzuela,

1997). Também é difícil a interpretação dos estudos com dependentes de drogas, pois as consequências sociais e físicas das dependências graves, podem gerar ansiedade e seus sintomas. Com isto, a ingestão de álcool ocorreria para atenuar a ansiedade ocorrida pela falta do mesmo, funcionando assim como um reforço negativo (Kushner *et al.*, 1994). Os reforços positivo e negativo são alguns dos fatores que estão envolvidos na manutenção do alcoolismo, fazendo com que as pessoas consumam cada vez mais esta droga (Koob *et al.*, 1994).

Além disso, estudos vêm demonstrando que as diferenças individuais nos efeitos do etanol podem estar relacionadas às características genéticas e, portanto, vários modelos animais têm sido desenvolvidos tentando relacionar as características individuais com as alterações decorrentes do consumo do álcool (Lacerda, 1996).

3.2 Modelos Animais de Ansiedade

Durante as últimas décadas, vários modelos animais baseados na resposta de medo, estudando os comportamentos espontâneos e espécie-específicos, têm sido propostos como modelo de desordens de ansiedade em humanos. A antecipação ou a incerteza de que eventos aversivos possam ocorrer, produz mudanças comportamentais e fisiológicas nos animais,

correspondentes àquelas observadas em humanos (Montgomery, 1955; Lacerda, 1996; Stewart *et al*, 1996).

Os modelos animais de ansiedade utilizam estímulos comuns que desencadeiam o medo nos animais, e podem ser classificados como: intenso (dor e ruído), novidade (algo estranho, ou ausência de estimulação), perigos específicos do ponto de vista evolutivo (medo inato: espaço aberto, altura, claro/escuro), estímulos decorrentes da interação social (dominância/submissão) e estímulos de medo condicionado (Montgomery, 1955; Berlyne, 1955; File e Day, 1972; Russel, 1973). As respostas mais frequentemente observadas nos animais em modelos experimentais de ansiedade são: imobilidade ou “freezing”, fuga ou luta, ou um comportamento aprendido que dará fim ao perigo ou será capaz de manter a situação perigosa o mais distante possível (Gray, 1987).

Um modelo experimental muito utilizado para analisar ações de drogas ansiolíticas e ansiogênicas é o Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Este modelo desenvolvido por Handley e Mithani (1984), baseou-se nos trabalhos de Montgomery (1955), sendo mais tarde modificado e validado como um modelo de ansiedade para ratos e camundongos (Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987).

O aparelho consiste em um labirinto em forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços abertos e dois braços fechados, nas laterais e nas extremidades. O animal é colocado no centro da cruz, e é deixado livre para explorar durante um período determinado, normalmente cinco minutos. Os índices de ansiedade geralmente utilizados são: frequência de entradas nos braços abertos, frequência de entradas nos braços fechados, número total de entradas, tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados (Pellow *et al.*, 1985).

O LCE baseia-se, entre outros fatores, na aversão natural que roedores apresentam pelos braços abertos do labirinto (Montgomery, 1955), pois animais não tratados com drogas evitam os braços abertos do labirinto, preferindo os fechados. Entretanto, animais que recebem tratamento com drogas ansiolíticas passam a evitar menos os braços abertos. Ratos que são forçados a permanecerem nos braços abertos, mostram manifestações comportamentais e fisiológicas de medo, como congelamento, defecação, e aumento nos níveis de corticosteróides plasmáticos (Pellow *et al.*, 1985).

A avaliação do comportamento de animais no LCE deve ser cautelosa, pois pode sofrer variações decorrentes do próprio organismo em estudo, ou do procedimento empregado. Assim, manipulações das condições de criação dos animais, ou fatores sexuais e ontogenéticos, podem interferir com as

respostas comportamentais em relação às drogas investigadas (Rodgers e Cole, 1993; Imhof *et al.*, 1993).

Os diversos efeitos fisiológicos e comportamentais do álcool se devem as ações em várias regiões do cérebro. O hipocampo faz conexões recíprocas com várias estruturas cerebrais, entre elas o córtex, amígdala, hipotálamo e SCP, formando um sistema cerebral responsável por reações comportamentais, que podem estar implicados no efeito ansiolítico do álcool (Handley, 1994; Ryabinin, 1998).

4. SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

A Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) é uma estrutura densa constituída de neurônios pequenos e médios, que circunda o aqueduto cerebral, chamado aqueduto de Sylvius. Sua porção rostral é contínua com a substância cinzenta periventricular que circunda o terceiro ventrículo no hipotálamo e tálamo. Sua porção caudal se comunica intimamente com a matéria cinzenta que circunda o quarto ventrículo. Ventralmente faz limite com núcleos relacionados com os núcleos oculomotores, e lateralmente com o tegmento (Bandler *et al.*, 1991a).

A partir de estudos morfológicos da citoarquitetura da SCP, esta foi dividida em quatro regiões: medial, ventrolateral, dorso-lateral e dorsal (Beitz, 1985). Posteriormente, foi proposta uma nova organização para a SCP, baseando-se na citoarquitetura funcional e na utilização de respostas neurovegetativas e comportamentais produzidas pela administração local de aminoácidos excitatórios. Segundo estes estudos a SCP pode ser dividida de forma radial em cinco colunas neuronais: dorsomedial, dorsolateral, lateral, ventrolateral, e ventromedial (Bandler *et al.*, 1991a; Carrive, 1993).

Estudos fisiológicos e comportamentais sugerem funções específicas relacionadas com estas subdivisões. Estão relacionadas com analgesia,

funções autonômicas, vocalização, reações de raiva, medo, movimento dos olhos, lordose, memória e regulação hormonal da glândula pituitária (Jacquet *et al.*, 1974; Graeff, 1994). As reações autonômicas estão relacionadas com respostas comportamentais para a sobrevivência do animal (Bandler *et al.*, 1991b; Shipley, 1991). Estas respostas comportamentais citadas acima são dependentes das interconexões desta estrutura com outras áreas do SNC e é a quantidade de axônios de passagem e conexões intrínsecas que tornam a SCP uma estrutura bastante complexa (Beitz, 1982).

As projeções que partem da SCP se direcionam principalmente para o tronco cerebral, em especial para porções do bulbo (Bandler *et al.*, 1991a), por duas rotas principais: a) através de feixe de fibras que distribui-se localmente para a própria SCP, para o *locus coeruleus* e para o núcleo de Barrington, e b) através do feixe maior que tem um arranjo difuso na formação reticular da ponte, e uma distribuição limitada no bulbo onde ocupa uma posição dorso-lateral à pirâmide bulbar. Estudos mais recentes têm mostrado que a SCP é organizada na forma de colunas neuronais que se estendem por várias distâncias ao longo do eixo rostro-caudal (Bandler *et al.*, 1991a; Cameron *et al.*, 1995). A SCP é uma estrutura bastante envolvida com o comportamento do medo (por conseguinte explorada no estudo da

ansiedade), dela partem projeções ascendentes e descendentes que ligam esta estrutura a uma região importante como a amígdala (Fanselow, 1991), que confere um caráter emocional a respostas do medo. A SCP é uma estrutura complexa considerando as múltiplas inervações decorrentes de diversos locais no SNC, que interferem nas respostas da mesma. Em decorrência das amplas projeções aferentes, a SCP pode ser influenciada por estruturas relacionadas com o sistema motor, sensorial, límbico e autônomo (Beitz, 1982).

4.1 Substância Cinzenta Periaquedutal e Comportamento Defensivo

Um estudo realizado por Hunsperger (1956), verificou que a estimulação elétrica da SCP em ratos produzia uma resposta comportamental denominada de reação aversiva de defesa. Em estudo realizado com gatos, quando houve uma lesão da SCP, os animais aboliram as respostas de defesa como vocalização, ataque e defesa (Skultety *et al.*, 1963). Posteriormente estudos sugeriam que a estimulação da SCP em humanos produziam fortes reações emocionais, descritas como: sensações de medo e morte iminente, acompanhada de alterações autonômicas como piloereção, sudorese, aumento da frequência cardíaca e ruborização de face e pescoço. Este estudo

foi fundamental para o entendimento da importância funcional da SCP (Nashold, 1969).

A estimulação elétrica ou microinjeções de drogas que inibem a ação do GABA na SCP dorsal de ratos, induz a um comportamento de congelamento, alternado com fuga descontrolada e saltos verticais. Esta reação é conhecida como comportamento motor explosivo e identifica o pânico, sugerindo então que esta estimulação da SCP dorsal de ratos pode ser um modelo animal de ataque de pânico (Brandão *et al.*, 1982; Schmitt *et al.*, 1985; Panksepp, 1982; Graeff, 1990). Baseando-se nestes fatos, foi sugerido por Graeff (1981) que a SCP dorsal, o hipotálamo medial e as regiões central e dorsomedial da amígdala constituíram o chamado sistema cerebral aversivo (SCA), responsável pela integração de comportamentos ativos de defesa, em oposição ao chamado sistema de inibição comportamental (SIC), sugerido por Gray (1976), constituído pelo septo hipocampal, corpos mamilares, tálamo anteroventral e córtex cingulado. A estimulação química e elétrica destas regiões induzem padrões comportamentais defensivos espécie-específico, causando manifestações comportamentais subjetivas que sugerem que o animal está submetido a uma experiência aversiva (Graeff, 1990). A observação de que a estimulação da SCP dorsal produz aversão em animais, e medo/ansiedade em humanos,

forneceu indícios de que esta região é um importante elo no circuito cerebral processador do medo e da ansiedade (Behbehani, 1995).

Estudos complementares com estimulação elétrica e química sugerem o envolvimento de diversos neurotransmissores na modulação do comportamento evocado pela SCP dorsal; entre eles acetilcolina, serotonina, opóides, GABA, aminoácidos excitatórios e óxido nítrico (Carrive *et al.*, 1986; Graeff, 1993; Fedynshyn *et al.*, 1989; Brandão *et al.*, Bandler e Depaulis, 1991; Guimarães *et al.*, 1991, De-Souza *et al.*, 1997; Matheus *et al.*, 1994).

Nos últimos anos, estudos comportamentais sobre as reações de defesa, têm destacado o envolvimento do receptor NMDA na mediação destes comportamentos. As injeções sistêmicas de antagonistas competitivos ou não competitivos têm mostrado efeitos ansiolíticos em diversos modelos animais de ansiedade (Bennett *et al.*, 1987; Kehne *et al.*, 1991; Stephens *et al.*, 1986). Outros estudos utilizando microinjeções na SCP dorsal de antagonistas do receptor NMDA como o ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico (AP-7) e o ácido quinurênico e antagonistas do sítio da glicina acoplado ao receptor NMDA como o (\pm)-3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidona (HA-966), demonstraram também efeitos ansiolíticos (Guimarães *et al.*, 1991; Schmitt *et al.*, 1991; Matheus *et al.*, 1994; Carobrez *et al.*, 1999).

Como já reconhecido pela literatura, a ativação do receptor NMDA e a conseqüente a entrada de cálcio nos neurônios, forma o complexo cálcio-calmodulina ativando assim as NOS e conseqüentemente a formação do NO. Este por sua vez, agirá no neurônio pré-sináptico promovendo a liberação de glutamado, que ativa novamente os receptores NMDA, dando continuidade ao evento. Dessa maneira, o NO pode ter um mediador tanto em processos fisiológicos como também na neurotoxicidade do glutamato, visto que o último pode induzir a ativação da NOS e formação de NO (Paakkari e Lindsberg, 1995; Dawson *et al.*, 1991). O NO, por sua vez, parece mediar o aumento dos níveis de GMPc que ocorre na ativação dos receptores glutamatérgicos, principalmente do subtipo NMDA (Garthwaite e Boulton, 1995). Estudos com inibidores da NOS, L-NOARG e L-NAME, microinjetados na SCPdl de ratos testados no LCE, mostrando uma resposta ansiolítica, pois aumentaram a exploração dos braços abertos do labirinto por esses animais, sendo esta resposta limitada pela dose do inibidor, sugerindo que este efeito pode ser resultado da interação com o receptor NMDA mediando a neurotransmissão (Guimarães *et al.*, 1994). Um outro estudo, com azul de metileno, inibidor da guanilato ciclase solúvel, microinjetados na SCP dorsal de ratos submetidos ao teste LCE, um aumento significativo tanto no número de entradas como no tempo de

permanência nos braços abertos, indicando o efeito ansiolítico do azul de metileno e o envolvimento da via NO-GMPc na modulação das reações defensivas dessa região (Oliveira e Guimarães, 1999).

Em resumo, a SCPd: é uma estrutura homogênea quanto a sua morfologia, importante dentro do circuito cerebral aversivo processador do medo e ansiedade, sendo que sua estimulação tanto elétrica como química produz aversão em animais e medo/ansiedade em humanos (Behbehani, 1995). Ao contrario do que foi observado com as demais regiões da SCPd, a SCPdl demonstra grande atividade da NOS (Gumarães *et al.*, 1994), sendo assim promissor em avaliar drogas que interferem com o funcionamento da enzima, bem como ampliar os estudos referentes ao comportamento animal e ansiedade, com a referida região.

OBJETIVO

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Considerando que:

- A ansiedade possa incentivar o consumo de álcool;
- A SCP está envolvida com o sistema cerebral aversivo;
- Que especificamente na SCPdl foi observada uma pronunciada atividade do NOS;
- E que recentes evidências sugerem o envolvimento do NO com a ansiedade e também com o desenvolvimento da dependência do álcool.

O presente trabalho teve como objetivo: investigar a influência de drogas que atuam nas vias dependentes do NO presentes na SCPdl no efeito ansiolítico do álcool.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

As etapas seguidas foram as seguintes:

- Determinar o efeito de diferentes doses de etanol em ratos testados no LCE.

- Verificar se um inibidor da enzima NOS, microinjetado na SCPdl, interfere no efeito do etanol, em ratos testados no LCE.
- Investigar a interferência de inibidores da enzima GC solúvel, microinjetadas na SCPdl, na resposta de ratos tratados com etanol testados no LCE.
- Verificar a influência de um doador de NO, microinjetado na SCPdl, no efeito ansiolítico do etanol em ratos testados no LCE.
- Verificar a influência de um análogo do GMPc, microinjetado na SCPdl, no efeito ansiolítico do etanol em ratos testados no LCE.

MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

a) Animais

Foram utilizados 300 ratos machos Wistar com 4 meses de idade, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram alojados em caixas plásticas com forração de serragem, sendo que o número de animais por caixa não ultrapassou a quatro. Os animais tinham livre acesso à água e ração, e eram mantidos em condições padronizadas, com temperatura constante de $23 \pm 1^\circ \text{C}$ e ciclo de luz claro/escuro de 12h (luz das 6:00 h às 18:00 h). O presente estudo procurou seguir as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institutes of Health, dos Estados Unidos e o protocolo experimental foi aprovado pela comissão de ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA No. 058/2001).

b) Drogas

O etanol e hidrato de cloral foram provenientes da Merck (Hawthorne, NY, USA). O etanol foi preparado através da diluição com salina para obter uma concentração de 14% p/v. 7-Nitroindazol (7-NI); S(+)-2-Amino-5-[(aminoiminomethyl) amino] pentanoic acid (L-arginina); 3',5'-

monofosfato sódico de 8-bromoguanosina cíclico (8-Bromo-GMPc) e 6-(phenylamino)-5,8-quimolidione (LY-83,583) foram obtidos da Research Biochemicals International (Natick, MA, USA); pentobarbital sódico, da Abbott Laboratory (São Paulo, Brasil); propilenoglicol, nitroprussiato de sódio (SNP), dimetil sulfóxido (DMSO), monolaurato de polietileno sorbitano (Tween 80), cloreto de sódio (NaCl) foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA). O 7-NI foi diluído numa mistura de DMSO, Tween 80, NaCl e salina. L-arginina, D-arginina e SNP foram diluídos em salina estéril. 8-Bromo-GMPc, LY-83,583 e ODQ foram diluído em uma solução de 0.01% de DMSO e salina. As drogas ou seus veículos foram injetados por via intraperitoneal ou na SCPdl. As doses e os tempos de tratamento foram selecionados através da literatura e/ou experimentos preliminares (Ferreira *et al.*, 1999).

c) Labirinto em cruz elevado (LCE) e arena

O teste comportamental utilizado foi o LCE. Esse modelo animal para avaliar a ansiedade foi desenvolvido a partir do trabalho de Montgomery (1955) e modificado por Handley e Mithani (1984). Posteriormente, Pellow *et al.* (1985) executaram a validação comportamental fisiológica e farmacológica do LCE para ratos.

O LCE é um equipamento feito de madeira, em forma de cruz, composto por dois braços abertos (50 x 10 cm) opostos entre si, e dois braços fechados por uma parede (50 x 10 x 40 cm), também opostos. O equipamento estava elevado 50 cm do chão. Os braços abertos foram circundados com uma proteção em acrílico com 1 cm de altura para evitar a queda dos animais (Figura 2). Uma arena quadrada (60 x 60 x 35 cm), confeccionada igualmente em madeira, foi utilizada imediatamente antes do teste no LCE, com o objetivo de aumentar a atividade exploratória e adaptação dos animais ao ambiente do teste (Lister, 1987).

Os equipamentos usados nos experimentos estavam localizados numa sala parcialmente escura, iluminada com luz vermelha de intensidade de 44 lux. Após testar cada animal, os equipamentos foram limpos com solução de etanol a 10%. O efeito ansiolítico foi definido por um aumento na proporção das entradas nos braços abertos e no tempo de exploração naqueles braços, relativo ao número total de entradas em ambos os braços e também ao tempo total experimental. Uma diminuição naqueles parâmetros foi considerada indicativo de um efeito ansiogênico (Pellow et al., 1985; Lister, 1987). Uma redução no número de entradas nos braços fechado foi indicativa de efeito sedativo.

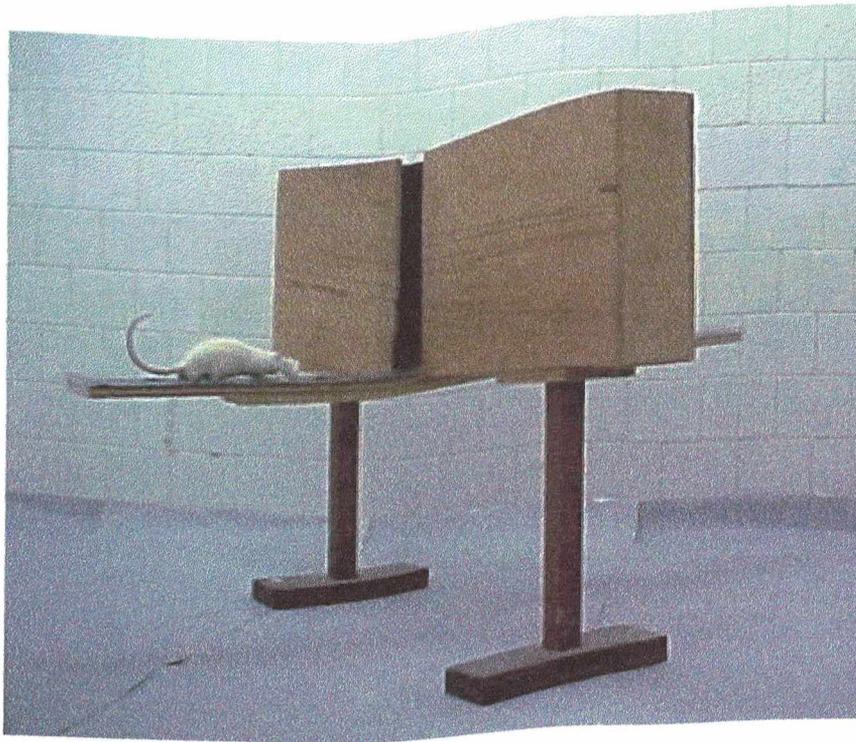


Figura 2 – Labirinto em cruz elevado empregado nos experimentos.

e) Cirurgia estereotáxica

Ratos foram colocados em um aparelho estereotáxico para implantação de cânulas direcionadas para substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral (SCPdl), sob anestesia com Equitesin[®] (Figura 3). Este anestésico foi preparado misturando-se as duas soluções. A solução *A* continha hidrato de cloral (8,5 g), MgSO₄.7H₂O (4,252 g) e H₂O (91,40 ml). A solução *B* continha pentobarbital sódico (1,94 g), etanol (13,0 ml) e

propilenoglicol (85,6 ml). O volume injetado foi 0,3 ml/100 g do peso corporal de cada animal.

Em seguida foi realizada a assepsia da área com álcool iodado, e 0,1 ml de uma solução de xilocaína com adrenalina (2%) foi injetada subcutaneamente por todo o campo cirúrgico. A calota craniana foi exposta numa área de 3 a 4 mm posterior à sutura lambdóide até 3 a 4 mm anterior à sutura coronária através da remoção de uma área ovalada. O perióstio de toda a região foi raspado. Em seguida, o crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem situados em um mesmo plano horizontal. O osso foi novamente seco e a calota perfurada com uma broca odontológica para fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula-guia. Para o implante da cânula-guia na SCPdl, as coordenadas obedecidas, segundo Paxinos e Watson (1986), foram as seguintes: 7,6 mm posterior ao bregma (AP - 7,6 mm); 1,9 mm lateral a linha mediana (ML + 1,9 mm) e 2 mm a partir da superfície ventral do crânio (DV - 2 mm). A cânula foi introduzida com um ângulo de 22°. Uma vez adaptados parafusos e cânula, novamente o osso foi seco e a área aberta preenchida com cimento de acrílico, que ao endurecer, incorporou todas as peças em uma sólida prótese.

Ao final da cirurgia, cada animal foi colocado numa caixa específica para recuperação, dotada de um aquecedor, até o despertar. Posteriormente os animais foram removidos para uma caixa num total de quatro animais, onde receberam água e comida livremente, e ali permaneceram por sete dias até serem utilizados no modelo animal escolhido.

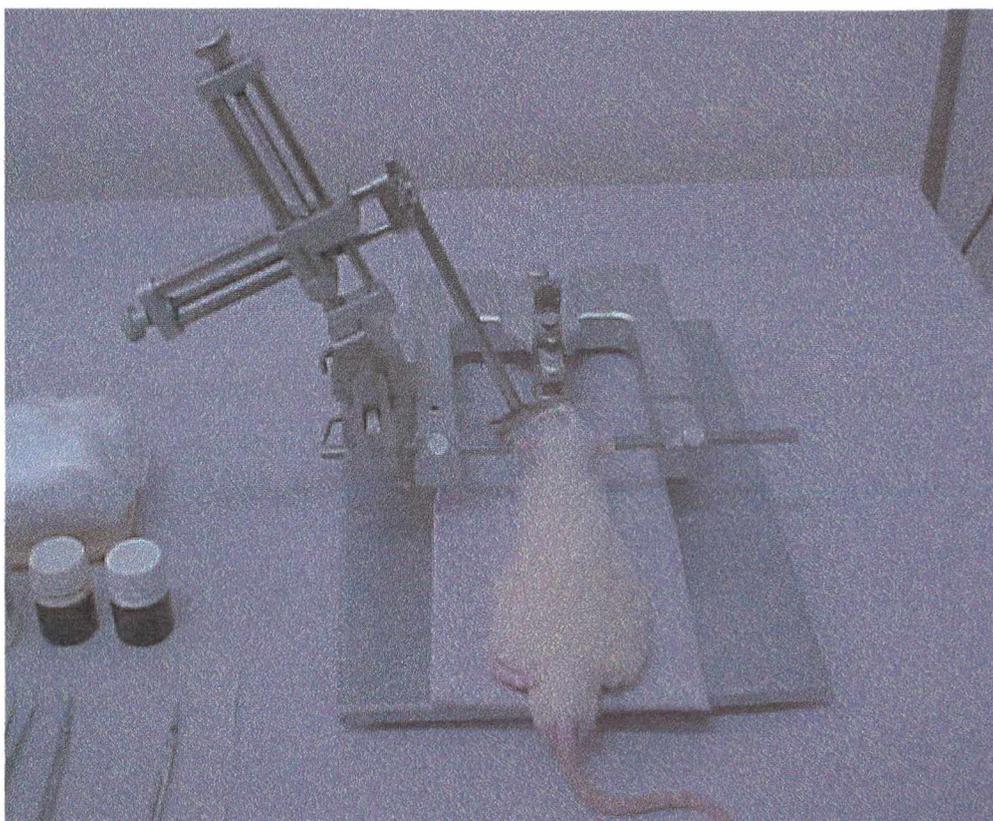


Figura 3 - Aparelho estereotáxico utilizado para realizar as implantações das cânulas na SCPdl.

f) Cânulas

As cânulas foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm ou 30 x 7 mm, foram cortadas medindo 13 mm e baseadas na medição com paquímetro. Em cada cânula foi introduzido um fio de aço (mandril) para prevenir a obstrução.

g) Microinjeções intracerebral

Foram utilizadas agulhas de 16,2 mm de comprimento (0,3 mm de diâmetro), adaptadas a partir de agulhas odontológicas, conectadas a microseringas (Hamilton, 10 µl), por um tubo de polietileno. As seringas foram preenchidas com água destilada e com a solução a ser injetada, separada por uma bolha de ar (o movimento anterógrado da bolha indicava haver o fluxo da injeção da droga).

Para a microinjeção, cada animal foi imobilizado com auxílio de um pano, e foi retirado o mandril adaptado à cânula com auxílio de um alicate. A cânula-guia foi desobstruída com auxílio de uma lima odontológica. Posteriormente a agulha foi introduzida suavemente através da cânula, e foi injetado 0,5 µl de solução, deixando-a no local por 30 segundos. Ao final da microinjeção o animal foi encaminhado a arena para o início do teste comportamental.

h) Histologia

Após os testes comportamentais, cada animal foi anestesiado novamente com Equitesin[®] e perfundido transcárdiacamente com NaCl 0,9% seguido de formalina 10%. Posteriormente os cérebros receberam uma microinjeção de azul de Evans para marcar exatamente a localização das microinjeções. Seguiu-se a decapitação e a remoção dos respectivos cérebros, que foram mantidos em solução de formalina 10% por cerca de 5 dias. Os cortes cerebrais foram obtidos usando um micrótomo de congelamento, sendo em seguida colocados em lâminas, que após a secagem dos cortes, foram coradas pela técnica de coloração Nissl por Violeta de Cresila, para posterior análise da posição das cânulas. Os sítios de injeção foram verificados histologicamente sob um microscópio óptico, de acordo com o Atlas Paxinos & Watson (1997).

i) Procedimento experimental

O procedimento foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foram analisados diferentes doses de etanol, injetadas intraperitonealmente em ratos testados no labirinto em cruz elevado ou no labirinto em T elevado. Uma vez que os melhores resultados para avaliação do efeito ansiolítico do álcool foram obtidos no LCE, na segunda etapa, animais com cânulas

implantadas estereotaxicamente na SCPdl, foram injetados com drogas com ação nas vias dependentes do NO testados apenas no LCE.

Na primeira etapa, um grupo de animais foi dividido em 5 subgrupos de 10 animais e receberam intraperitonealmente diferentes doses de etanol (0,8; 1,0; 1,2 ou 1,4 g/kg, i.p.) ou salina. Após 15 minutos foram testados no LCE.

Na segunda etapa, foram realizados 7 experimentos. Em parte dos experimentos, após se recuperarem da cirurgia, os animais foram separados em grupos para receberem uma dose de etanol que não produzia efeito ansiolítico per se (1,0 g/kg) ou salina, por via i.p. Após 10 minutos, cada grupo foi subdividido em vários subgrupos que receberam injeções intracerebrais das seguintes drogas: 7-NI (40 nmol, inibidor da NOS), 7-NI (40 nmol) + L-arg (600 nmol, precursor do NO), 7-NI (40 nmol) + D-arg (600 nmol, enantiômero da L-arg), ODQ (1 nmol, inibidor da GCs), LY-83583 (5 nmol ou 10 nmol, inibidor da GCs). A outra parte dos experimentos foi realizada com a dose de 1,2 g/kg de etanol, que produzia um efeito ansiolítico claro e replicável. Após o período para recuperação d cirurgia, grupos de animais foram injetados com essa dose de etanol, e após 10 minutos, por via intra-SCPdl uma das seguintes drogas: 8-Bromo-GMPc (40 nmol, análogo do GMPc) ou SNP (40 nmol ou 80 nmol, doador de NO).

Para cada tratamento havia paralelamente grupos controles injetados com veículos, por via intracerebral ou com salina por via i.p. A seguir cada animal era colocado individualmente na arena durante 5 minutos. O animal era então transferido para o centro do LCE, e seu comportamento observado durante 5 minutos.

O comportamento foi analisado no teste do labirinto em cruz elevado 5 ou 15 min após as injeções intraperiaquedutal ou intraperitoneal, respectivamente. Cada animal foi colocado na arena por 5 minutos. Em seguida, cada rato foi transferido para o centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados, e deixado para explorá-lo durante 5 minutos. O observador anotava o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos/fechados. Após cada teste o labirinto era limpo com álcool 10%. A porcentagem de entradas e porcentagem de tempo de exploração nos braços abertos foram calculadas respectivamente em relação ao número total de entradas nos dois braços e em relação ao tempo total experimental.

j) Análise estatística

Os dados foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) com variáveis independentes: pré-tratamento e tratamento e com variáveis dependentes: porcentagem de entradas nos braços abertos, porcentagem de

tempo nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados para o teste do LCE. A análise *post hoc* foi realizada através do teste LSD. O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

a) Efeitos da administração intraperitoneal de diferentes doses de etanol no comportamento de ratos no LCE.

Através deste experimento procuramos selecionar algumas doses que nos pudessem ser úteis na avaliação da atividade ansiolítica do etanol no LCE. Os animais foram divididos em grupos. O primeiro grupo foi tratado com salina e os demais grupos foram tratados com diferentes doses de etanol (0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 g/kg) (Figura 4). A ANOVA de uma via mostrou haver diferença significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos [$F(4,45) = 9,18$; $p < 0,001$], na porcentagem de tempo de exploração nos braços abertos [$F(4,45) = 15,67$; $p < 0,001$] e no número de entradas no braços fechados [$F(4,45) = 4,12$; $p < 0,001$]. A análise *post-hoc* revelou que a dose de 1,2 g/kg produziu efeitos ansiolíticos mais evidentes, enquanto que a dose de 1,0 g/kg, embora sem significância estatística, mostrou uma tendência de causar efeito ansiolítico e por isso foram empregadas nos experimentos subsequentes. A análise *post-hoc* mostrou que apenas a dose de 1,4 g/kg causou redução significativa do número de entradas nos braços fechados, sugerindo um efeito sedativo do etanol.

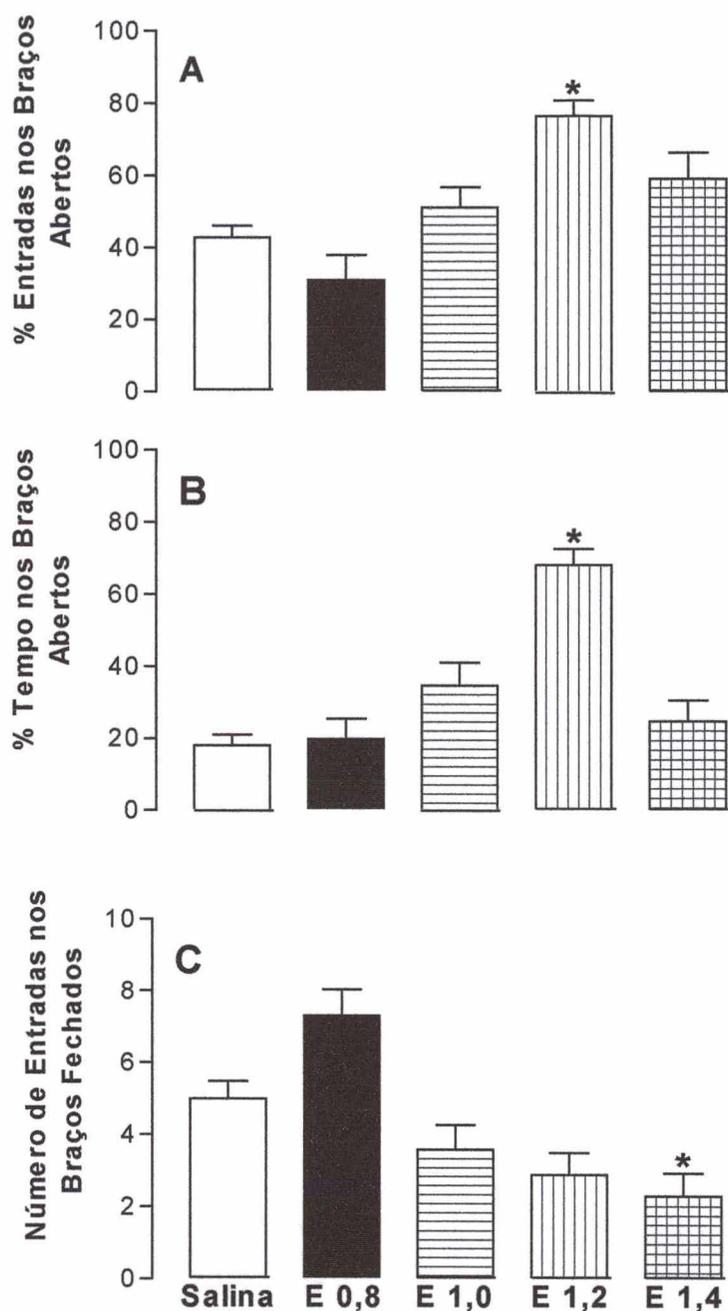


Figura 4 – Efeito da administração intraperitoneal de diferentes doses de etanol no comportamento de ratos no LCE. Ratos injetados I.P. com salina ou etanol (E 0,8; E 1,0; E 1,2; E 1,4 g/kg). Após 10 min. do tratamento, os ratos foram colocados numa arena durante 5 min., decorrido este tempo os animais foram testados no LCE por 5 min. O painel A representa a porcentagem de entradas nos braços abertos, o painel B mostra a porcentagem do tempo nos braços abertos e o painel C o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média \pm epm de 10 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle tratado com salina.

b) Localização histológica dos sítios das injeções intracerebrais

O monitoramento histológico mostrou que a inserção da cânula foi direcionada na porção dorso lateral da SCP (Figuras 5 e 6). Os animais que tiveram as injeções fora dessa região não foram utilizados para análise.

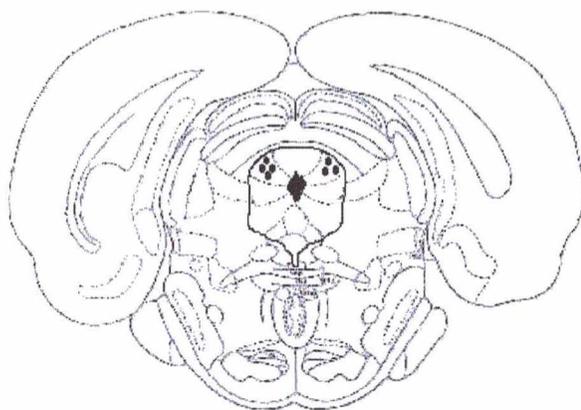


Figura 5 – Secção frontal do Atlas Paxins e Watson (1998), na coordenada de -7,60 a partir do bregma, indicando os sítios de microinjeções de compostos na SCPdl.

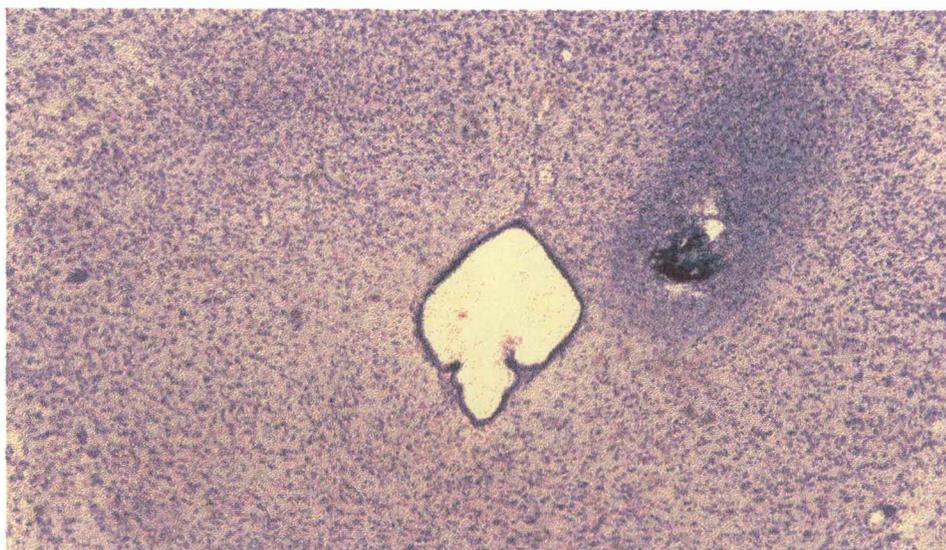


Figura 6 – Foto do corte histológico com coloração de Nissl por violeta de cresila, mostrando o local do sítio da injeção da droga no cérebro de rato.

c) Efeitos da administração intraperiaquedutal de 7-NI no comportamento de ratos tratados com etanol

A injeção intraperiaquedutal de um inibidor competitivo de NOS, 7-NI (40 nmol/0,5 µl), em animais pré-tratados com 1,0 g/kg de etanol, aumentou a porcentagem de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do LCE (Figura 7). Quando administrada isoladamente, a mesma dose de etanol não foi capaz de induzir efeito ansiolítico. A ANOVA de duas vias mostrou que o 7-NI aumentou significativamente a porcentagem de entradas nos braços abertos [pré-tratamento: $F(1,36)= 1,87$; $p<0,10$; tratamento: $F(1,36)= 4,56$; $p<0,05$; interação pré-tratamento x tratamento: $F(1,36)= 0,89$; $p<0,30$], a porcentagem do tempo de exploração dos braços abertos [pré-tratamento: $F(1,36)= 5,92$; $p<0,05$; tratamento: $F(1,36)= 3,30$; $p<0,07$; interação pré-tratamento x tratamento: $F(1,36)= 4,78$; $p<0,05$]. Apesar dos valores do pré-tratamento e a interação avaliados para a entrada nos braços abertos, assim como os valores do tratamento no tempo de permanência nos braços abertos não terem sido estatisticamente significante, a análise *post-hoc* mostrou que a associação do etanol e 7-NI resultou em valores significantes quando comparados com outros grupos (LSD, $p<0,05$). A administração isolada de 7-NI pela via intraperiaquedutal ou em combinação com etanol (1,0 g/kg) não afetou o número de entradas nos

braços fechados. Deve-se enfatizar que a injeção de 7-NI isoladamente não promoveu nenhum efeito na porcentagem de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do labirinto, assim como nos braços fechados.

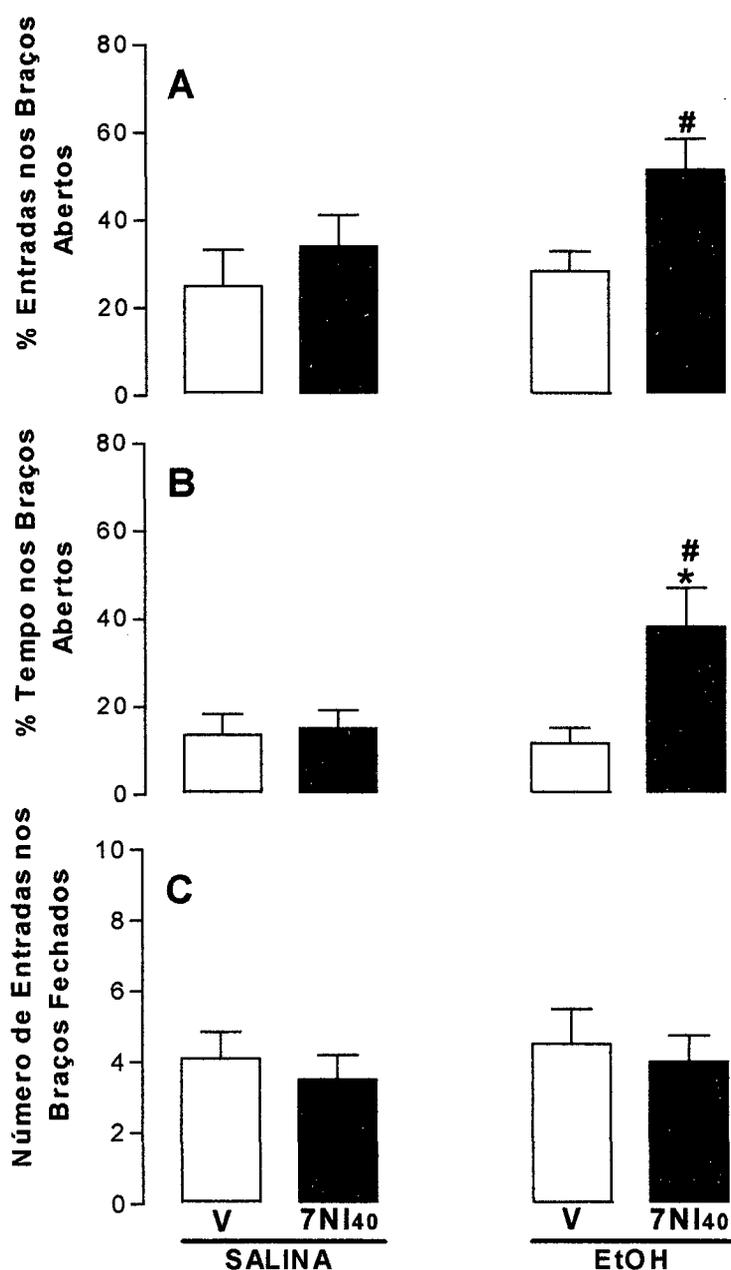


Figura 7 – Efeito do 7-NI na ação do etanol. No pré-tratamento os ratos foram injetados I.P. com salina ou etanol (1,0 g/kg). Após 10 min. foram tratados por via intraperiaquedutal com veículo (V) ou 40 nmol de 7-NI (7NI40). Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min. antes de testá-los no LCE por mais 5 min. O gráfico A apresenta a porcentagem de entradas nos braços abertos, o gráfico B mostra a porcentagem do tempo de exploração nos mesmos braços e o gráfico C o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média \pm epm de 10 animais. * $p < 0,05$ comparados aos respectivos animais controles, injetados com salina + 7-NI (7NI40/S). # $p < 0,05$ comparados aos ratos tratados com etanol + veículo (V/EtOH).

d) Efeitos da administração intraperiaquedutal de 7-NI juntamente com L-arginina ou D-arginina no comportamento de ratos tratados com etanol

Os dois próximos experimentos foram realizados para verificar o efeito da administração de um precursor do NO, a L-arginina, e seu enantiômero, a D-arginina, na influência do 7-NI no efeito ansiolítico do etanol. A ANOVA mostrou uma diferença significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos [tratamento significativo: $F(3,57) = 2,80$; $p < 0,05$] e na porcentagem de tempo de exploração nos braços abertos [pré-tratamento significativo: $F(1,57) = 3,73$; $p < 0,05$ e uma tendência no tratamento: $F(3,57) = 2,20$; $p < 0,10$]. Nos demais fatores, aqui não mencionados, não foram estatisticamente significantes. A análise *post-hoc* confirmou que o pré-tratamento com etanol associado com 7-NI produziu um efeito ansiolítico significativo e que a associação com L-arginina preveniu este efeito (Figura 8). Entretanto, a utilização do enantiômero, D-arginina, não revelou qualquer efeito sinérgico do 7-NI e etanol no comportamento de ratos submetidos ao teste do LCE, porcentagem de entradas nos braços abertos [pré-tratamento: $F(1,72) = 3,29$; $p < 0,07$; tratamento: $F(3,72) = 2,01$; $p < 0,11$; interação pré-tratamento x tratamento: $F(3,72) = 1,16$; $p < 0,30$] e porcentagem de tempo nos braços abertos [pré-

tratamento significante: $F(1,72) = 12,63$; $p < 0,01$; tratamento: $F(3,72) = 1,70$; $p < 0,10$; interação pré-tratamento x tratamento $F(3,72) = 2,47$; $p < 0,06$].

(Figura 9).

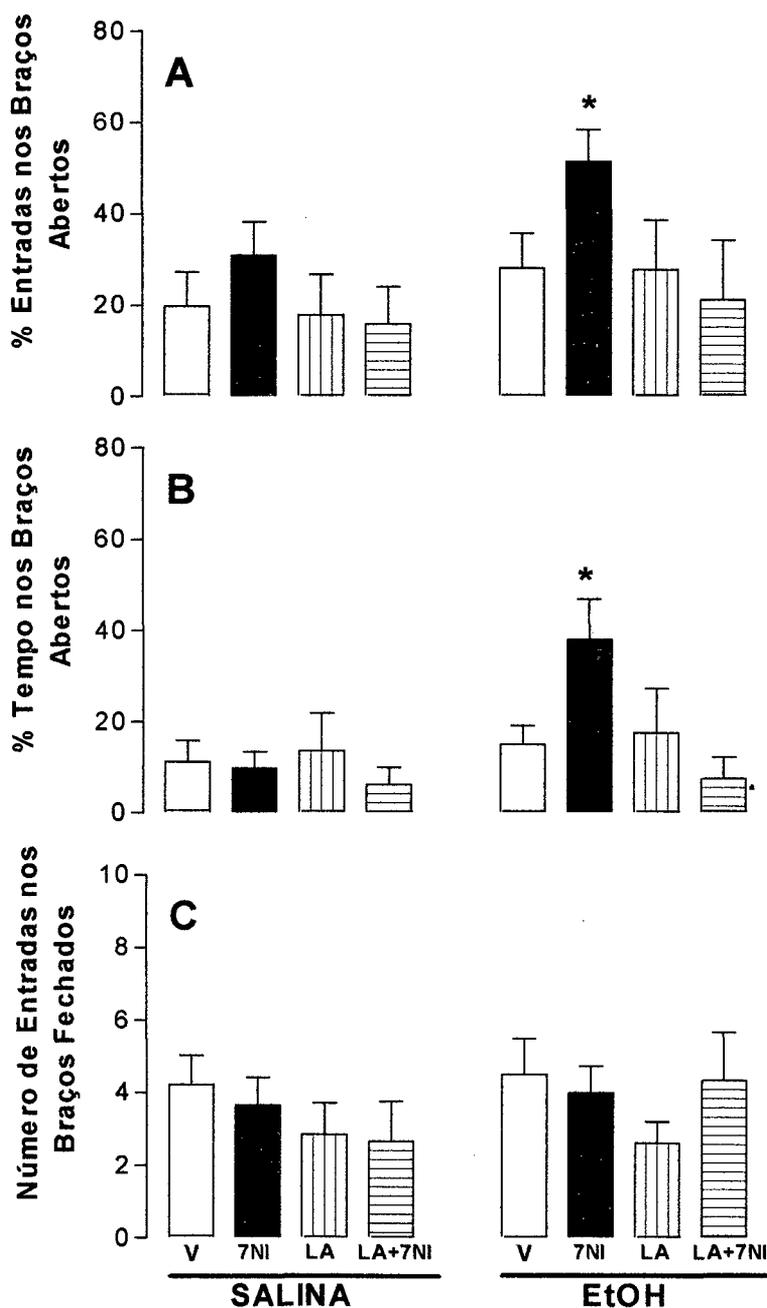


Figura 8 – Efeito da L-arginina na ação do 7-NI em ratos tratados com etanol. No pré-tratamento os ratos foram injetados I.P. com salina ou etanol (1,0 g/kg). Após 10 min., os mesmos foram tratados por via intraperiaquedutal com veículo (V), ou 40 nmol de 7-NI (7NI), ou L-arginina (LA), ou L-arginina + 7-NI (LA+7NI). Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min. antes de testá-los no LCE por mais 5 min. O gráfico A apresenta a porcentagem de entradas nos braços abertos, o gráfico B mostra a porcentagem do tempo de exploração nos mesmos braços e o gráfico C, o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média \pm epm de 10 animais. * $p < 0,05$ comparados aos respectivos animais controles, injetados com 7NI/salina ou L-arg + 7NI/salina).

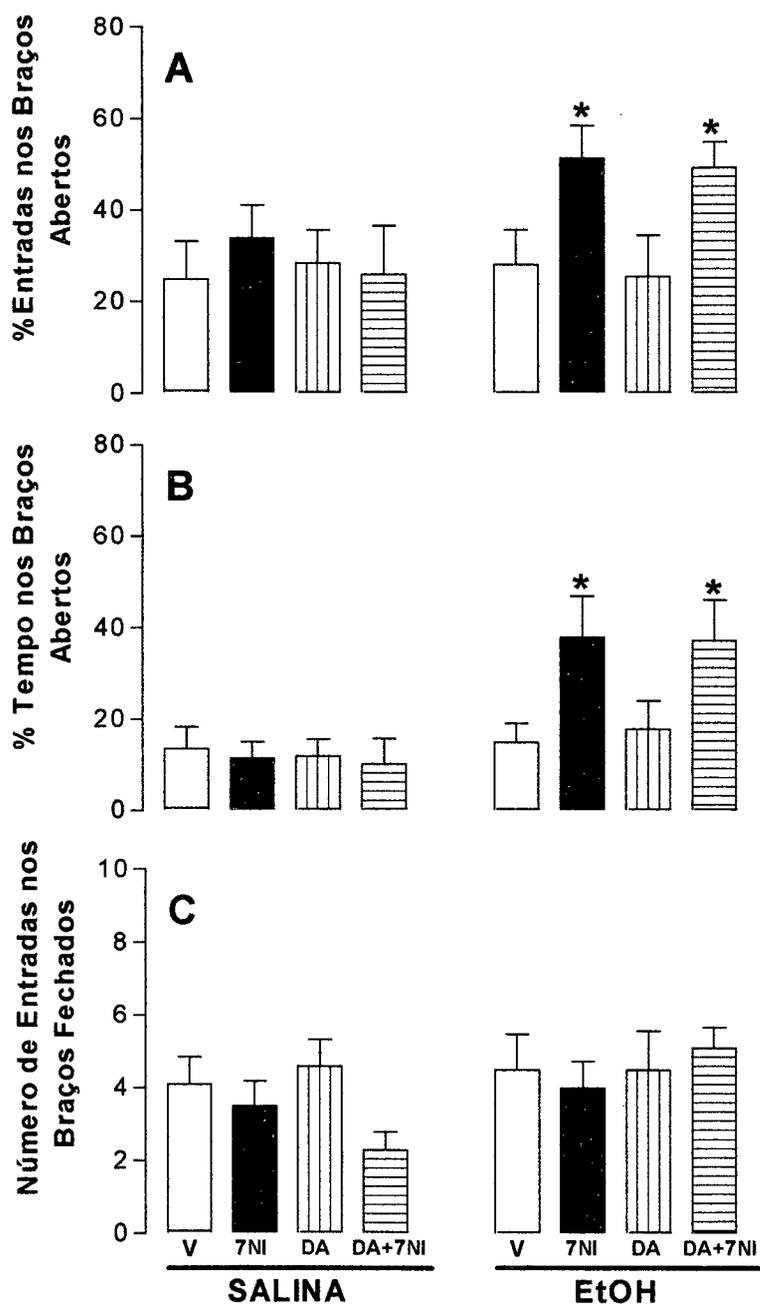


Figura 9 – Efeito da D-arginina na ação do 7-NI em ratos tratados com etanol. No pré-tratamento os ratos foram injetados I.P. com salina ou etanol (1,0 g/kg). Após 10 min., os mesmos foram tratados por via intraperiaquedutal com veículo (V), ou 40 nmol de 7-NI (7NI), ou D-arginina (DA), ou D-arginina + 7-NI (DA+7NI). Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min. antes de testa-los no LCE por mais 5 min. O painel A apresenta a porcentagem de entradas nos braços abertos, o painel B mostra a porcentagem do tempo de exploração nos mesmos braços e o painel C, o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média \pm epm de 10 animais. * $p < 0,05$ comparados aos respectivos animais controles, injetados com 7NI/salina ou DA + 7NI/salina).

e) Efeitos de inibidores da guanilato ciclase solúvel no comportamento de ratos pré-tratados com etanol

A administração intraperiaquedutal do inibidor da GCs (enzima que catalisa a formação do GMPc), ODQ, em ratos pré-tratados com etanol 1,0 g/kg, resultou no aumento da porcentagem de entradas e a porcentagem no tempo de exploração nos braços abertos. Para os valores obtidos com a administração de ODQ (1 nmol) 10 min após o pré-tratamento com etanol, a ANOVA mostrou uma diferença significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos [pré-tratamento: $F(1,36)= 2,69$; $p<1,10$; tratamento: $F(1,36)= 6,02$; $p<0,01$ e interação pré-tratamento x tratamento: $F(1,36)= 3,28$; $p<0,07$], uma diferença significativa na porcentagem no tempo de exploração nos braços abertos [pré-tratamento: $F(1,36)= 1,50$; $p<0,22$; tratamento significativo: $F(1,36)= 7,67$; $p<0,05$ e interação pré-tratamento x tratamento: $F(1,36)= 0,58$; $p<0,40$] e não apresentou diferença significativa no número de entradas nos braços fechados. Apesar dos valores da interação avaliados na porcentagem de entrada e porcentagem de tempo nos braços abertos, mostrarem apenas uma tendência ao efeito, o teste *post-hoc*, confirmou a diferença em comparação aos grupos tratados com salina, dos grupos tratados com etanol (Figura 10).

No experimento seguinte, em que utilizamos o LY83.583 (5 nmol e 10 nmol) 10 min após o pré-tratamento com etanol, houve um aumento na porcentagem de entrada e na porcentagem do tempo de exploração nos braços abertos. A ANOVA revelou uma diferença significativa na porcentagem de entrada nos braços abertos [pré-tratamento: $F(1,71)= 1,39$; $p < 0,20$; tratamento: $F(2,71)= 1,03$; $p < 0,30$ e interação pré-tratamento x tratamento significativa: $F(2,71)= 7,80$; $p < 0,01$] e uma tendência ao efeito significativo na porcentagem do tempo de exploração nos braços abertos [pré-tratamento: $F(2,71)= 3,53$; $p < 0,06$; tratamento: $F(2,71)= 0,36$; $p < 0,50$ e interação pré-tratamento e tratamento: $F(2,71)= 1,89$; $p < 0,10$].

A análise post-hoc mostrou que o LY83.583 (10 nmol) *per se* causou um aumento significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE. Além disso, o teste mostrou que a dose de 5nmol de LY83.583 associado com etanol 1,0 g/kg levou ao aumento da porcentagem de entradas e do tempo de exploração dos lados abertos do LCE (Figura 11).

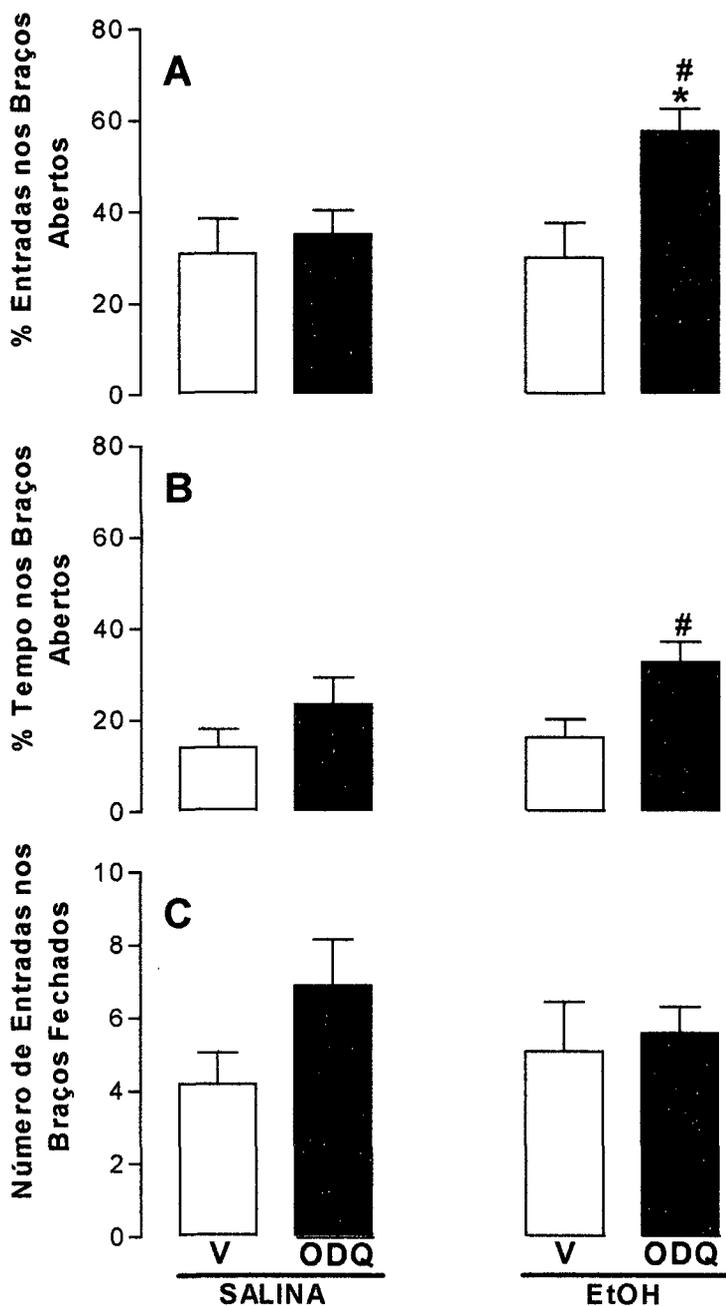


Figura 10 – Efeito do ODQ na ação do etanol. No pré-tratamento os ratos foram injetados I.P. com salina ou etanol (1,0 g/kg). Após 10 min. foram tratados por via intraperiaquedutal com veículo (V), ou ODQ 1 nmol (ODQ). Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min. antes de testá-los no LCE por mais 5 min. O gráfico A apresenta a porcentagem de entradas nos braços abertos, o gráfico B mostra a porcentagem do tempo de exploração nos mesmos braços e o gráfico C, o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média \pm epm de 10 animais. * $p < 0,05$ comparados aos respectivos animais controles, injetados com salina + ODQ. # $p < 0,05$ comparados aos animais tratados com etanol + veículo.

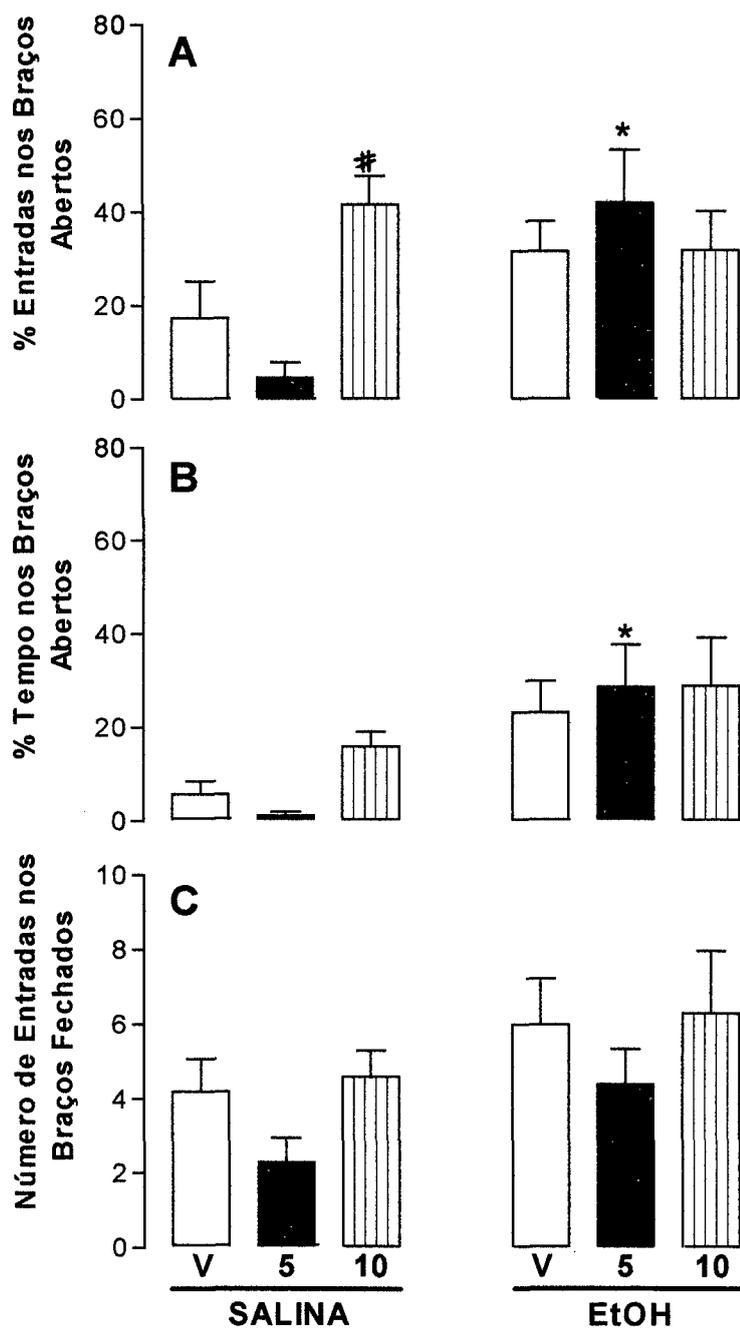


Figura 11 – Efeito do LY83.583 na ação do etanol. No pré-tratamento os ratos foram injetados I.P. com salina ou etanol (1,0 g/kg). Após 10 min. foram tratados por via intraperiaquedutal com veículo (V), ou LY 5 ou 10 nmol (5 ou 10). Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min., antes de testá-los no LCE por mais 5 min. O gráfico A apresenta a porcentagem de entradas nos braços abertos, o gráfico B mostra a porcentagem do tempo de exploração nos mesmos braços e o gráfico C, o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média \pm epm de 10 animais. * $p < 0,05$ comparados aos respectivos animais controles, injetados com salina + LY83.583 (5 nmol). # $p < 0,05$ comparados aos animais tratados com salina + veículo.

f) Efeito do 8-Bromo-GMPc no efeito ansiolítico do etanol

A administração intraperiaquedutal de um análogo do GMPc, 8-Br-GMPc (40 nmol) 10 min após a injeção intraperitoneal de etanol (1,2 g/kg), resultou numa diminuição significativa no efeito ansiolítico induzido por esta dose de etanol. Através da ANOVA, observou-se que o 8-Br-GMPc reduziu significativamente o aumento na percentagem de entrada nos braços abertos induzido pelo etanol (1,2 g/kg) [pré-tratamento significativo: $F(1,28)= 12,15$; $p<0,001$; tratamento: $F(1,28)= 2,97$, $p<0,09$ e interação pré-tratamento x tratamento: $F(1,28)= 1,76$; $p<0,10$] e a percentagem no tempo de exploração nos braços abertos [pré-tratamento significativo: $F(1,28)= 16,83$; $p<0,001$; tratamento: $F(1,28)= 2,37$; $p<0,10$ e interação pré-tratamento x tratamento: $F(1,28)= 2,49$; $p<0,10$](Figura 12). O 8-Br-GMPc não teve efeito na percentagem de entradas ou no tempo de exploração nos braços abertos *per se*. Quando administrado isoladamente ou em combinação com etanol, o 8-Bromo-GMPc não causou diferenças significativas no número de entradas nos braços fechados, sugerindo assim que esta droga não alterou a atividade locomotora dos animais.

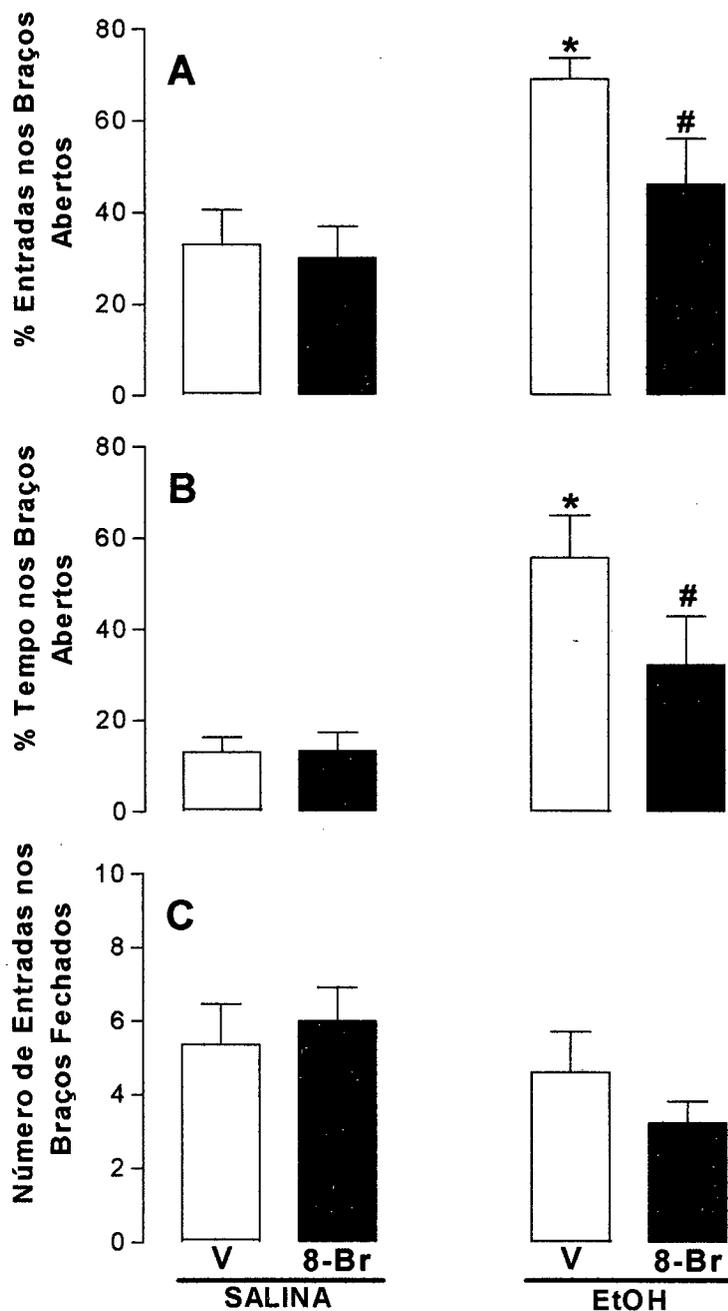


Figura 12 – Efeito do 8-Bromo-GMPc na ação do etanol. No pré-tratamento os ratos foram injetados I.P. com salina ou etanol (1,2 g/kg). Após 10 min. foram tratados por via intraperiaquedutal com veículo (V), ou 8-Bromo-GMPc 40nmol (8-Br). Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min. antes de testá-los no LCE por mais 5 min. O gráfico A apresenta a porcentagem de entradas nos braços abertos, o gráfico B mostra a porcentagem do tempo de exploração nos mesmos braços e o gráfico C, o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média \pm epm de 10 animais. * $p < 0,05$ comparados aos respectivos animais controles, injetados com salina + 8-Br. # $p < 0,05$ comparados aos ratos tratados com etanol + veículo.

g) Efeito de doador de NO no comportamento de ratos tratados com etanol

A administração intraperiaquedutal de um doador de NO, SNP, impediu o efeito ansiolítico induzido pelo etanol (1,2 g/kg, I.P.). O SNP diminuiu significativamente o aumento na porcentagem de entrada nos braços abertos induzido pelo etanol (1,2 g/kg) [pré-tratamento: $F(1,42)=1,84$; $p<0,10$; tratamento significante: $F(2,42) = 7,66$; $p < 0,002$ e interação pré-tratamento x tratamento: $F(2,42)= 2,08$; $p<0,10$] e a porcentagem do tempo de exploração nos braços abertos [pré-tratamento: $F(1,42)= 3,51$; $p<0,06$; tratamento significante: $F(2,42)= 4,88$; $p<0,01$ e interação pré-tratamento x tratamento: $F(2,42)= 2,98$; $p<0,06$]. A análise *post-hoc* mostrou que a dose de 80 nmol produziu efeito significativo, em comparação aos controles, mas a dose de 40 nmol mostrou apenas uma tendência para reduzir os efeitos do etanol (Figura 13). Quando administrado isoladamente o SNP (40 ou 80 nmol) não causou diferenças significativas na porcentagem de entrada e do tempo de exploração nos braços abertos, assim como no número de entradas nos braços fechados. A dose maior de SNP (80 nmol), causou uma diminuição significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos e na porcentagem do tempo de exploração nos braços abertos do grupo tratado com etanol em relação aos animais controles.

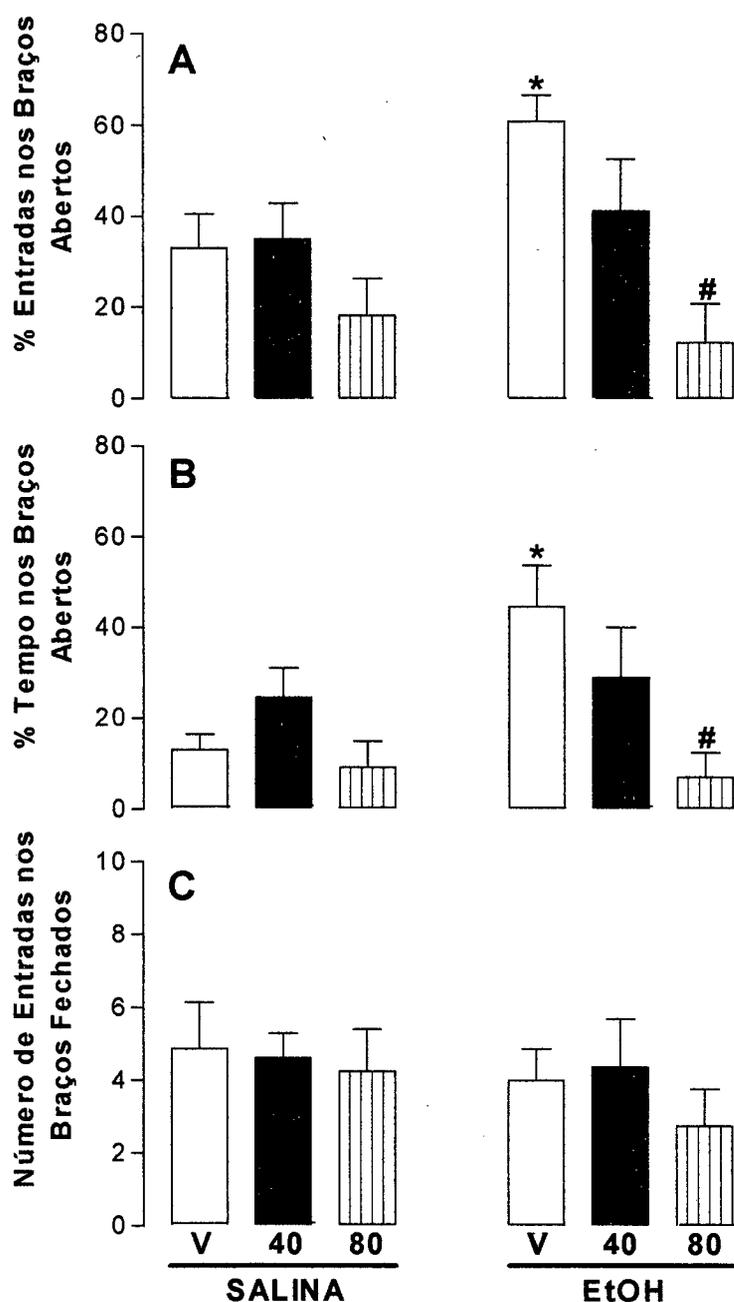


Figura 13 – Efeito do SNP na ação do etanol. No pré-tratamento os ratos foram injetados I.P. com salina ou etanol (1,2 g/kg). Após 10 min. foram tratados intraperiaquedutal com veículo (V), ou SNP (40 ou 80 nmol). Os ratos foram colocados em uma arena por 5 min. antes de testá-los no LCE por mais 5 min. O gráfico A apresenta a porcentagem de entradas nos braços abertos, o gráfico B mostra a porcentagem do tempo de exploração nos mesmos braços e o gráfico C, o número de entradas nos braços fechados. Cada valor representa a média \pm epm de 10 animais. * $p < 0,05$ comparados aos respectivos animais controles, injetados com salina + veículo. # $p < 0,05$ comparados aos ratos tratados com etanol + veículo.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se a participação de vias dependentes do NO presente na SCPdl no efeito ansiolítico produzido pelo etanol. Embora muitos estudos tenham sugerido a participação dessas vias em efeitos crônicos do etanol (Chandler *et al.*, 1997; Uzbay *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1999; Zima *et al.*, 1998; Phillips *et al.*, 2000) outras respostas decorrentes do efeito agudo desta droga não são plenamente compreendidas, como efeito ansiolítico, euforizante, incoordenação motora e prejuízo cognitivo.

Neste trabalho, escolheu-se a SCPdl para estudar a participação do NO no efeito ansiolítico do etanol porque sugere-se que esta área, juntamente com o hipotálamo medial e amígdala, constitua o sistema cerebral aversivo e esteja envolvida com respostas comportamentais relacionadas com a ansiedade em animais (Brandão *et al.*, 1999; Guimarães *et al.*, 1994). Além disso, estudos de mapeamento da localização da NOS na SCP têm mostrado sua localização na porção dorso-lateral, esta constitui um importante regulador das reações de defesa (Guimarães *et al.*, 1994). Decidiu-se por esta abordagem como uma forma de ampliar os conhecimentos sobre a interação NO/etanol/ansiólise e complementar resultados obtidos previamente em nosso laboratório, realizados em outra área cerebral (Ferreira *et al.*, 1999).

Observou-se aqui, a exemplo daqueles resultados da região hipocampal, que componentes que regulam as vias do NO alteram as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade induzidas pelo etanol. É importante ressaltar que as alterações foram observadas com doses das drogas que *per se* não alteraram os comportamentos dos animais.

No que diz respeito a avaliação dos comportamentos relacionados com ansiedade no LCE, é importante observar que ratos normalmente se esquivam dos braços abertos do labirinto, preferindo permanecer nos braços fechados, enquanto que ratos tratados com drogas com propriedades ansiolíticas mostram uma diminuição da esquiva quando encontram-se nos braços abertos. Isto sugere que a ausência das paredes laterais dos braços abertos do labirinto sinaliza ao rato um lugar inseguro, gerando um comportamento aversivo, verificado pela preferência do animal pelo lado fechado. Este fato tem levado a considerar os labirintos como um estímulo ansiogênico (Treit *et al.*, 1993). Comparando essas informações com os nossos resultados, verifica-se que o etanol, na dose de 1,2 g/kg, aumentou a frequência de entradas e o tempo de exploração dos animais nos braços abertos quando testados no LCE, sem afetar a atividade locomotora destes animais. Este último parâmetro foi estimado pela frequência de entradas nos braços fechados, sugerindo-se um efeito ansiolítico produzido por aquela

droga. (Dudek *et al.*, 1986; File, 1994). Por outro lado, esse perfil de resposta não foi observado quando a dose de etanol foi reduzida a 1,0 g/kg. Esses dados estão de acordo com resultados anteriores obtidos em nosso laboratório (Ferreira e Morato, 1996, 1997).

Um importante resultado de nosso estudo foi o efeito do 7-NI, inibidor preferencial da NOSn e conseqüentemente a síntese do NO, administrado diretamente na SCPdl, em aumentar a efetividade da dose de 1,0 g/kg de etanol. Esta interação levou a um aumento nos parâmetros de entradas e de tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE, sem afetar as entradas nos braços fechados, sugestivos de uma resposta ansiolítica. Estes resultados reforçam aqueles obtidos previamente, quando as administrações tanto intrahipocampal quanto intraperitoneal de 7-NI associadas com etanol que elevaram os índices indicativos de atividade ansiolítica no mesmo teste (Ferreira *et al.*, 1999). Em conjunto com outros resultados, esta inibição de enzima no SNC pode estar relacionada com a ansiólise causada pelo etanol (Moore *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1999; Vassiljev *et al.*, 1998).

Além disso, a L-arginina, precursor do NO (Moncada *et al.*, 1991), mas não o seu enantiômero D-arginina, preveniu o efeito sinérgico do 7-NI em relação ao etanol. É interessante observar que outros inibidores da NOS, entre eles a L-NOARG e L-NAME, aumentaram a duração do tempo de

sono induzido pelo etanol (Adams et al., 1994; Vassiljev et al., 1998). Quando microinjetados na SCPdl, essas drogas aumentaram a exploração dos ratos dos braços abertos do LCE, sugerindo uma resposta ansiolítica para aqueles inibidores (Volke *et al.*, 1995). Em adição, injeções periféricas agudas ou sub-crônicas de 7-NI em ratos submetidos aquele mesmo teste, produziram uma resposta ansiolítica dependente da dose (Dunn *et al.*, 1998). Estes dados sugerem a modulação das reações de defesa pelas vias dependentes de NO.

Nossos dados diferem de resultados que sugerem que a administração sistêmica de inibidores da síntese de NO antagonizou o efeito ansiolítico do clordiazepóxido e do óxido nitroso em camundongos testados no LCE (Quock e Nguyen, 1992; Caton *et al.*, 1994). Outro estudo contraditório ao nosso, apresentou uma diminuição na exploração do LCE pelos ratos tratados com L-NOARG, sugerindo uma resposta ansiogênica desse inibidor (De Oliveira *et al.*, 1997). No entanto, as diferenças nos mecanismos subjacentes às ações do etanol e das outras drogas ansiolíticas empregadas nesses estudos, bem como nos protocolos e espécies animais usadas, poderiam justificar esse fato. Outra diferença que pode justificar este fato são as doses empregadas nos experimentos, visto que em estudos com doses mais elevadas dos inibidores da NOS tenderam inibir a exploração dos

animais no LCE e estudos com doses menores melhoram a exploração no mesmo teste, então a taxa de dose efetiva é limitada e apresenta a curva dose-resposta em forma de U invertida.

Nós também testamos a influência da inibição da síntese do GMPc por inibidores específicos da GCs, ODQ e LY83.583, no efeito do etanol, sugerindo que o bloqueio da produção do GMPc poderia aumentar a eficácia da ansiólise promovida pelo etanol. O resultados com ODQ e LY83.583 associados com etanol, mostraram um aumento significativo na porcentagem de entradas e no tempo de exploração nos braços abertos do LCE, quando comparados com valores obtidos com cada droga *per se*. Estes resultados estão de acordo com dados de outros estudos em que o azul de metileno, outro inibidor da GCs e da produção do GMPc (Moncada *et al.*, 1991), microinjetado dentro da SCPd, resultaram num efeito ansiolítico no LCE (Oliveira e Guimarães, 1999; Oliveira *et al.*, 2000). No entanto, a administração de LY83.583, somente alterou o efeito do álcool na dose de 5 nmol, e na dose mais elevada (10 nmol), apresentou um efeito ansiolítico *per se*. Esses dados são compatíveis com dados da literatura como descrito anteriormente (Oliveira e Guimarães, 1999; Oliveira et al, 2000).

Considerando que a inibição da síntese do GMPc aumentou o efeito de uma dose sub-efetiva de etanol neste teste, no próximo experimento

verificamos a influência do 8-Bromo-GMPc, um análogo do GMPc permeável à membrana (Garg e Hassid, 1989), na ação de uma dose de etanol que produz um efeito ansiolítico *per se* (1,2 g/kg). Os dados mostraram que microinjeções de 8-Bromo-GMPc na SCPdl, produziram uma atenuação significativa do aumento em ambas medidas comportamentais, porcentagem de entrada e porcentagem do tempo de exploração nos braços abertos, conseqüente à administração sistêmica de etanol, sugerindo que o etanol e o análogo do GMPc exibem efeitos opostos. Além disso, outro resultado mostrou que microinjeções de SNP, um doador de NO (Southam e Garthwaite, 1991), também reduziu o efeito da dose ansiolítica do etanol. Esse resultado está de acordo com nosso estudo prévio no qual a administração intrahipocampal dos doadores de NO, SNP e SNAP reduziram as ações do etanol em ratos testados no LCE (Ferreira *et al.*, 1999). Além disso, concorda com o trabalho que observou ratos que receberam intra-SCPdl de doadores de NO, SIN-1 e DEA/NO apresentaram reação de fuga (Oliveira *et al.*, 2000).

Apesar de não estarem bem compreendidos os mecanismos pelos quais as vias nitrégicas opõem-se ao efeito do etanol, várias as hipóteses que podem ser sugeridas para este entendimento. Uma possibilidade relaciona-se com a participação dos receptores NMDA, que exercem um importante

papel na geração de NO no cérebro (Contestabile, 2000). A ativação dos receptores NMDA exerce uma potente ação ansiogênica avaliada em vários testes comportamentais, e o bloqueio da transdução de sinal através dos canais acoplados ao NMDA poderia ser uma possível explicação para as ações ansiolíticas de algumas drogas, entre elas o etanol. Alguns estudos têm sugerido que um dos locais de ação do álcool poderia ser o sítio da glicina localizado no receptor NMDA (Ferreira e Morato, 1996, 1997; Popp *et al.*, 1999; Nunes *et al.*, 2000). É possível que a redução da entrada de íons Ca^{++} através dos canais dos receptores NMDA, após o bloqueio por etanol, possa interferir em toda uma cascata de sinalização neuronal. Cabe lembrar que a rápida ativação da NOS neuronal e liberação de NO deve-se a etapas iniciais que envolvem a ligação dos íons Ca^{++} à calmodulina (Knowles *et al.*, 1989). Portanto, qualquer interferência naqueles influxos iônicos poderia resultar em alterações na produção de NO e conseqüentemente nas respostas relacionadas à ansiedade. Em adição, a co-administração de D-cicloserina (DCS), agonista parcial do sítio da glicina no receptor NMDA, impediu a resposta ansiolítica induzida pela associação do 7-NI com o etanol. Estes resultados sugerem uma possível interação entre vias dependentes do NO e o receptor NMDA na modulação do efeito ansiolítico do etanol (Ferreira, 2000).

Assim, apesar de não se ter usado drogas que agissem nesses receptores no presente estudo, sugere-se que os mecanismos pelos quais as vias dependentes de nucleotídeos cíclicos diminuem o efeito do etanol poderia envolver a ligação NMDA/NO/GMPc.

Evidências indicam que o NO medeia o aumento na produção de GMPc subsequente a ativação do receptor NMDA no sistema nervoso central (Bredt e Snyder, 1989; East e Garthwaite, 1991) por meio da ativação da GCs (Bredt e Snyder, 1990; Dawson e Snyder, 1994). Entretanto, o papel do NO na neurotransmissão mediada pelo NMDA é bastante complexo e apresenta algumas contradições, sendo difícil definir em que direção o NO atua. Alguns estudos mostram que o NO pode não somente aumentar o GMPc, mas também inibir a entrada intracelular de cálcio induzida pelo NMDA e a atividade de NOS, exercendo um “feedback” negativo e tendo um efeito oposto (Cappendijk *et al.*, 1993; Hoyt *et al.*, 1992; Ikeda *et al.*, 1993). Dados mais recentes mostram que o NO pode ter um papel regulatório na excitabilidade dos neurônios da SCP, inibindo a atividade neuronal nesta área (Lovick, 1996; Lovick e Key, 1996). No entanto, não há dados na literatura afirmando se esta modulação é uniforme por toda a extensão da SCP. Assim, existe a possibilidade de que a influência exercida pelo NO seja diferente ao longo das divisões da SCPd.

Em diferentes células, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e o GMPc atuam independentemente, de forma sinérgica ou antagônica, mediando uma gama variada de efeitos, os quais poderiam, indiretamente, ser creditados ao NO. Assim outras possibilidades para explicar de que forma as vias dependentes dos nucleotídeos cíclicos reduzem o efeito ansiolítico do etanol, poderiam envolver ações: a) diretamente sobre canais iônicos dependentes de GMPc; b) sobre fosfodiesterase (PDEs) dependentes de GMP, aumentando ou c) diminuindo os níveis de AMPC; e d) agir sobre a ativação das proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG). Portanto, é possível que a sensibilidade para os efeitos agudos do etanol sobre os canais iônicos acoplados a ligantes e outros receptores dependa da magnitude da fosforilação mediada por essas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos.

Em conclusão, tomados em conjunto nossos dados sugerem que a inibição das vias dependentes do NO na SCPdl aumentam a eficácia do etanol em produzir um efeito ansiolítico enquanto que a atividades dessas vias opõem-se a estas ações do etanol.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

1 – A inibição da síntese do NO por 7-NI microinjetados na SCPdl aumentou os parâmetros relacionados com ansiedade avaliados no LCE. Esse efeito foi impedido pela administração da L-arginina, precursor do NO, mas não pelo seu enantiômero D-arginina.

2 – A inibição da guanilato ciclase solúvel por ODQ microinjetado na SCPdl resultou em aumento do efeito ansiolítico do álcool avaliado no LCE. O LY83.583, na dose de 5 nmol aumentou aquele efeito, e na dose de 10 nmol produziu efeito ansiolítico *per se*, sem alterar o efeito do etanol.

3 – O análogo de GMPc, 8-Bromo-GMPc, microinjetado na SCPdl impediu a ação ansiolítica do álcool avaliada no LCE.

4 – A administração intra-SCPdl do doador de NO, Nitroprussiato de sódio, impediu a ação ansiolítica do álcool avaliada no LCE.

5 – Tomados em conjuntos, os resultados do presente estudo sugerem que a inibição das vias dependentes do NO na SCPdl aumenta a eficácia do etanol

em produzir um efeito ansiolítico enquanto que a ativação dessas vias opõe-se a estas ações do etanol.

6 – Dada a complexidade dos eventos envolvidos na regulação do efeito ansiolítico do etanol, muitos estudos serão necessários para elucidá-los.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams ML, Meyer ER, Sewing BN, Cicero TJ. Effects of nitric oxide-related agents on alcohol narcosis. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 18: 969-975, 1994.
- Allan AM, Harris RA. Acute and chronic ethanol treatments alter GABA receptor-operated chloride channels. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 27: 665-670, 1987.
- Allan AM, Mayers CG, Draski LJ. Gamma-aminobutyric acid-activated chloride channels in rats selectively bred for differential acute sensitivity to alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 15: 212-218, 1991.
- Alling C. The biological mechanisms underlying alcohol dependence. *Ugeskr Laeger*, 161: 6912-6917, 1999.
- Bandler R, Carrive P, Depaulis A. Introduction emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In: Depaulis A, Bandler R (eds.). *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, 1991.
- Bandler R, Depaulis A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: Depaulis A, Bandler R. (eds.). *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, 1991.
- Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *TINS*, 17: 379-389, 1994.
- Barbosa ADE, Morato GS. Influence of neurosteroids on the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Eur. J. of Pharmacol.*, 431: 179-188, 2001.
- Barreto PS, Lemos T, Morato GS. NMDA receptor antagonists block the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Add. Biol.*, 3: 55-64, 1998.
- Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progr. Neurobiol.*, 46: 575-605, 1995.
- Beitz AJ. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience*, 7: 133-159, 1982.
- Beitz AJ. The midbrain periaqueductal gray in the rat. 1. Nuclear volume, cell number, density, orientation and regional subdivisions. *J. Comp. Neurol.*, 237: 445-459, 1985.
- Bennett DA, Amrick CL. Antagonists at the N-methyl-D-aspartate receptor produce anticonflict effects. In: *Excitatory amino acid transmission*. New York, pp. 213-216, 1987.

- Blatt SL, Takahashi RN. Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 457-461, 1999.
- Brandão ML, Aguiar JC, Graeff FG. GABA-mediation of the antiaversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 16: 397-402, 1982.
- Brandão ML, Anseloni VZ, Pandóssio JE, De Araújo JE, Castilho VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23: 863-875, 1999.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9030-9033, 1989.
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 682-685, 1990.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, 7: 615-624, 1991.
- Brown ZW, Amit Z. The effects of selective catecholamines depletions by 6-hydroxydopamine on ethanol consumption in rats. *Neurosci. Lett.*, 5: 333-336, 1977.
- Cameron AA, Khan IA, Westlund KN, Willis WD. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-Leuroagglutinin study. II Descending Projections. *J. Comp. Neurol.*, 351: 585-601, 1995.
- Cappendijk SL, DeVries R, Dzoljic MR. Inhibitory effect of nitric oxide (NO) synthase inhibitors on naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice. *Neurosci. Lett.*, 162: 97-100, 1993.
- Carobrez AP, Teixeira KV, Graeff FG. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci. Biobehav. Rev*, 25: 697-709, 2001.
- Carrive P, Schmitt P, Karli P. Flight induced by microinjection of D-tubocurarine or α -bungarotoxin into medial hypothalamus or periaqueductal gray matter: Cholinergic or GABAergic mediation? *Behav. Brain Res.*, 22: 233-248, 1986.
- Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behavior: Functional representation and neuronal organization. *Behav. Brain Res*, 58: 27-47, 1993.

- Castellano C, Populin R. Effects of ethanol on memory consolidation in mice - antagonism by the imidazobenzodiazepine RO-154513 and decrement by familiarization with the environment. *Behav. Brain Res.*, 40: 67-72, 1990.
- Caton PW, Tousman SA, Quock RM. Involvement of nitric oxide in nitrous oxide anxiolysis in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 48: 689-692, 1994.
- CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. I Levantamento Domiciliar Nacional sobre o uso de drogas psicotrópicas. Estudo envolvendo 24 das maiores cidades do estado de São Paulo – 1999. *Boletim CEBRID*, nº 40, 2000.
- CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. O COMEN de Santo Ângelo (RS) em ação! Estudo realizado sobre o uso de drogas entre os estudantes de 1º. e 2º. graus – 2001. *Boletim CEBRID*, nº. 43, 2001a.
- CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. Epidemiologia. Avaliação epidemiológica do período 1988 – 1999. *Boletim CEBRID*, nº. 44, 2001b.
- CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. Quem mata mais? Medicamentos ou Drogas de Abuso? Estatística anual dos casos de intoxicação e envenenamento. Brasil – 1999. *Boletim CEBRID*, nº. 44, 2001c.
- Chandler LJ, Sutton G, Norwood D, Sumners C, Crews FT. Chronic ethanol increases N-methyl-D-aspartate-stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.*, 51: 733-740, 1997.
- Chiavegatto S, Scavone C, Canteras NS. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. *Neuroreport*, 4: 571-576, 1998.
- Chin JH, Goldstein DB. Effects of low concentrations of ethanol on the fluidity of spin-labeled erythrocyte and brain membranes. *Mol. Pharmacol.*, 13: 435-441, 1977.
- Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1: 623-634, 1988.
- Collingridge GL, Lister RAJ. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 40: 143-210, 1996.
- Contestabile A. Roles of NMDA activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res. Rev.*, 32: 476-509, 2000.

- Cordeiro R, Lima Filho EC, Almeida IM. Blood pressure among tannery workers. *Rev. Saúde Pública*, 32: 467-476, 1998.
- Cotrim HP, Leite L, Lyra LG. Forms of hepatic disease in alcoholic patients in Salvador, BA. *Arq. Gastroenterol.*, 25: 4-7, 1988.
- Danysz W, Dyr W, Jankowska E, Glazewski S, Kostowski W. The involvement of NMDA receptors in acute and chronic effects of ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16: 499-504, 1992.
- Davis M, Rainnie D, Cassell M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *TINS*, 7: 208-214, 1992.
- Davis-Cox MI, Fletcher TL, Turner JN, Szarowski D, Shain W. Three-day exposure to low-dose ethanol alters guanine nucleotide binding protein expression in the developing rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 276: 758-764, 1996.
- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and periplial tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7797-7801, 1991.
- Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.*, 14: 5147-5159, 1994.
- De Oliveira CL, Del Bel EA, Guimarães FS. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 56: 55-59, 1997.
- Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4^a ed. DSM-IV. Washington D.C. American Psychiatric Association, 1994.
- Diamond I, Gordon AS. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol. Rev.*, 77: 1-20, 1997.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.*, 51: 7-61, 1999.
- Drachman DA. Cognitive function in man. Does the colinergic system have a special role? *Neurogly*, 27: 738-790, 1977.
- Dudek BC, Maio A, Phillips TJ, Perrone M. Naturalistic behavioral assessment of anxiolytic properties of benzodiazepines and ethanol in mice. *Neurosci. Lett.*, 63: 265-270, 1986.

- Dunn RW, Trent AWR, Peter DC, Cheryl AF. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacology*, 37: 899-904, 1998.
- East SJ, Garthwaite J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci. Lett.*, 123: 17-19, 1991.
- Edwards GJ. Motivation for drinking among men: Survey of a London suburb. *Psychol. Med.*, 2: 260-271, 1972.
- Eisendrath SJ, Brophy JJ. Psychiatric disorders. In: Tierney LM, Mcphee SJ, Papadakis MA (eds). *Current Medical Diagnosis and Treatment*. Connecticut: Applenton and Lang Press, pp. 905-906, 1995.
- Erickson CK, Graham DT. Alterations in cortical and reticular acetylcholine release by ethanol *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 185: 585-593, 1973.
- Faintuch JJ. Cardiovascular impact of alcoholism. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Méd. São Paulo*, 50 76-79, 1995.
- Fanselow MS. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Fanselow MS. *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, pp 151, 1991.
- Farber PD, Khavari KA, Douglass FM. A factor analytic study of reasons for drinking: empirical validation of positive and negative reinforcement dimensions. *J. Consult. Clin. Psychol.*, 48: 363-367, 1980.
- Faria E. Dicionário escolar latino-português. MEC, Rio de Janeiro, 1962.
- Faria MS, Muscara MN, Moreno Jr. H, Teixeira AS, Dias HB, Graeff FG, De Nucci G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus-maze test. *Eur. J. Pharmacol.*, 323: 37-43, 1997.
- Faria MS. Papel do óxido nítrico em um modelo animal de ansiedade. Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Campinas, SP, 1998.
- Fedynshyn JP, Kwiat G, Lee NM. Characterization of high affinity opioid binding sites in rat periaqueductal gray P2 membrane. *J. Pharmacol.*, 159: 83-88, 1959.
- Ferreira VMM, Morato GS. Influence of age and pre-treatment with D-cycloserine on the behavior of ethanol-treated rats tested in the elevated plus-maze apparatus. *Addict. Biol.*, 1: 395-404, 1996.

- Ferreira VMM, Morato GS. D-cycloserine blocks the effects of ethanol and HA-966 in rats tested in the elevated plus-maze. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21: 1638-1642, 1997.
- Ferreira VMM, Valenzuela CF, Morato GS. Role of nitric oxide-dependent pathways in ethanol-induced anxiolytic effects in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23: 1898-1904, 1999.
- Ferreira VMM. Efeito da exposição de curta e longa duração ao etanol: Participação das vias nitrérgicas e glutamatérgicas hipocampais. Tese apresentada ao curso de Doutorado da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, 2000.
- File SE, Day S. Effects of time of day and food deprivation on exploratory activity in the rat. *Anim. Behav.*, 20: 758-762, 1972.
- File SE. Chronic exposure to noise modifies the anxiogenic response, but not the hypoactivity, detected on withdrawal from chronic ethanol treatment. *Psychopharmacology*, 116: 369-372, 1994.
- Franks NP, Lieb WR. Do general anesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature*, 310: 599-601, 1984.
- Freud S. The justification for detachment from neurasthenia of a particular syndrome the anxiety neurosis. In: *Collective Papers* (trans J. Strachey), London: Hogarth Press, 1924, pp. 76-106, 1894.
- Freund G, Anderson KJ. Glutamate receptors in the cingulate cortex, hippocampus and cerebellar vermis of alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23: 1-6, 1999.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376, 1980.
- Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, 83: 1774-1777, 1989.
- Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.*, 57: 683-706, 1995.
- Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *TINS*, 14: 60-67, 1991.

- Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3491-3495, 1993.
- Gevaerd MS, Takahashi RN. Involvement of dopamine receptors on locomotor stimulation and sensitization elicited by the interaction of ethanol and mazindol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 63: 395-399, 1999.
- Goldman M, Brown S, Christiansen B. Expectancy theory thinking about drinking. In: Blane HT, Leonard KE (eds). *Psychological Theories of Drinking and Alcoholism*. New York: Guilford, 1987.
- Graeff FG. Minor tranquilizers and brain aversive systems. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 14: 239-265, 1981.
- Graeff FG. Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação. 2^a. edição. São Paulo. EPU 61-83, 1989.
- Graeff FG. Brain defense systems in anxiety. In: *Handbook in anxiety*. Amsterdam: Elsevier, 3: 307-354, 1990.
- Graeff FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27: 811-829, 1994.
- Graeff FG, Viana MB, Tomaz C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 26: 67-70, 1993.
- Gray JA. The behavioral inhibition system: a possible substrate for anxiety. In: Feldman RS, Broadhurst PL (eds). *Theoretical and Experimental Basis of the Behaviour Therapies*. New York: John Wiley, pp. 3-41, 1976.
- Gray JA. The psychology of fear and stress. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.
- Grinfeld H, Goldenberg S, Segre CAM, Chadi G. Fetal alcohol syndrome in São Paulo, Brazil. *Paediat Perin. Epid.*, 13: 496-497, 1999.
- Guimarães FS, Carobrez AP, De Aguiar JC, Graeff FG. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology*, 103: 91-94, 1991.

- Guimarães FS, de Aguiar JC, Del Bel EA, Ballejo G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central gray. *Neuroreport*, 5: 1929-1932, 1994.
- Hanada GS, Bos AJ, Kasuga H, Hirayama T. Comparative epidemiology of oral câncer in Brazil and Índia. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 16: 63-72, 1991.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists in a maze-exploration model of "fear" motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 327: 1-5, 1984.
- Harris RA. Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23: 1563-1570, 1999.
- Hecker E. Über larvirte und abortive angstzustände bei neurasthenie. *Zentralbl. Nervenheilk.* 133: 565-572, 1893.
- Hodges H, Allen Y, Sindem J, Mitchell SN, Arendt T, Lantos P, Gray JA. The effects of cholinergic drugs and cholinergic-rich foetal neural transplants on alcohol-induced deficits in radial maze performance in rats. *Behav. Brain Res.*, 43: 7-28, 1991.
- Hoffman PL, Tabakoff B. Ethanol's action on brain biochemistry. New York: Plenum press, pp. 19-68, 1985.
- Hoffman PL, Moses F, Luthin G, Tabakoff B. Acute and chronic effects of ethanol on receptor-mediated phosphatidylinositol 4,5,-biphosphate breakdown in mouse brain. *Mol. Pharmacol.*, 30: 13-18, 1986.
- Hökfelt T, Ceccatell S, Gustafsson L, Hulting AL, Verge V, Villar M, Xiao-Jun X, Zhi-Qing X, Wiesenfeld Z, Zhang X. Plasticity of NO synthase expression in the nervous and endocrine systems. *Neuropharmacology*, 33: 1221-1227, 1994.
- Hoyt KR, Tang LH, Aizeman E, Reynolds IJ. Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular Ca^{2+} in culture rat forebrain neurons. *Brain Res.*, 592: 310-316, 1992.
- Hunsperger RW. Affktrationen auf elektrische reisuung in hirmstamm der katse. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 14: 70-92, 1956.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns, RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9265-9269, 1987.

- Ikedo J, Ochieai K, Morita I, Murata S. Endogenous nitric oxide blocks calcium influx induced by glutamate in neurons containing NADPH diaphorase. *Neurosci. Lett.*, 158: 193-196, 1993.
- Ikedo M, Komiyama T, Sato I, Himi T, Murota S. Neuronal nitric oxide synthase is resistant to ethanol. *Life Sci.*, 64: 1623-1630, 1999.
- Imhof JT, Coelho ZMI, Schmitt ML, Morato GS, Carobrez AP. influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus-maze apparatus. *Behav. Brain Res.*, 56: 177-180, 1993.
- Imperato A, Di Chiara G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 239: 219-228, 1986.
- Jacquet YF, Lajtha A. Paradoxical effects after microinjection of morphine in the periaqueductal gray matter. *Science*, 185: 1055-1057, 1974.
- Kalodner CR, Delucia JL, Ursprung AW. An examination of the tension reduction hypothesis: the relationship between anxiety and alcohol in college students. *Addic. Behav.*, 14: 649-654, 1989.
- Kaplan HI, Sadock BJ. Classificação na Psiquiatria. In: Kaplan HI, Sadock BJ, Freedman AM (eds). *Compêndio de Psiquiatria Dinâmica*. Porto Alegre: Artes Médicas Editora, pp. 227, 1984.
- Kehne JII, McClosky TC, Baron BM, Chi EM, Harrison BL, Witten JP, Palfreyman MG. NMDA receptor complex antagonists have potential anxiolytic effects as measured with separation induced ultrasonic vocalizations. *Eur. J. Pharmacol.*, 193: 283-292, 1991.
- Khanna JM, Morato GS, Shah G, Chau A, Kalant H. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs rapid tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, 32: 43-47, 1993.
- Khanna JM, Morato GS, Chau A, Shah G. Influence of nitric oxide synthase inhibition on the development of rapid tolerance to ethanol. *Brain. Res. Bull.*, 37: 599-604, 1995.
- Kianmaa K, Tabakoff B. Neurochemical correlates of tolerance and strain differences in the neurochemical effects of ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18: 383-388, 1983.
- Know NS, Nathan CF, Gilber C, Griffith OW, Mattheus DE, Stuehr DJ. L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase: the ureic oxygen derives from dioxygen. *J. Biol. Chem.*, 264: 20496-20501, 1990.

- Knowles GR, Salter M, Brooks SL, Moncada S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172: 1042-1048, 1989.
- Knowles GR, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.*, 299: 249-258, 1994.
- Koob GF, Markou A, Weis F, Schulthesis G. Opponent process and drug dependence: Neurobiological mechanisms. *Semin. Neurosc.*, 5: 351-358, 1993.
- Koob GF, Rassnick S, Heinrichs S, Weiss F. Alcohol, the reward system and dependence. In: Jansson B, Jörnvall H, Rydberg U, Terenius L, Vallee BL, eds. *Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse*. Basel, Switzerland: Birkhäuser-Verlag, 103-114, 1994.
- Koob GF, Roberts AJ, Schulteis G, Parsons LH, Heyser CJ, Hyytiä P, Merlo-Pich E, Weiss F. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22: 3-9, 1998.
- Kushner MG, Kenneth JS, Wood MD, Wood PK. Anxiety and drinking behavior. Moderating effects of tension-reduction. Alcohol outcome expectancies. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 18: 852-860, 1994.
- Lacerda RB. Efeitos ansiolítico e excitatório do etanol administrado aguda ou cronicamente a camundongos: um estudo da variedade individual. Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de São Paulo (Escola Pauhsta de Medicina), São Paulo, 1996.
- Lammas S, Marsden PA, Li GK. Endotelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89: 6348-6352, 1992.
- Lepine JP, Pelissolo A. Comorbidity and social phobia: clinical and epidemiological tissues. *Int Clin. Psychopha.*, 3: 35-41, 1996.
- Lepola U. Alcohol and depression in panic disorder. *Acta Psychiatr. Scand.*, 377: 33-35, 1994.
- Leslie SW, Brown LM, Dildy JE, Sims JS. Ethanol and neuronal calcium channels. *Alcohol*, 7: 233-236, 1990.
- Lishmam WA. Alcohol and the brain. *Br. J. Psych.*, 156: 635-644, 1990.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92: 180-185, 1987.

- Littleton JM. Development of membrane tolerance to ethanol may limit intoxication and influence dependence liability. In: Sandler M (ed.). *Psychopharmacology of Alcohol.*, pp 121-127, 1980.
- Lizasoain I, Knowles RG, Moncada S. Inhibition by lamotrigine of the generation of nitric oxide in rat forebrain slices. *J. Neurochem.*, 64: 636-642, 1995.
- Lovick TA. Role of nitric oxide in medullary raphe-evoked inhibition of neuronal activity in the periaqueductal gray matter. *Neuroscience*, 75: 1203-1209, 1996.
- Lovick TA, Key BJ. Inhibitory effect of nitric oxide on neuronal activity in the periaqueductal gray matter of the rat. *Exp. Brain Res.*, 108: 382-388, 1996.
- Lovinger DM. High ethanol sensitivity of recombinant AMPA-type glutamate receptors expressed in mammalian cells. *Neurosci. Lett.*, 159: 83-87, 1993.
- Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6711-6715, 1992.
- Ludwing AM. On and off the wagon. *Q. J. Stud. Alcohol*, 33: 91-96, 1972.
- Lynch DR, Guttman RP. NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr. Drug Targets*, 2: 215-231, 2001.
- Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78: 927-930, 1994.
- Masur J, Monteiro MG. Validation of the "CAGE" alcoholism screening test in a Brazilian psychiatric inpatient hospital setting. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 16: 215-218, 1983.
- Matheus MG, Nogueira RL, Carobrez AP, Graeff FG, Guimarães FS. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology*, 113: 565-569, 1994.
- Mayer ML, Westbrook GL. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 28: 197-276, 1987.
- Mihic SJ. Acute effects of ethanol on GABA_A and glycine receptor function. *Neurochem. Int.*, 35: 115-123, 1999.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43: 109-142, 1991.
- Moncada S. Nitric oxide. *J. Hypertension*, 12: S35-S39, 1994.

- Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48: 254-260, 1955.
- Moore PK, Babbedge RC, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL. 7-Nitroindazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br. J. Pharmacol.*, 108: 219-224, 1993.
- Moore PK, Bland-Ward PA. 7-Nitroindazole: an inhibitor of nitric oxide synthase. *Meth. Enzimol.*, 268: 393-398, 1996.
- Morato GS, Khanna JM. N-methyl-D-aspartate receptors, nitric oxide, and ethanol tolerance. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29: 1415-1426, 1996.
- Morriset RA, Swartzwelder SH. Attention of hippocampal long-term potentiation by ethanol: a patch-clamp analysis of glutamatergic and GABAergic mechanisms. *J. Neurosci.*, 13: 222-272, 1993.
- Morse RM, Flavin DK. Definition of alcoholism. *JAMA*, 268: 1012-1014, 1992.
- Mott CB, Guarita DR, Coelho ME, Monteiro-da-Cunha JE, Machado MC, Bettarello A. Etiology of chronic pancreatitis in São Paulo: a study of 407 cases. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 44: 214-220, 1989.
- Muscará MN, De Nucci G. Simultaneous determination of nitrite and nitrate anions in plasma, urine and cell culture supernatants by high-performance liquid chromatography with post column reactions. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 686: 157-164, 1996.
- Narita M, Tamaki H, Kobayashi M, Soma M, Narita M, Suzuki T. Changes in Ca²⁺-dependent protein kinase C isoforms induced by chronic ethanol treatment in mice. *Neurosci. Lett.*, 307: 85-88, 2001.
- Nashold BS, Wilson WP, Slaughter DG. Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.*, 30: 14-24, 1969.
- Nevo I, Hamon M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem. Int.*, 26: 305-336, 1995.
- Nunez E, Lopez-Corcuera B, Martinez-Maza R, Aragon C. Differential effects of ethanol on glycine uptake mediated by the recombinant GLYT1 and GLYT2 glycine transporters. *Br. J. Pharmacol.*, 129: 802-810, 2000.
- Oliveira RW, Guimarães FS. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into dorsal periaqueductal gray matter. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 1529-1532, 1999.

- Oliveira RMW, Del Bel EA, Mamede-Rosa ML, Padovan CM, Deakin JFW, Guimarães FS. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neurosci. Lett.*, 289: 123-126, 2000.
- Paakkari I, Lindsberg P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann. Med.*, 27: 369-377, 1995.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526, 1987.
- Pandey SC. Neuronal signaling systems and ethanol dependence. *Mol. Neurobiol.*, 17: 1-15, 1998.
- Panksepp J. Toward a general psychobiological drug affects on exploratory activity in an elevated plus-maze test in the rat. *J. Pharmacol.*, 39: 917-928, 1982.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, 1997.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.*, 14: 149-167, 1985.
- Perugi G, Frare F, Madaro D, Marenmani I, Akiskal HS. Alcohol abuse in social phobic patients: is there a bipolar connection? *J. Affec. Dis.*, 68: 33-39, 2002.
- Phillips DE, Cummings JD, Wall KA. Prenatal alcohol exposure decreases the number of nitric oxide synthase positive neurons in rat superior colliculus and periaqueductal gray. *Alcohol*, 22: 75-84, 2000.
- Popp RL, Lickteig RL, Lovinger DM. Factors that enhance ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar granule cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289: 1564-1574, 1999.
- Porto JD, Torres FA, Aguilar AA, Rosa H. Clinical and epidemiological study of calcifying chronic pancreatitis in Goiânia, GO, Brazil. *Arq. Gastroenterol.*, 36: 27-31, 1999.
- Quock RM, Nguyen E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci.*, 51: PL 255-260, 1992.
- Recasens M. Putative molecular mechanisms underlying long term potentiation (LTP): the key role of excitatory amino acid receptors. *Thérapie*, 50: 19-34, 1995.

- Ryabinin AE. Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies. *Psychopharmacology* (Berl), 139: 34-43, 1998.
- Rodgers RJ, Cole JC. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol. Behav.*, 54: 729-736, 1993.
- Russel PA. Relationships between exploratory behavior and fear: a review. *Br. J. Psychol.*, 64: 417-433, 1973.
- Schlecht NF, Franco EL, Pintos J, Negassa LP, Oliveira BV, Curado MP. Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Brazil. *Am. J. Epidemiol.*, 150: 1129-1137, 1999.
- Schmidt HMHW, Gagne DG, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J. Histochem. Cytochem.*, 40: 1439-1456, 1992.
- Schmitt P, Di Scala G, Brandão ML, Karli P. Behavioral effects of microinjections of SR 95103, a new GABA_A antagonist, into medial hypothalamus on the mesencephalic central gray. *Eur. J. Pharmacol.*, 117: 149-152, 1985.
- Schiuckit MA. Ethanol induced changes in body sway in men at high alcoholism risk. *Arch. Gen. Psych.*, 42: 375-379, 1985.
- Schuman EM, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. *Ann. Rev. Neurosci.*, 17: 153-183, 1994.
- Seeman P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.*, 24: 583-655, 1972.
- Shalala DE. Eighth Special Report to the US Congress on Alcohol and Health. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, 1993.
- Shefner SA, Tabakoff B. Basal firing rate of locus coeruleus neurons affects sensitivity to ethanol. *Alcohol*, 2: 239-243, 1985.
- Shiple MC, Ennis M, Rizvi TA, Behbehani MM. Topographical specificity of forebrain inputs to the midbrain periaqueductal gray: In: Depaulis A, Bandler R (eds). *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. New York: Plenum, pp. 417-448, 1991.

- Silva EA, Noto AR, Faria M, Formigoni ML. Concepts of dependence among brazilian alcohol-and-drug-dependent patients. *Journal of Psychoactive Drugs*, 32: 389-405, 2001.
- Silva VA, Laranjeira RR, Dolnikoff M, Grinfeld H, Masur J. Alcohol consumption during pregnancy and newborn outcome: a study in Brazil. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 3: 169-172, 1981.
- Skultety FM. Stimulation of periaqueductal gray and hypothalamus. *Arch. Neurol.*, 8: 608-620, 1963.
- Snell LD, Claffey DJ, Ruth JA, Valenzuela CF, Cardoso R, Wang Z, Levinson SR, Sather WA, Williamson AV, Ingersoll NC, Ovchinnikova L, Bhave SV, Hoffman PL, Tabakoff B. Novel structure having antagonist actions at both the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor and neuronal voltage-sensitive sodium channels: biochemical, electrophysiological and behavioral characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292: 215-227, 2000.
- Solomon P, Patch VD. Manual de Psiquiatria. Solomon P, Patch VD (eds), Azzi E, Pratarotti AR (trad). Atheneu Ed., São Paulo, 1975.
- Southam E, Garthwaite J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology*, 32: 1267-1277, 1993.
- Stephens DN, Meldrum BS, Weidmann R, Schneider C, Grutzner M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? *Psychopharmacology*, 90: 166-169, 1986.
- Stewart RB, Murphey JM, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. Place conditioning with alcohol in alcohol-preferring and non-preferring rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 53: 487-491, 1996.
- Tabakoff B, Hoffman PL. Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci.*, 32: 197-204, 1983.
- Tabakoff B, Hoffman PL, Moses F. Neurochemical correlates of ethanol withdrawal: alterations in serotonergic function. *J. Pharm. Pharmacol.*, 29: 471-476, 1977.
- Tabakoff B, Hoffman PL. Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron*, 16: 909-912, 1996.
- Traynelis SF, Cull-Candy SG. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature*, 345: 347-350, 1990.

- Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44: 463-469, 1993.
- Uzbay IT, Oglesby MW. Nitric oxide and substance dependence. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25: 43-52, 2001.
- Uzbay IT, Erden BF, Tapanyigit EE, Kayaalp SO. Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats. *Life Sci.*, 61: 2197-2209, 1997.
- Valenzuela CF, Bhave S, Hoffman P, Harris RA. Acute effects of ethanol on pharmacologically isolated kainate receptors in cerebellar granule neurons: comparison with NMDA and AMPA receptors. *J. Neurochem.*, 71: 1777-1780, 1998.
- Valenzuela CF. Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol Health Res. World*, 21: 144-148, 1997.
- Vassiljev V, Kalda A, Pokk P, Vali M, Zharkovsky A. The effects of the nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on ethanol pharmacokinetics in rats after acute and chronic ethanol administration. *Alcohol Alcohol*, 33: 609-615, 1998.
- Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46: 755-784, 1992.
- Vincent SR. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 42: 129-160, 1994.
- Volke V, Kõks S, Vassar E, Bourin M, Bradwejn J, Männistö PT. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behavior in an elevated plus-maze. *Neuroreport*, 6: 1413-1416, 1995.
- Walker DW, Hunter BE, Abraham WC. Neuroanatomical and functional deficits subsequent to chronic ethanol administration in animals. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 5: 267-282, 1981.
- Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P, Honore T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonist and competitive antagonists. *TIPS*, 11: 25-33, 1990.
- Wazlawik E, Morato GS. Effects of intracerebroventricular administration of the 7-nitroindazole on tolerance to ethanol. *Brain Res. Bull.*, 2001, *in press*.
- Wilke N, Sganga M, Barhite S, Miles MF. Effects of alcohol on gene expression in neural cells. In: Jansson B, Jörnvall H, Rydberg U, Terenius L, Vallee BL (eds): *Toward a*

- Molecular basis of alcohol use and abuse*. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, pp. 49-59, 1994.
- Williams K, Dichter MA, Molinoff PB. Up-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors on cultured cortical neurons after exposure to antagonists. *Mol. Pharmacol.*, 42: 147-151, 1992.
- Wilson GT, Abrams DB. Effects of alcohol on social anxiety and physiological arousal: cognitive versus pharmacological processes. *Cogn. Ther. Res.*, 1: 195-210, 1977.
- Xia J, Simonyi A, Sun GY. Chronic ethanol and iron administration on iron content, neuronal nitric oxide synthase and superoxide dismutase in rat cerebellum. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23: 702-707, 1999.
- Zaleski MJ, Nunes FJR, Lemos T, Morato GS. Gaba-B receptors play a role in the development of tolerance to ethanol in mice. *Psychophar.*, 153: 415-424, 2001.
- Zima T, Druga R, Stipek S. The influence of chronic moderate ethanol administration on NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase) activity in rat brain. *Alcohol Alcohol*, 33: 341-346, 1998.

ANEXOS

VIII. ANEXOS (TABELAS)

TABELA 1. Critérios diagnósticos do DSM-IV, da Associação Americana de Psiquiatria (APA), para de pendência de substância. Estes critérios são utilizados para diagnóstico de dependência a diversas substâncias psicoativas, incluindo o álcool:

1. Tolerância, definida por qualquer um dos seguintes aspectos:

- a) uma necessidade de consumir quantidades progressivamente maiores para adquirir a intoxicação ou efeito desejado;
- b) a acentuada redução do efeito com o uso continuado da mesma quantidade de álcool;

2. Abstinência, manifestada por qualquer dos seguintes aspectos:

- a) síndrome de abstinência para a substância (consultar os critérios A e B dos conjuntos de critérios para Abstinência das substância específicas.
- b) A mesma substância (ou uma substância estreitamente relacionada) é consumida para aliviar ou evitar sintomas de abstinência.

3. A substância é freqüentemente consumida em maiores quantidades ou um período mais longo do que o período pretendido;

4. Existe um desejo persistente ou esforços mal-sucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso do álcool;

5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção do álcool, na sua utilização ou na recuperação de seus efeitos;

6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas são abandonadas ou reduzidas em virtude do uso do álcool;

7. O uso dele continua, apesar da consciência de ter problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que tendem a ser causados ou exarcebados pelo álcool (por ex., o consumo continuado de bebidas alcoólicas, embora o indivíduo reconheça que uma úlcera piorou pelo consumo daquela droga).

TABELA 2. Classificação dos Distúrbios da Ansiedade, conforme a APA e DSM-IV:

1. A **Desordem de Ansiedade Generalizada** é uma síndrome caracterizada por ansiedade ou preocupação excessiva e persistente durante mais de seis meses. Alguns sintomas específicos são identificáveis nesta desordem: tensão motora, hiperatividade autonômica, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, alteração do sono e vigilância excessiva.

2. A **Desordem de Pânico sem Agorafobia** é uma síndrome cuja principal característica é a ocorrência de ataques de pânico recorrentes e inesperados, gerando preocupação persistente. Os ataques de pânico, manifestam-se pelo aparecimento súbito de uma apreensão intensa, medo ou terror, associado frequentemente com sentimentos de catástrofe iminente e apresentam pelo menos quatro dos seguintes sintomas: dispnéia, palpitações, mal-estar ou dores torácicas, sensações de sufocação ou estrangulamento, tonturas, vertigens ou sensações de instabilidade, sentimento de irrealidade, sudorese, ondas de calor ou frio, desmaios, tremores ou contrações musculares e medo de morrer, enlouquecer, ou de cometer um ato descontrolado durante o ataque. Estes ataques têm uma duração de minutos e são seguidos por uma ou mais manifestações como preocupação persistente em apresentar outros ataques, medo das implicações dos ataques ou de suas conseqüências e mudanças significativas do comportamento relacionado ao ataque.

3. A **Desordem de Pânico com Agorafobia** caracteriza-se por uma complicação do distúrbio anterior apresentando o desenvolvimento de um medo antecipatório e esquiva de lugares ou situações em que a fuga é difícil ou embaraçosa, ou onde pode ser difícil conseguir ajuda, na eventualidade de um ataque de pânico.

4. No **Distúrbio Obsessivo-Compulsivo**, caracterizado por obsessões (pensamentos recorrentes que causam ansiedade e desconforto acentuado), e/ou compulsões (comportamento estereotipado ou rituais que servem para aliviar a ansiedade). As obsessões mais comuns são pensamentos repetitivos de violência, contaminação e dúvida. As compulsões mais comuns implicam lavagem de mão, contagens, verificações e toque desnecessário em pessoas ou objetos.

5. No **Distúrbio de Stress Pós-traumático**, é caracterizado pelo desenvolvimento de resposta de medo intenso ou terror em conseqüência de um acontecimento extremamente

traumático (acidentes, guerras, agressões) acompanhado de hipervigilância e esquiva de estímulos associados ao trauma. Os principais sintomas são a revivência do acontecimento traumático através de imagens, pensamentos ou sonhos, uma redução da resposta ao mundo exterior e no contato com ele, e diversos sintomas neurovegetativos e cognitivos.

6. Na **Fobia Específica** caracteriza-se por um medo intenso provocado pela exposição a objeto ou situação definida, freqüentemente levando a comportamento de esquiva. A pessoa reage com ansiedade à presença ou à antecipação de situação fóbica, apresentando alteração da sua rotina normal e ela tem consciência de que o medo é excessivo ou irracional, mas não consegue evitá-lo. As principais fobias envolvem animais (cães, cobras, aranhas), ou as situações de medo de altura (acrofobia) ou medo de espaço fechado (claustrofobia).

7. A **Fobia Social** é uma ansiedade clinicamente significativa provocada pela exposição a certos tipos de situação social ou de desempenho, ou seja, o medo persistente e irracional nas situações que a pessoa é exposta à outra ou outras não familiares ou possa ser observado por outros. A manifestação desta desordem é muito semelhante ao quadro de Fobia Específica.

8. A **Agorafobia sem História de Ataque de Pânico** consiste num medo acentuado de estar sozinho, ou em lugares públicos donde seja difícil ou embaraçoso sair, ou recear uma inexistência de ajuda em caso de doença súbita. Mas a pessoa não apresenta ataques de pânico inesperados.