

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**EFEITOS DA PRÉ-EXPOSIÇÃO AO ETANOL NOS
COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À DEPENDÊNCIA DESTA
SUBSTÂNCIA E NA EXPRESSÃO DE CRF₁ NA AMÍDALA EM RATOS**

Lígia Cury Casula

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleopatra da Silva Planeta

ARARAQUARA - SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**EFEITOS DA PRÉ-EXPOSIÇÃO AO ETANOL NOS
COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À DEPENDÊNCIA DESTA
SUBSTÂNCIA E NA EXPRESSÃO DE CRF₁ NA AMÍDALA EM RATOS**

Lígia Cury Casula

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleopatra da Silva Planeta

ARARAQUARA - SP

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C386e Casula, Lígia Cury
Efeitos da pré-exposição ao etanol nos comportamentos relacionados à dependência desta substância e na expressão de CRF₁ na amígdala em ratos / Lígia Cury Casula. – Araraquara, 2013
65 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Cleopatra da Silva Planeta

1. Etanol. 2. Síndrome de abstinência. 3. Fator Liberador de Corticotropina (CRF). 4. Autoadministração operante. 5. Dependência. I. Planeta, Cleopatra da Silva, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

Aos meus pais, Maria Christina Cury Casula e Nelson Casula. Por todas as palavras de apoio, incentivo e carinho. Não tenho palavras para expressar o amor, a admiração e gratidão que sinto por eles. São sem dúvidas as pessoas mais importantes da minha vida. Pois sempre estiveram presentes com muito amor, transmitindo-me serenidade, segurança e carinho. E com atitudes de trabalho, dignidade e humanidade me ensinaram valores que dão sentido e força para eu continuar meu caminho e trilhar meus horizontes. Além de pais, são meus melhores amigos.

Ao meu irmão Henrique, que dentre tantas individualidades é a pessoa que eu mais imitei e confiei na minha infância. E hoje, além de irmão é meu amigo e eu tenho muito orgulho da pessoa que ele sempre foi.

E aos meus avós: Josephina Gibran Cury e David Mariano Cury (*in memoriam*); Leonidia Miotto Casula e Angelino Casula, que sempre torceram por mim. E ao lado deles eu tive a oportunidade de viver momentos que são referências de boas lembranças. Apesar das dificuldades da vida, constituíram, com muito amor, a grande e fantástica família em que eu tive a felicidade de fazer parte. Também dedico a todos da minha família que sempre torceram por mim.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as bênçãos e luz concedidas em minha vida. Trilhando o meu caminho e guiando os meus passos, fortalecendo ainda mais a minha Fé.

Deus colocou muitas vidas na minha trajetória e são muitos nomes a agradecer, pois cada um tinha um propósito em passar por mim. Trazendo, uma lição de aprendizado e crescimento para minha construção como pessoa. Sendo nas pequenas coisas da vida, quanto nas mais nobres. E está missão que cada um traz consigo é para nos ajudar a enxergar o quanto somos fortes para continuarmos a caminhada, e assim, evoluirmos cada vez mais. Pois, tudo na vida está predestinado a acontecer com um propósito de aprendizado e crescimento, tanto pessoal quanto profissional. Cabe a nós enxergarmos e utilizá-las da melhor maneira possível. Sou muito grata a todas estas vidas que passaram, e por felicidade, a maioria permaneceram na minha vida e memória. Considero-me uma pessoa de sorte por ter encontrado todos elas.

Dentre tantos nomes a agradecer algumas pessoas foram muito importantes para que eu conseguisse finalizar este trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Cleopatra da Silva Planeta, por ter me introduzido no mundo científico de uma maneira muito bonita, de tal forma que eu serei eternamente grata. Desde o meu primeiro dia aqui (agosto 2011), observei toda a postura profissional, bagagem de conhecimento e paciência comigo. Apesar de todas as atribuições fora do laboratório sempre esteve aberta e presente para qualquer tipo de dúvidas e possíveis dificuldades. Minha admiração por ela só aumentou neste período, por toda a sabedoria em transmitir o conhecimento. E, também, por todo o desdobraimento em me ensinar e ajudar a escrever um trabalho científico, e aperfeiçoamento da exposição dos trabalhos. Além disso, trabalhando ao lado dela tive grandes oportunidades. Entre elas o amadurecimento pessoal para utilizá-lo nas relações profissionais e cresci muito profissionalmente, tudo isto escutando as palavras e os conselhos, observando os gestos e as atitudes. Foi muito bom trabalhar sob a orientação de uma pessoa repleta de qualidades profissionais como ela. Sei que ainda tenho muito que aprender e crescer, mas a maneira sólida como foi dado este primeiro passo foi muito importante para eu me espelhar na minha caminhada profissional. Obrigada por ter me aceitado como sua aluna de mestrado e confiado este projeto em mim.

Ao Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin por toda a parceria com a Prof^a. Cleo em me ajudar e transmitir a sua bagagem de conhecimento, sendo solícito, compreensivo, disposto e dedicado. Só tenho a agradecer todas as correções e sugestões na escrita final deste trabalho e por toda a paciência em me explicar e ensinar. Sendo uma pessoa muito importante para que o trabalho desenvolvesse e terminasse da melhor maneira possível. Pois mesmo quando ele estava longe sempre esteve presente compartilhando artigos, conhecimentos e experiências. Nestes últimos meses trabalhando ao lado dele estou observando a maneira como ele refina um trabalho científico sendo minucioso e dedicado na escrita e prática. Sei que ainda tenho muito que aprender, mas estes poucos meses foram muito importantes e contribuíram ainda mais com o meu amadurecimento profissional. Obrigada por estar disposto a me ajudar e ensinar com toda a paciência e amizade.

A banca examinadora da qualificação Prof^a. Dr^a. Rosângela Gonçalves Peccinini e Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani por todas as sugestões oferecidas que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A banca examinadora de defesa de dissertação Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani e Prof. Dr. Tarciso Miguel Tadeu.

A Rosana Finoti Pupim Silva e Elisabete Zocal Paro Lepera, por toda a amizade, disponibilidade, ajuda e cuidados. Não medindo esforços para nos auxiliar, nos instruir e ensinar às técnicas necessárias para desenvolvermos o nosso trabalho. Além disso, sempre foram muito atenciosas, carinhosas e solícitas com todos do laboratório.

A Tirene por toda eficiência, atenção, dedicação e cuidados conosco no laboratório.

A Bernadeti e Ana, que sempre foram muito atenciosas e simpáticas.

Aos professores Ricardo L. Nunes de Souza, Carlos Cesar Crestani, Francisco Fracasso, pela convivência diária, amizade e disposição em nos incentivar e auxiliar em alguma dificuldade. Foi de grande crescimento profissional observar a postura de vocês diante dos seus orientados e colegas de trabalho.

Aos colegas do laboratório de farmacologia. Todos serão lembrados de maneira recíproca e especial por terem passado momentos importantes ao meu lado, pois cada um, a sua maneira, contribuiu com o meu amadurecimento nestes dois anos e meio de convivência diária. Em especial gostaria de agradecer ao Paulo Eduardo Oliveira Carneiro e Paula Bianchi por sempre estarem ao meu lado dispostos a me ajudar em qualquer dificuldade dentro e fora do laboratório. Ao Prof. Dr. Tarciso Miguel Tadeu, nunca vou me esquecer do empenho em me ajudar a compreender a ciência do Sistema Nervoso Central. A Ana Cláudia Cipriano por compartilhar o seu conhecimento estatístico. A Tatiane Sorregotti por sempre ser muito atenciosa, ao Diego Mascarenhas, Maria Adrielle Vicente, Josiane Duarte pela amizade e por compartilharem suas experiências e conhecimentos da parte profissional.

A Prof^a. Dr^a. Taís Maria Bauab que desde o primeiro momento acreditou e confiou na minha capacidade profissional. Recebendo-me de maneira muito carinhosa e amiga na UNESP. Fazendo-me sentir membro de seu laboratório, e com isto contribuiu com o aumento do meu círculo de amizades.

Aos amigos agradeço por sempre estarem ao meu lado com palavras de amizade e conforto, que em alguns momentos parecia que era Deus os utilizando como instrumentos para passar as mensagens e fazendo com que eu conseguisse enxergar o que Ele queria que eu tirasse de aprendizado de cada momento em que fui colocada em prova.

As minhas amigas de longa data Leticia B. Marega; Daiane Pereira que mesmo longe sempre estiveram presentes ao meu lado, apoiando, torcendo e acreditando.

As minhas grandes amigas do tempo da faculdade e que continuaram em minha vida, por ordem de chegada: Mariane Baiocato; Mariana R. Rozatto, Priscila A. Pratinha; Tamires Franzotti... Não tenho palavras para expressar o quanto são importantes na minha vida, por todas as palavras de apoio e torcida. E pelos longos e felizes anos que passamos juntas durante a faculdade, eu às considero como irmãs de coração.

Destas em especial a Mariana R. Rozatto. Pois ela contribuiu muito para que eu estivesse no caminho profissional em que eu estou hoje. Sempre foi minha grande parceira pra tudo em tudo, não sendo diferente aqui em Araraquara. Suas atitudes fazem toda a diferença no mundo, pois nunca mede esforços para ajudar e partilhar com o próximo. E a sua família Rodrigues Rozatto por terem me recebido de maneira que eu me sentisse membro da família. A jornada foi mais branda sabendo que eu poderia contar com vocês aqui. Muito obrigada por tudo que vocês fizeram por mim.

Aos amigos que eu fiz ao longo desta jornada por ordem de chegada Josyane Claudino; Katilayne V. de Almeida, Nerilson Marques, Guilherme Paiva, João Augusto Oshiro Junior; Isabely Vaz; Daniela H. Jornada... E todos os outros que eu convivi e não foram citados aqui, mas que possuem uma importância especial nesta minha trajetória. Todos vocês contribuíram para tornar esta experiência muito agradável e feliz.

A Senhora Maria Irani Coito e todos da biblioteca da FCF, por toda solicitude dispensada.

A secretaria de pós-graduação obrigada pela paciência ilimitada e disponibilidade para me informar e auxiliar. E a todos os colaboradores da Faculdade em Ciências Farmacêuticas por toda atenção e solicitude.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao laboratório de Farmacologia da UNESP por terem cedido espaço para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo auxílio e oportunidade de desenvolver o mestrado.

Aos órgãos de fomento Capes pelo apoio financeiro, FAPESP e CNPq por terem contribuído com os custos deste projeto.

RESUMO

A dependência ao etanol é um grande problema de saúde pública, sendo uma desordem crônica caracterizada pela procura compulsiva e consumo abusivo desta substância. Quando o acesso à substância é interrompido ocorre a síndrome de abstinência que é caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas desagradáveis. Em roedores a síndrome de abstinência ao etanol pode ser evidenciada pelo aumento de comportamentos relacionados à ansiedade, alterações da atividade locomotora e intensa procura pela substância psicoativa. Sabe-se que o aumento da liberação do fator liberador de corticotropina (CRF) em várias áreas do sistema nervoso central incluindo à amígdala está envolvido com a utilização de substâncias de abuso. No presente estudo investigamos se a exposição a uma dieta líquida com etanol, seguida por um curto período de abstinência, altera comportamentos relacionados à ansiedade, atividade locomotora, autoadministração operante de etanol em ratos e os níveis do receptor fator liberador de corticotropina do tipo 1 (CRF₁). Para tanto, ratos Wistar machos adultos foram pré-expostos a uma dieta líquida de etanol (6 a 8%) no complemento alimentar Sustain[®], a qual foi oferecida como única fonte de alimento, ou receberam a dieta líquida sem etanol, durante um período de 21 dias de maneira intermitente. Após isso, os animais tiveram quantificado: 1) a síndrome de abstinência ao etanol pela mensuração dos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado e a atividade locomotora em uma caixa automática de atividade, 2) a proteína CRF₁ na amígdala por Western Blotting ou 3) a motivação e consumo do etanol no procedimento de autoadministração operante. Nossos resultados demonstram que a pré-exposição ao etanol causou menor motivação e menor consumo dessa substância na autoadministração operante, mas não houve modificações nos comportamentos relacionados à ansiedade, na atividade locomotora ou no CRF₁. Desse modo, esses resultados sugerem que a exposição prévia ao etanol causa diminuição do seu consumo e motivação para sua autoadministração, e essa alteração pode estar dissociada dos sinais da síndrome de abstinência e de mudanças do receptor CRF₁ na amígdala.

Palavras chaves: Etanol, Dependência, Síndrome de abstinência, Fator Liberador de Corticotropina (CRF), Autoadministração operante.

ABSTRACT

Ethanol addiction is a large public health problem, being a chronic disorder characterized by compulsive drug seeking and consumption. When access to ethanol is discontinued occurs withdrawal syndrome that is characterized by a set of unpleasant signs and symptoms. In rodents the ethanol withdrawal syndrome is evidenced by increased anxiety-like behaviors, changes in locomotor activity and intense drug seeking. It is known that the increased release of corticotropin-releasing factor (CRF) in various areas of the central nervous system including the amygdala is involved with the use of substances of abuse. In the present study we investigated whether exposure to ethanol in a liquid diet, followed by a short period of withdrawal, changes anxiety-like behaviors, locomotor activity, operant ethanol self-administration and levels of corticotropin releasing factor receptor type 1 (CRF₁) in rats. For this purpose, adult male Wistar rats were pre-exposed to ethanol (6 a 8%) in a liquid diet with the food supplement Sustain[®], as the only source of food or a liquid diet without ethanol over a period of 21 days intermittently. After this, the animals had quantified: 1) the ethanol withdrawal syndrome by measurement of anxiety-like behaviors in the elevated plus maze and locomotor activity in an automatic activity box, 2) CRF₁ protein in the amygdala by Western Blotting or 3) motivation and consumption of ethanol in operant self-administration procedure. Our results demonstrate that pre-exposure to ethanol caused less motivation and lower consumption of this substance in the operant self-administration, but there were no changes in anxiety-like behaviors, locomotor activity or CRF₁. Thus, these results suggest that prior exposure to ethanol causes a decrease of consumption and motivation for self-administration, and this change can be dissociated from the signs of withdrawal syndrome and changes of CRF₁ receptor in the amygdala.

Keywords: Ethanol, Addiction, Withdrawal syndrome, Corticotropin Releasing Factor (CRF), Operant self-administration.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio Corticotropina

ADH – Enzima Álcool Desidrogenase

ALDH- Enzima Aldeído Desidrogenase

AVP – Vasopressina

“BINGE” - Acesso Livre Prolongado de 24 horas

BNST - Núcleo Leito da Estria Terminal

BLA- Amígdala Basolateral

CeA – Amígdala Central

CREB - Proteína ligante ao Elemento de Resposta dos 3' 5' Monofosfato de Adenosina

CRF - Fator Liberador de Corticotropina

CRF-R1 - Receptor de Fator Liberador de Corticotropina do tipo 1

CRF-R2 - Receptor de Fator Liberador de Corticotropina do tipo 2

CYP2E1 – Enzima Citocromo P450 2E1

DSM – IV – American Psychiatric Association

GABA_A - Receptor Ácido Gama-Amino-Butírico tipo A

HPA – Eixo Hipotálamo – Pituitária – Adrenal

LCE - Labirinto em Cruz Elevado

NAD⁺ - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NMDA – Receptor N-metil D-Aspartato

P.P.M – Padrão de Peso Molecular

PVN – Núcleo Hipotalâmico Paraventricular

RF – Razão Fixa

RP – Razão Progressiva

SNC – Sistema Nervoso Central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo do protocolo experimental	35
Figura 2. Consumo de etanol e consumo da dieta líquida.....	37
Figura 3. Massa corporal dos animais ao longo dos dias de exposição à dieta líquida.....	38
Figura 4. Comportamento dos animais no LCE 12 horas após a retirada da dieta líquida com etanol.....	39
Figura 5. Atividade locomotora dos animais após 36 horas da retirada da dieta líquida com etanol.....	40
Figura 6. Quantidades de CRF ₁ após 60h da retirada da dieta líquida com etanol.....	41
Figura 7. Massa corporal dos animais ao longo do tempo de exposição na autoadministração operante.....	42
Figura 8. Comportamentos dos animais na autoadministração operante durante as sessões de Razão Progressiva.....	44
Figura 9. Comportamentos dos animais na autoadministração operante durante o “BINGE”.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Histórico e epidemiologia.....	14
1.2. Farmacocinética e Farmacodinâmica do etanol.....	15
1.3. Dependência.....	18
1.4. Modelos animais.....	19
1.5. Dependência ao etanol e CRF.....	24
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivos gerais.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Procedimento de consumo de etanol com dieta líquida em bebedouros.....	27
3.3. Análise de comportamentos relacionados à ansiedade.....	28
3.4. Análise de atividade locomotora.....	29
3.5. Procedimento de autoadministração operante de etanol.....	29
3.5.1. Caixa para autoadministração operante de etanol.....	29
3.5.2. Treinamento da autoadministração operante de etanol ou sacarina.....	30
3.5.3. Teste de razão progressiva (RP)	31
3.5.4. Acesso Livre Prolongado de 24 horas (“BINGE”).....	31
3.6. Retirada das amostras e dissecação das áreas encefálicas.....	31
3.7. Western Blotting.....	32
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
4.1. Consumo de etanol na dieta líquida em bebedouros.....	33

4.2. Alterações nos comportamentos relacionados à ansiedade e atividade locomotora na retirada de etanol.....	33
4.3. Expressão de CRF ₁ na amígdala 60 horas após a interrupção da pré-exposição ao etanol	34
4.4. Alterações relacionadas a motivação e ao consumo de etanol na autoadministração operante.....	34
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
6. RESULTADOS.....	37
6.1. Consumo do etanol na dieta líquida.....	37
6.2. Alterações de comportamentos relacionados à ansiedade e atividade locomotora	39
6.3. Expressão de CRF ₁ na amígdala 48 horas após a interrupção da pré-exposição ao etanol.....	41
6.4. Alterações relacionadas a motivação e consumo de etanol na autoadministração.....	42
7. DISCUSSÃO.....	46
8. CONCLUSÃO.....	56
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57-65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e epidemiologia

O consumo de substâncias de abuso não é um fenômeno recente. Desde a pré-história essas substâncias estão presentes entre membros de diferentes culturas. Ao longo da história o seu uso não foi apenas associado à medicina e a ciência, mas também a magia, religião, cultura e celebrações (ROYCE, 1981; TOSCANO Jr., 2001).

As primeiras bebidas alcoólicas eram fermentadas e de origem artesanal. Em meados de 800 a.C., os árabes passaram a produzir as bebidas destiladas. A partir disto bebidas com maiores teores alcoólicos foram introduzidas na humanidade (GIGLIOTTI; BESSA, 2004).

A partir da revolução industrial inglesa o padrão do uso de álcool pela população começou a mudar. Nesse período, as pessoas começaram a se aglomerar nos centros urbanos e o consumo de bebidas alcoólicas se estendeu para um grande número de pessoas em diferentes ocasiões. A partir daí iniciaram-se as descrições dos problemas físicos e psicológicos advindos do uso de álcool, como por exemplo, a dependência (GIGLIOTTI; BESSA, 2004).

Segundo os dados do Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas (CEBRID) 74,6% da população brasileira já consumiu etanol pelo menos uma vez na vida (CARLINI, 2006). Num levantamento realizado pela Secretaria Nacional Antidrogas (2007) 52% da população pode ser classificada como consumidores de bebidas alcoólicas. Destes, 27% são consumidores ocasionais e 25% faz uso pelo menos uma vez por semana de bebida alcoólica. Variações marcantes são observadas em relação ao uso mais frequente quando comparados os sexos, 39% são homens e 13% são mulheres. Esse levantamento mostrou ainda que 29% da população consome além de 5 doses cada vez que sai para beber, o que é classificado como consumo em “binge”. De modo geral, homens consomem uma dose a mais que as mulheres. Dados do CEBRID revelam ainda que 10% a 15% da população mundial é diagnosticada como dependente (SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS, 2007).

De acordo com a décima edição da classificação internacional de doenças (CID 10) três padrões de uso das drogas podem ser identificados: 1) uso ocasional ou controlado; 2) uso abusivo ou nocivo; 3) uso compulsivo ou dependência. O uso ocasional refere-se à manutenção de um uso regular, não compulsivo e que não interfere com as atividades habituais do indivíduo. O uso abusivo é um padrão mal-adaptado de uso manifestado por consequências adversas recorrentes e significativas. Uso nocivo é conceituado como um modo de consumo de uma substância psicoativa que é prejudicial à saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

A ingestão abusiva de etanol está entre um dos maiores fatores de risco de morbidade e mortalidade. Os problemas de saúde mais frequentes associados à ingestão abusiva de etanol são: esteatose hepática, hepatite, pancreatite, doenças cardíacas, instabilidade muscular, neuropatia periférica, atrofia do cerebelo, distúrbios de coordenação, delírios, alterações de humor e demência (EZZATI et al., 2002; HECKMANN; SILVEIRA, 2009). Um levantamento realizado em 2004 identificou que 3,8% das mortes do mundo estão relacionadas ao uso do etanol, e que estes valores vêm aumentando a cada ano devido ao consumo precoce das bebidas alcoólicas, entre os jovens de ambos os sexos (CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL, 2013b. GALDUROZ et al., 2004). De acordo com o Centro de Informações Sobre Saúde e Álcool (2013a), o uso abusivo de etanol é responsável por 70% dos acidentes de trânsito fatais e está associado a diversas outras consequências sociais, por exemplo, 40% de ocorrências relacionadas à violência doméstica (CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL, 2013c).

1.2. Farmacocinética e farmacodinâmica do etanol

O etanol é uma molécula hidrossolúvel, pequena, capaz de atravessar rapidamente as membranas das células. Desse modo, o etanol passa facilmente pela barreira hematoencefálica causando modificações na neurotransmissão (SCHUCKIT, 2012; KOOB; Le MOAL, 2006a).

O etanol é rapidamente absorvido pela via oral, 70 – 80% de sua absorção ocorre rapidamente no intestino delgado. A presença de alimento no estômago

retarda o esvaziamento gástrico e conseqüentemente a absorção de etanol (SCHUCKIT, 2012).

Após a absorção, o etanol entra na corrente sanguínea e é distribuído para todo o organismo. No processo de metabolização, o etanol é oxidado a aldeído acético pela enzima álcool desidrogenase (ADH), que utiliza NAD⁺ como cofator. Na sequência, o acetaldeído sofre ação da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) sendo convertido em ácido acético. Outra via considerada importante no metabolismo do etanol envolve o sistema microsômico de oxidação do etanol. Nesse sistema o etanol é oxidado a acetaldeído pela enzima CYP2E1, que na sequência é convertido a ácido acético pela enzima aldeído desidrogenase. No indivíduo adulto (70 Kg), 90 – 98% do etanol é convertido a acetaldeído no fígado, sendo que 120 mg/Kg de etanol são convertidos em uma hora (SCHUCKIT, 2012). A exposição crônica ao etanol pode causar indução enzimática e, conseqüentemente, tolerância farmacocinética, também conhecida como tolerância metabólica, isto pode levar ao aumento do consumo de etanol para a obtenção de efeitos farmacológicos obtidos com as doses iniciais. Pequena porção do etanol é excretada na forma inalterada pelos pulmões, rins, suor e leite materno (HECKMANN; SILVEIRA, 2009; SCHUCKIT, 2012).

Em doses baixas o etanol causa relaxamento, sensação de calor, de alegria, rubor, desinibição, diminuição do controle dos pensamentos, do autocontrole e da capacidade de julgamento (SCHUCKIT, 2012). Com o aumento da dose, ocorre prejuízo da avaliação das capacidades individuais e do processo de tomada de decisões, comprometimento da coordenação motora, diminuição da velocidade dos reflexos, lentificação dos reflexos, perda do controle emocional, perda do equilíbrio, visão dupla, confusão mental, perda da consciência, depressão respiratória e morte (HECKMANN; SILVEIRA, 2009). Estes efeitos ocorrem devido aos efeitos farmacológicos do etanol no sistema nervoso central.

O etanol é um depressor do sistema nervoso central e seu mecanismo de ação é complexo e envolve a ação em vários sistemas de neurotransmissão. O etanol provoca a facilitação da transmissão gabaérgica, atuando sobre os receptores GABA_A, provocando abertura dos canais de cloreto e conseqüentemente a entrada excessiva deste íon no terminal pós-sináptico, hiperpolarizando a célula. O etanol também promove a inibição da ativação dos receptores glutamatérgicos, principalmente do tipo NMDA e dos canais de cálcio voltagem-dependentes

diminuindo o influxo de sódio e cálcio na célula, tornando-a menos excitável (KOOB; Le MOAL, 2006b). A ingestão aguda de etanol ativa também a liberação do neurotransmissor dopamina, principalmente na via dopaminérgica mesocorticolímbica, o que está relacionado ao efeito reforçador positivo dessa substância e ao consumo de etanol (SCHUCKIT, 2012). Com a exposição crônica ao etanol acontece um efeito oposto à exposição aguda a esta mesma substância, ou seja, ocorre uma redução do influxo de cloreto e aumento da expressão dos canais de cálcio voltagem-dependente, conseqüentemente uma hiperpolarização da célula por cálcio (KOOB; Le MOAL, 2006b).

Na exposição por períodos prolongados ao etanol pode ocorrer também a tolerância farmacodinâmica, além da tolerância metabólica. A tolerância farmacodinâmica é caracterizada por neuroadaptações, sendo uma resposta a este tipo de exposição na tentativa de equilibrar o funcionamento do sistema nervoso central a partir das modificações sofridas pela exposição a esta substância (SWIFT; LEWIS,2009). Com isto, ocorre diminuição do número ou inativação de receptores por fosforilação, ou modificação na via de transdução do sinal por alterações no acoplamento da proteína G com o receptor, diminuindo a resposta em relação a uma mesma dose da substância (SWIFT; LEWIS,2009).

Ainda não é totalmente esclarecido os locais específicos de ação do etanol no SNC nos receptores GABA_A, NMDA e canabinóides, porém evidências indicam que o receptor NMDA está envolvido na dependência, tolerância e síndrome de abstinência, através de uma potencialização na inibição deste receptor. Estas adaptações moleculares e celulares explicam o desejo incontrolável do indivíduo em consumir a substância de abuso nos períodos de abstinência e a precipitação das recaídas, pois a diminuição da inibição GABAérgica causa uma hiperatividade caracterizada como um sinal da síndrome de abstinência (SWIFT; LEWIS,2009). Portanto, com isto, ocorre uma inibição da recaptção de adenosina e diminuição da produção da proteína G no hipocampo, diminuição da fosforilação da proteína ligante ao elemento de resposta do 3' 5' monofosfato de adenosina (CREB) e diminuição nos níveis de proteínas cinase dependente de cálcio e calmodulina IV nos núcleos centrais da amígdala. Além disso, trabalhos tem observado aumento das proteínas Kinases que perduram por 12 semanas, da última exposição crônica, mas não para uma período de 1 à 6 semanas (KOOB; LeMOAL, 2006b).

1.3. Dependência

A dependência ao etanol é considerada um problema de saúde pública. Em humanos, ocorrem ciclos recorrentes de consumo intenso de etanol seguidos por períodos de abstinência e posteriormente recaída em pacientes que tentam não fazer o uso da bebida alcoólica (FADDA; ROSSETI, 1998; LI et al., 2007).

A dependência é uma desordem crônica e recorrente na qual a droga se torna prioridade na vida do indivíduo, sendo caracterizada pela procura e uso compulsivos da substância e perda do controle para limitar o consumo. Quando o acesso à substância é interrompido ou limitado ocorre a síndrome de abstinência (KOOB; Le MOAL, 2008).

A síndrome de abstinência é um conjunto de sinais e sintomas que aparecem após a interrupção abrupta do uso contínuo e prolongado de etanol. Sendo que a intensidade e a maneira como a síndrome de abstinência se desenvolve são limitados no tempo de exposição e depende da quantidade da última dose ingerida. Geralmente os primeiros sinais começam a aparecer após 6 horas da diminuição ou interrupção do etanol (LARANJEIRA et al., 2000).

Os sinais físicos da síndrome de abstinência são caracterizados por: tremores, câibras, náuseas, vômitos, sudorese, taquicardia e hipotensão ortostática. Estes são acompanhados dos sinais psíquicos que são: alterações no humor, depressão, irritabilidade, insônias, pesadelos, hiperatividade e ansiedade (HECKMANN; SILVEIRA, 2009).

Em 10% dos abstêmios ocorre febre baixa, taquipnéia, tremores e sudorese profusa. Em 5% dos indivíduos pode ocorrer convulsões que evoluem para outras complicações mais graves que são classificadas como o *Delirium Tremens*. Este se caracteriza por: agitação severa, confusão mental, alucinações visuais, febre, suor intenso, aumento dos batimentos cardíacos, náusea, diarreia e convulsões. (LARANJEIRA et al., 2000).

Segundo Heilig e Koob (2007), a dependência ao etanol é progressiva. Na fase inicial, o consumo de etanol acontece devido ao seu efeito reforçador positivo, ou seja, devido ao prazer desencadeado pelo seu consumo, que é mediado principalmente pelo aumento da transmissão dopaminérgica na região da concha do núcleo acumbens, caracterizada pelo aumento da liberação de dopamina neste

núcleo (Di CHIARA; BASSAREO, 2007; VENGELIENE et al., 2008; KIIANMAA et al., 1995; LÖF et al., 2007). Na outra fase, a dependência decorre de neuroadaptações que causam “fissura”, ou seja, desejo incontrolável em consumir a substância de abuso e a síndrome de abstinência, podendo ocorrer recaídas para aliviar os sintomas desta síndrome. A perda do controle para o consumo e o desejo obsessivo por etanol e a motivação para consumir sem nunca alcançar a saciedade, são os principais sinais e sintomas da dependência (HECKMANN; SILVEIRA, 2009).

Segundo Edwards e Koob (2010), após a exposição crônica e intensa às substâncias que causam dependência ocorrem dois processos distintos no SNC que levam à perda da função nos sistemas de recompensa e à potencialização do sistema antirrecompensa. De acordo com esses autores, quando a dependência se desenvolve ocorre ativação do sistema do estresse (via da antirrecompensa), mediada pelo CRF e outros neurotransmissores, como a noradrenalina e dinorfina. Isso produz estados aversivos. Ao mesmo tempo, o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, relacionado com os estados emocionais positivos e sensações prazerosas, é inibido durante a retirada da administração crônica da droga. Este efeito aumenta o reforço negativo e contribui para o comportamento compulsivo e de dependência, que evitam os sintomas desagradáveis ocasionados por comportamentos relacionados, por exemplo, a ansiedade (EDWARDS; KOOB, 2010).

Assim, pesquisas sobre os mecanismos de desenvolvimento de dependência ao etanol são de grande importância para a saúde pública. Neste sentido, modelos experimentais têm sido desenvolvidos com o objetivo de investigar os mecanismos neurais da farmacodependência e tentar reproduzir e estudar os sinais e efeitos da síndrome de abstinência para o etanol em roedores (BRACONI et al., 2010).

1.4. Modelos animais

Alguns modelos animais de exposição crônica e intensa ao etanol foram desenvolvidos para a investigação da síndrome de abstinência a essa substância. Entre esses modelos podemos destacar: 1) injeção intraperitoneal, que consiste em o animal receber injeções no peritônio com doses de etanol de acordo com cada protocolo, 2) administração via gavagem, que consiste na administração forçada e intragástrica de etanol em quantidades determinadas pelo pesquisador, sendo este e

o modelo anterior muito invasivos e pouco utilizados atualmente (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006); 3) exposição do rato a vapor de etanol, em que o animal é colocado em câmaras fechadas e recebem vapor de etanol por tempo e doses determinadas pelo pesquisador. Este modelo é muito utilizado devido a facilidade de trabalho e a obtenção de resultados significativos por um curto período de tempo (GILPIN et al., 2009); 4) consumo de etanol em dieta alimentar líquida oferecida como única fonte de alimento, em que o animal é isolado com acesso livre a água, sendo restrito de ração durante o período de exposição à dieta líquida contendo etanol. Neste modelo o animal é submetido a concentrações determinadas, porém pode fazer uso da solução de dieta líquida no momento e por tempo que quiser, além de mascarar o sabor naturalmente aversivo para os roedores em relação ao etanol, possui fontes nutritivas necessárias para manter o equilíbrio do organismo do animal (BONASSOLI, 2011; RYLKOVA et al., 2009; SERRANO et al., 2011); 5) exposição a solução de etanol como única fonte de líquido, nesta situação o animal fica restrito de água pura, podendo somente ingerir líquidos em uma solução de etanol, tendo livre acesso a ração, a desvantagem deste modelo é o sabor evidente da solução de etanol e ausência de água pura para hidratação do animal (SHARKO et al., 2013); 6) livre escolha de etanol em bebedouros, neste procedimento o animal pode ingerir a solução de etanol no tempo em que quiser, tendo acesso a uma ou mais garrafas de solução de etanol além de ração e água. Nesse procedimento o consumo e a preferência pelo etanol podem ser mensurados (CACACE et al., 2012).

Os modelos experimentais com exposição ao etanol por garrafas são os mais simples e o que mais se assemelham ao comportamento humano, porém a escolha do protocolo depende dos objetivos da investigação. Em modelos de livre escolha por soluções de etanol a quantidade administrada pelo animal é pequena, mas é possível mensurar a preferência pela droga durante o procedimento. No entanto, modelos que visam investigar neuroadaptações ou comportamentos decorrentes de neuroadaptações causada por períodos de exposição intensa os modelos mais utilizados são por exposição ao etanol de natureza forçada, na única fonte de líquido ou alimento e por exposição ao vapor de etanol (LI et al., 2007; SANNA et al., 2002; FUNK et al., 2006; PANDEY et al., 1999; SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006).

Gilpin et al., (2009) através dos modelos de exposição forçada ao etanol (exposição ao vapor e dieta líquida) observaram os níveis e a dinâmica do etanol no sangue e possíveis neuroadaptações que poderiam alterar os comportamentos no modelo de autoadministração operante. Com isto, estes autores observaram que ambos os modelos eram eficientes para aumentar as respostas na autoadministração operante em comparação aos seus respectivos controles. Além disso, a etanolemia gerada pela autoadministração operante foi semelhante em ambos os grupos expostos ao vapor ou dieta líquida.

O modelo de exposição ao vapor de etanol o animal não possui livre acesso ao etanol, com isto é possível determinar o tempo de exposição e as quantidades inaladas de etanol. No modelo de exposição à dieta líquida o animal tem livre acesso ao etanol, podendo fazer uso da substância nas quantidades e momentos que preferir. Com isto, durante toda a exposição os níveis de etanol no sangue permanecem significativos ao longo de todo o ciclo circadiano. Ao contrário do modelo de exposição ao vapor de etanol, o modelo de dieta líquida é o que mais se assemelha ao comportamento humano (GILPIN et al., 2009).

Um dos principais sinais da síndrome de abstinência observado em ratos expostos aos procedimentos acima são comportamentos relacionados à ansiedade (PANDEY et al., 1999; GETACHEW et al., 2008) e o aumento do consumo voluntário de etanol após um período de retirada da exposição crônica (RIMONDINI et al., 2002; FUNK et al., 2006). A presença de comportamentos relacionados à ansiedade é uma característica da síndrome de abstinência após um período de exposição crônica ao etanol (KLIETHERMES, 2005). As análises desses comportamentos em modelos animais podem contribuir para a compreensão desse aspecto da dependência (KLIETHERMES, 2005).

Modelos de exposições repetidas e forçadas a soluções contendo etanol, seguidas de períodos abruptos de abstinência, causam modificações moleculares nos substratos neurais relacionados ao desenvolvimento da dependência, essas alterações, denominadas neuroadaptações (EGLI, 2005; KLIETHERMES, 2005; BONASSOLI et al., 2011), podem estar relacionadas às alterações comportamentais observadas na síndrome de abstinência. Alguns estudos de exposição crônica e intermitente ao etanol demonstraram neuroadaptações com consequente aumento

do consumo após períodos variáveis da interrupção abrupta da exposição intermitente e forçada ao etanol.

Griffin III et al., (2009) utilizaram um protocolo no qual camundongos foram reexpostos ao modelo de livre acesso, 72 horas após a interrupção abrupta da exposição de 16 horas/ dia durante 4 dias ao vapor de etanol. Estes animais apresentaram aumento no consumo voluntário de etanol em comparação ao grupo controle. Griffin III et al., (2013) observaram que as concentrações extracelulares de glutamato no núcleo acumbens estava relacionada ao aumento voluntário do consumo de etanol após a exposição intermitente a esta substância. Estes autores observaram que a hiperatividade do sistema glutamatérgico persistia por 7 dias após a interrupção abrupta da exposição, promovendo consumo relacionados com a dependência de etanol. Através da via mesocorticolímbica, o etanol provoca a inibição do receptor glutamato reduzindo o efeito excitatório, e facilitando a liberação de dopamina na região do núcleo acumbens (KOOB; LeMOAL, 2006a).

Neste mesmo sentido Serrano et al., (2011) compararam dois grupos de exposição em um período de 6-24 horas após a interrupção abrupta da exposição a dieta líquida de etanol (10% (v/v)). Estes autores observaram alterações mais pronunciadas na expressão dos genes endocanabinóides no tecido da amígdala em 24 horas nos animais expostos de maneira intermitente com ciclos de exposição de 5 dias por 3 semanas quando comparados aos animais expostos por 24 horas/15 dias à mesma dieta. Podendo concluir, que ainda em outro sistema o padrão de resposta é diferente com a maneira de exposição ao etanol. Lee et al., (2013) compararam o consumo de etanol de camundongos pelo modelo de livre acesso após a exposição pelo mesmo tempo em semanas, utilizando 4 protocolos diferentes: 1) 24 horas de exposição diária em dias alternados (1 exposição a cada 2 dias); 2) 4 horas de exposição diária em dias alternados; 3) 4 horas de exposição em dias repetidos ou 4) 24 horas de exposição em dias repetidos. Esses autores observaram que os dois grupos de animais expostos de maneira intermitente (com intervalos de dias entre elas) apresentaram maiores consumos de etanol no modelo de livre acesso.

Com a análise da literatura é possível dizer que a exposição intermitente ao etanol promove maiores alterações no comportamento dos animais em relação ao consumo e alterações neuronais mais expressivas em relação à exposição crônica em diferentes períodos de abstinência.

O modelo de autoadministração também tem sido preconizado como um modelo de alto valor preditivo para a avaliação dos efeitos reforçadores de uma substância (LU et al., 2003; COVINGTON III et al., 2005; LECCA et al., 2007 ; PANLILIO; GOLDBERG, 2007; ROBERTS et al., 2007). Esse modelo é fundamentado nos princípios do condicionamento operante no qual cada resposta é reforçada pelos efeitos da própria substância de abuso (PANLILIO; GOLDBERG, 2007). Vários estudos demonstram que todas as substâncias de abuso que promovem dependência em humanos induzem autoadministração (KOOB; LE MOAL, 2001). Estudos recentes demonstram que a autoadministração pode “modelar”, preditivamente, vários aspectos que marcam a transição do uso ocasional para a dependência (PANLILIO; GOLDBERG, 2007). Por exemplo, um dos sinais da dependência, segundo o DMS-IV (American Psychiatric Association, 1994) é o aumento da motivação para uso da droga. No modelo de autoadministração esse sintoma pode ser avaliado pelo ponto de ruptura (ROBERTS et al., 2007).

O ponto de ruptura como medida motivacional foi proposto originalmente por Hodos (1961), neste procedimento o número de respostas necessário para a aquisição de uma nova injeção da substância aumenta progressivamente. A maior razão e o maior número de doses obtidas pelo animal caracterizam o ponto de ruptura, de tal forma que quanto maior o ponto de ruptura maior seria a motivação para obter a substância (HODOS, 1961; BEDFORD, 1978).

Gilpin et al. (2009) realizaram um experimento no qual ratos foram inicialmente expostos a 20 sessões de treino para autoadministração operante de etanol (10% (v/v)). Em seguida, os animais receberam etanol via dieta líquida por 7 dias e após 2 horas de retirada do etanol foram novamente submetidos ao protocolo de autoadministração que seguiu por várias semanas, duas vezes por semana. Nessas condições os animais expostos à dieta líquida contendo etanol apresentaram aumento do ponto de ruptura de 21 para 49 nas sessões de autoadministração, sugerindo que a abstinência ao etanol aumentou a motivação para o seu consumo. Uma hipótese que fundamenta este comportamento está relacionado à homeostasia do sistema de recompensa do SNC.

Além do ponto de ruptura, o procedimento de “binge” também tem sido bastante utilizado para avaliar a quantidade da substância que é consumida durante uma sessão de acesso contínuo e prolongado (MORGAN; ROBERTS, 2004). Esta

sessão é para modelar alguns aspectos comportamentais relacionados às bases neurobiológicas do reforço do etanol e para explorar o efeito farmacológico do tratamento ao etanol em relação ao seu consumo e cálculo da preferência pela substância (KOOB; LeMOAL, 2006b). Além disso, a exposição crônica e intensa ao etanol pode ser usada para o estudo de comportamentos relacionados à síndrome de abstinência (SPANAGEL, 2000).

Na autoadministração operante o etanol é consumido pela via oral. Devido ao sabor desagradável do etanol para os roedores, os animais são treinados inicialmente para autoadministrarem solução de sacarose ou sacarina e depois o etanol é adicionado gradativamente para o animal (ECONOMIDOU et al., 2006a; b; CRUZ et al., 2008). Picos de concentração de etanol são observados no sistema nervoso central depois de 30 minutos do início da sessão (CARRILLO; GONZALES, 2011).

A síndrome de abstinência ao etanol é caracterizada por fissura, que pode aumentar a motivação e o consumo de etanol nos períodos de recaída. Assim, o modelo da autoadministração pode ser utilizado para demonstrar essas alterações comportamentais e fornecer subsídios para a compreensão do mecanismo da dependência, diferentemente do modelo de garrafas em que somente é possível avaliar o consumo (ROBERTS et al., 2007; KOOB; LE MOAL, 2001; SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006).

1.5. Dependência ao etanol e CRF

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) compõem um sistema muito complexo e que pode afetar o funcionamento de diversos tecidos e órgãos animais (SILBERSTEIN et al 2009). Ele associa vários sinais indicativos de estresse que convergem para uma via composta pelos neurônios da região parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Os neurônios do PVN secretam o fator liberador de corticotrofina (CRF) e vasopressina (AVP) na eminência média da hipófise. O CRF e a AVP ativam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior. Neste sentido, o fluxo sanguíneo chega às glândulas adrenais provocando a secreção de glicocorticóides, sendo, cortisol em primatas e corticosterona em roedores, pelas células do córtex da adrenal (AKIL; MORANO,

1995). Quando o animal é submetido a estímulos por fatores externos ambientais, ou até fatores psicológicos, ocorre ativação desse eixo. Essa ativação é importante para adaptar o funcionamento do organismo frente a diferentes estímulos, mas anormalidades na sua função podem também desenvolver transtornos psiquiátricos nos indivíduos (JURUENA et al., 2004).

Os receptores do CRF do tipo 1 (CRF₁) possuem uma maior distribuição no Sistema Nervoso Central (SNC) dos roedores e a distribuição dos receptores do CRF tipo 2 (CRF₂) são mais restritas as áreas subcorticais (FOX; LOWRY, 2013), sendo a produção do neurotransmissor CRF e expressão destes receptores regulados por condições fisiológicas alteradas por estímulos ambientais (HILLHOUSE; GRAMMATOPOULOS, 2006).

Além disso, administração de substâncias de abuso aumenta a liberação de CRF em várias áreas do SNC, incluindo a amígdala (EDWARDS; KOOB, 2010). A amígdala basolateral (BLA) está diretamente relacionada na mediação de comportamentos relacionados à ansiedade e quanto maior for a excitabilidade dela maior será estes comportamentos (BUTLER et al., 2013).

Estudos indicam que estados de humor negativos são mais evidentes quando há maior atividade do sistema CRFérgico (KOOB, 2009). Estas evidências são apoiadas por estudos que há reversão de quadros de depressão ou ansiedade quando são administrados antagonistas de receptores de CRF (BALDWIN et al., 1991; LUNDKVIST et al., 1996; HIRANI et al., 2002; ZORRILLA et al., 2002). Além disso, em estudos com roedores, antagonistas dos receptores de CRF₁ reduzem comportamentos relacionados à depressão (MANSBACH et al., 1997; ARBORELIUS et al., 2000; OVERSTREET et al., 2004; LOWERY et al 2010). Estudos demonstraram que antagonistas dos receptores CRF₁ e CRF₂ são capazes de reduzir comportamentos relacionados à ansiedade durante a síndrome de abstinência de drogas de abuso (FUNK; KOOB, 2007).

Algumas evidências sugerem que o aumento da transmissão do sistema CRFérgico pode estar relacionado a uma das vias que causam a dependência do etanol (FUNK et al., 2006). Esta hipótese é sustentada por trabalhos que utilizaram antagonistas do receptor CRF em animais com prévia exposição crônica ao etanol (KOOB; LeMOAL, 2001). O bloqueio dos receptores de CRF reduz o consumo de etanol em animais previamente expostos a essa substância de abuso sem modificar

os comportamentos de animais que não foram expostos previamente ao etanol (FINN et al., 2007; FUNK; KOOB, 2007).

Funk et al. (2006) sugerem que o aumento na autoadministração de etanol nos períodos de abstinência é para diminuir o reforço negativo ocasionado por alterações nas vias relacionadas ao estresse, incluindo a neurotransmissão CRFérgica. Também observaram que animais pré-expostos ao vapor de etanol de maneira intermitente por 4 semanas diminuíram significativamente a autoadministração operante de etanol quando os animais receberam na amígdala central (CeA) infusão do antagonista CRF.

A dependência é caracterizada pela procura compulsiva e consumo abusivo do etanol. Quando o acesso ao etanol é interrompido ocorre à síndrome de abstinência. Sabe-se que a utilização de etanol está envolvida com alterações do sistema CRFérgico em várias regiões do SNC, incluindo a amígdala. Por isto, nós investigamos se a exposição intermitente ao etanol por meio de dieta líquida foi capaz de alterar comportamentos característicos da síndrome de abstinência e a quantidade do receptor CRF_1 na amígdala de ratos. Também investigamos se após a retirada da exposição ao etanol na dieta líquida houve aumento na motivação para o consumo na autoadministração operante do etanol.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

Investigamos se a exposição ao etanol na dieta líquida causa comportamentos relacionados à síndrome de abstinência, altera a transmissão CRFérgica na amígdala e modifica os parâmetros de autoadministração operante de etanol.

Para tanto avaliamos:

- Os comportamentos relacionados à ansiedade e a atividade locomotora na retirada do etanol;
- O efeito da exposição ao etanol na expressão de receptores CRF_1 na amígdala;
- O ponto de ruptura e o consumo de etanol durante o acesso livre (“binge”) no modelo de autoadministração operante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, pesando 200g provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista-UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do laboratório no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo invertido de luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 19h) com livre acesso a alimento e água e execução dos experimentos durante a fase escura do ciclo claro-escuro. Tal particularidade na execução dos experimentos da fase escura do ciclo decorre de que os roedores, ao contrário dos humanos, apresentam maior atividade no período noturno (HANAI; ESASHI, 2012; MUNN et al., 2011). O ciclo circadiano influencia em algumas respostas comportamentais do animal, entre eles um melhor consumo voluntário na fase escura em comparação com a clara, facilitando a observação dos efeitos toxicológicos e farmacológicos do etanol (DEIMLING; SCHNELL, 1979; MUNN et al., 2011).

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (CEP/FCF/CAr n° CEP 03/2009).

3.2. Procedimento de consumo de etanol com dieta líquida em bebedouros

Os animais foram isolados e expostos a uma dieta líquida com base no complemento alimentar Sustain Junior[®] (Danone, São Paulo-SP) sabor chocolate na concentração de 28,5 g/100 mL como única fonte de alimento, oferecidas em garrafas com bicos contendo esferas para uma melhor eficácia na medida. Estas soluções de dieta líquida foram oferecida a vontade com sessões de duração de 22 horas durante 3 ciclos consistindo cada ciclo com 5 dias com consumo de dieta líquida com etanol com períodos intermitentes, sendo que nestes intervalos (2 dias) entre os ciclos as soluções eram substituídas de dieta líquida para ração. A exposição intermitente modela a condição humana de consumo de etanol, sendo uma série de exposições prolongadas seguidos por períodos de abstinência. Está

maneira de exposição é importante, pois os níveis de etanol no sangue oscilam entre valores altos e baixos acelerando o consumo excessivo de etanol associados com a dependência (GILPIN et al., 2009).

Os animais foram expostos a uma prévia adaptação de dois dias somente à água e ao complemento alimentar para se adaptarem ao sabor da solução e aumentarem sua adesão à dieta líquida com etanol.

No primeiro ciclo de cinco dias os animais do grupo da dieta líquida acrescida de etanol receberam etanol na concentração de 6% (volume/volume) nos dois primeiros dias e nos demais dias receberam a solução com etanol a 8% (volume/volume). Uma garrafa contendo solução de dieta líquida contendo etanol e outra garrafa contendo água foram colocadas em uma caixa sem animal sob as mesmas condições, para quantificar as quantidades de solução e água que poderiam vazar. Ambas eram pesadas diariamente no mesmo horário de todas as outras garrafas.

Os bebedouros foram trocados todos os dias às 13h, sendo a massa dos bebedouros com dieta líquida mensurada para avaliação do consumo da solução. As figuras 2, 3, 4 e 5 representam os resultados.

O grupo controle recebeu a mesma solução de dieta líquida de Sustain Junior[®], porém sem a adição de etanol. O bebedouro contendo água potável foi disponibilizado a todo o momento para os animais. Os animais e os bebedouros com água foram pesados todos os dias.

3.3. Análise de comportamentos relacionados à ansiedade

Os comportamentos relacionados à ansiedade foram avaliados em um labirinto em cruz elevado (LCE), o qual compreende 4 braços de dimensões iguais (50 × 12 cm) elevados a 50 cm do solo, dois dos quais são fechados por paredes de 40 cm. Este aparato proporciona ao animal estímulos aversivos como a altura e os braços abertos, pois representa vulnerabilidade do animal a possíveis predadores (LISTER, 1990; CORNÉLIO; NUNES-de-SOUZA, 2009). Os ratos foram colocados individualmente no centro do labirinto e tiveram seu comportamento filmado por 5 minutos para posterior análise das filmagens com a utilização do programa X-Plo-Rat (versão 1.1.0, 2005; FFCL/USP Ribeirão Preto-SP). Os parâmetros quantificados

foram: porcentagem da frequência de entradas e de porcentagem do tempo gasto nos braços abertos (medida de comportamentos relacionados à ansiedade) e frequência de entrada nos braços fechados (medida da atividade motora do animal) (LISTER, 1990).

3.4. Análise da atividade locomotora

Para a determinação da atividade locomotora os animais foram transferidos individualmente para a caixa de medida automática de atividade locomotora (Columbus Instruments-CA, EUA), com dimensões 44 (comprimento) X 44 (largura) X 20 (altura) cm e a atividade locomotora avaliada por 15 minutos em intervalos de 5 minutos.

A caixa de atividade possui fotocélulas de emissores de luz infravermelha com 2,5 cm nas paredes da caixa e distantes 4,5 cm do seu assoalho. Cada unidade de locomoção corresponde à interrupção de dois feixes de luz.

3.5. Procedimento de autoadministração operante de etanol

3.5.1. Caixa para autoadministração operante de etanol

As caixas para autoadministração são feitas de acrílico transparente medindo 25 X 30 X 30 cm (comprimento X profundidade X altura). Em uma das paredes da caixa há um painel removível, com duas barras retráteis, um reservatório de líquido para ingestão oral pelo rato e pequenas lâmpadas para sinalização da disponibilidade do etanol. Esse painel é conectado a uma bomba de infusão que fornece 200 μ L de solução de sacarina ou etanol no reservatório de líquido para ingestão. Somente uma das barras retráteis aciona o fornecimento de solução, sendo que a pressão na outra barra retrátil foi registrada, mas não acionou a injeção de solução. A barra inativa tem a função de quantificar a atividade do animal inespecífica em relação à busca do etanol. A caixa experimental permaneceu alojada dentro de uma caixa de isolamento acústico equipada com ventilador e luz branca de 7,5 W. O painel e a bomba ficaram conectados a um microcomputador, contendo o

programa para o controle das infusões e esquema de razão (Insight[®], Ribeirão Preto-SP).

3.5.2. Treinamento da autoadministração operante de etanol ou sacarina

O procedimento de treino e as fases posteriores foi baseado em Economidou et al. (2006a) e Cruz et al. (2008).

Esse procedimento teve como objetivo treinar os ratos para autoadministração de solução de etanol 6% em razão fixa RF 3, em outras palavras, os animais tinham que pressionar a barra ativa por 3 vezes para obterem uma infusão de solução.

Inicialmente, nos quatro primeiros dias do experimento os animais foram treinados a pressionarem uma alavanca da caixa de autoadministração em RF1, ou seja, para os animais obterem uma infusão era necessário pressionarem 1 vez a barra ativa para receberem solução de sacarina 0,05% (v/v) no reservatório de ingestão por 1h diária. Os animais foram colocados nas caixas de autoadministração somente durante o procedimento e depois foram alocados nas gaiolas moradia em grupos de 3 animais. Durante todo o tempo nas gaiolas moradias os animais tiveram livre acesso à água e ração.

Nesta fase, ainda em RF1, com a introdução do etanol, as sessões permaneceram com a duração de 60 min. ou encerradas quando o animal recebia 1g/kg de etanol. Os ratos foram treinados à autoadministração de soluções de concentrações crescentes de etanol e constante de sacarina. Desse modo, eles foram treinados a autoadministrarem as seguintes soluções de sacarina à 0,05% ou solução de sacarina/etanol por dois dias cada: 0,05%/2%; 0,05%/4%; 0,05%/6%. Seguindo a fase de aquisição do comportamento em RF3 com 5 sessões em dias alternados com duração máxima de 3 horas cada sessão ou encerradas quando o animal recebia 1g/kg de etanol. Igualmente nas demais fases houve o acionamento da injeção de solução que foi acompanhado pelo acendimento de uma luz acima da barra por 5s e também foi estabelecido um tempo de inatividade da barra de 20s.

Grupos controle para autoadministração de etanol foram submetidos ao procedimento semelhante ao anterior com exceção de que nunca receberam etanol, sendo o comportamento operante mantido somente pela solução de sacarina, a qual

teve sua concentração mantida para 0,05% ao mesmo tempo em que o grupo etanol era submetido ao protocolo com solução de etanol.

3.5.3. Teste de razão progressiva (RP)

A caixa de autoadministração foi programada de modo que o número de respostas de pressão da barra foi crescente para obtenção de um reforço com a solução etanólica ou de sacarina. Essa razão de respostas sofreu aumento de 1 nas quatro primeiras administrações de etanol, aumento de 2 nas quatro seguintes e aumento de 4 para todas as outras administrações. Assim, as razões de respostas seguiram o esquema 1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7, 9, 9, 11, 11, 13, 13... As sessões foram encerradas quando se passaram 60 min após a obtenção do último reforço.

A última razão completada pelo animal durante a sessão caracterizou o ponto de ruptura. Foram realizadas três sessões de RP em dias alternados. A média da última razão completada pelo animal em cada uma das três sessões de RP foi utilizada como valor do ponto de ruptura ao etanol.

3.5.4. Acesso Livre Prolongado de 24 horas (“BINGE”)

Um protocolo de acesso contínuo de etanol (6%; 0,2mL; RF; “time out” de 20 segundos) ou sacarina (0,05%; 0,2mL; RF; “time out” de 20 segundos) foi realizado por um período de 24 horas. A quantidade de etanol consumido e o intervalo entre infusões foram utilizados como variáveis dependentes.

3.6. Retirada de amostras e dissecação das áreas encefálicas

Os animais foram decapitados em guilhotina e seus encéfalos extraídos e congelados por meio de imersão em isopentano resfriado sobre gelo seco e armazenados em freezer a -80°C.

A dissecação foi realizada seguindo as coordenadas estereotáxicas do Atlas de Paxinos e Watson (2005), em criostato sob temperatura de -20°C para garantir a integridade das proteínas. Fatias coronais de cerca de 1 mm foram selecionadas e as áreas de interesse foram retiradas por meio de agulhas de ponta chata de 14 Gauge.

As fatias coronais de interesse apresentavam as coordenadas a partir do bregma de -2,1 a -3,1mm e o tecido retirado compreendeu tanto a amígdala basolateral quanto central de ambos os lados do encéfalo.

3.7. Western Blotting

Essa técnica foi realizada de acordo com a padronização do nosso laboratório (MARIN et al., 2008).

As áreas encefálicas de interesse foram homogeneizadas por meio de ondas de ultrassom em solução de SDS 1% e tiveram o conteúdo de proteínas determinados para ajustar as quantidades para as sucessivas análises. Em seguida as quantidades de proteínas foram ajustadas para 25 microgramas de proteínas e as amostras foram desnaturadas na proporção de 1:4 para o volume dos minigéis (20uL) em tampão da amostra com azul de bromofenol por 5 minutos em fervura e submetidas à eletroforese por cerca de uma hora e meia a 150V em gel de SDS-poliacrilamida 9%. A quantidade de peso molecular utilizado foi (1uL) (Page Ruler Prestained Protein Ladder 10-70kDa, Thermo scientific). Ao final da separação, as proteínas no gel foram transferidas para uma membrana PVDF-LFP (GE, Healthcare) overnight a 50 mAmps. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas das ligações inespecíficas em leite desnatado 5% em TBS-T por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, foram lavadas 3 vezes, com 5 minutos cada lavagem, por meio de solução TBS-T.

Após a fase de bloqueio, as membranas foram incubadas “overnight”, sob agitação, com o anticorpo primário (Polyclonal Antibody, Rabbit Anti-Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1[®]; Millipore) para as proteínas CRF₁ na diluição do anticorpo 1:500, que foram determinadas em ensaios preliminares. As membranas foram então novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (Goat-a-Rabbit IgG-Cy3; GE Healthcare) na diluição 1:1000 por 1 hora. Após isto, protegidas da luz, as membranas foram secas em papel de filtro e por fluorescência das bandas foram detectadas diretamente a partir das membranas utilizando-se o scanner Typhoon[®] Trio (GE Healthcare).

Após a revelação do último anticorpo as membranas foram ressondadas com B-Actina (Rabbit, Anti-Actin; Sigma-Aldrich) na diluição em TBS-T de 1:200 overnight

para a padronização da quantidade de proteína aplicada. Em seguida as membranas foram lavadas 5 vezes, sendo 5 minutos cada, por meio de solução de TBS-T e incubadas com anticorpo secundário por 1 hora na diluição em TBS-T de 1:1000. As membranas foram lavadas 5 vezes por 5 minutos cada e foram secas em papel de filtro. Em seguida a revelação foi efetuada no scanner Typhoon[®] Trio (GE Healthcare).

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental é mostrado esquematicamente na figura 1.

4.1. Consumo de etanol na dieta líquida em bebedouros

Os animais foram alocados individualmente em suas gaiolas moradia e divididos em dois grupos: Controle (n=25) e Etanol (n=21). Eles foram expostos à dieta líquida como descrito no item (3.2) e submetidos a uma exposição prévia contendo a mesma solução que os animais do grupo controle iriam receber por toda a exposição, a fim de se adaptarem ao sabor da solução. Os animais do grupo controle receberam somente solução de dieta líquida com água sem etanol nos mesmos períodos de exposição que o grupo etanol. Todos os animais e as garrafas contendo dieta líquida e contendo água foram pesadas diariamente, para posterior análise de consumo.

4.2. Alterações nos comportamentos relacionados à ansiedade e atividade locomotora na retirada de etanol

Doze horas após a retirada do etanol os animais, (N=22 para o grupo controle) e (N=20 para o grupo etanol), foram colocados individualmente no LCE por 5 minutos. Cada animal foi avaliado individualmente. Os comportamentos relacionados à ansiedade foram registrados como descrito acima no item (3.3). Aproximadamente 24 horas após o teste no LCE foram iniciados os testes para avaliação da atividade locomotora como descrito no item (3.4). Os animais foram transferidos individualmente para a caixa de atividade locomotora e a locomoção foi registrada

por 15 minutos (N=30 por grupo). Os testes comportamentais foram realizados na fase escura do ciclo claro-escuro de escuro.

4.3. Expressão de CRF₁ na amígdala 60 horas após a interrupção da pré-exposição ao etanol

Um grupo de 16 animais (8 controles e 8 tratados com etanol) recebeu o mesmo tratamento a base de dieta líquida com ou sem etanol descrito anteriormente e 12-36 horas após a interrupção abrupta do tratamento os animais foram submetidos aos ensaios comportamentais descritos nos itens (3.3. e 3.4). Após 60 horas os animais foram sacrificados e seus encéfalos dissecados para a análise da expressão de CRF₁ como descrito nos itens (3.5.5. e 3.5.6.).

4.4. Alterações relacionadas à motivação e ao consumo de etanol na autoadministração operante

Doze horas após o teste na caixa de atividade locomotora os animais foram submetidos por quatro dias ao treino com sacarina a 0,05%, seguida do protocolo de autoadministração operante de etanol descrito no item (3.5.2) para a determinação do ponto de ruptura e do consumo em acesso livre (“binge”), como descrito nos itens (3.5.3 e 3.5.4), respectivamente.

Assim, tivemos os seguintes grupos:

- Grupo Etanol-Etanol: Expostos a dieta líquida com etanol (N = 15) com autoadministração operante de etanol
- Grupo Controle-Etanol: Não expostos a dieta líquida com etanol (N = 16) com autoadministração operante de etanol
- Grupo Etanol-Sacarina: Expostos a dieta líquida com etanol (N = 15) com autoadministração operante de sacarina
- Grupo Controle-Sacarina: Não expostos a dieta líquida com etanol (N = 14) com autoadministração de sacarina.

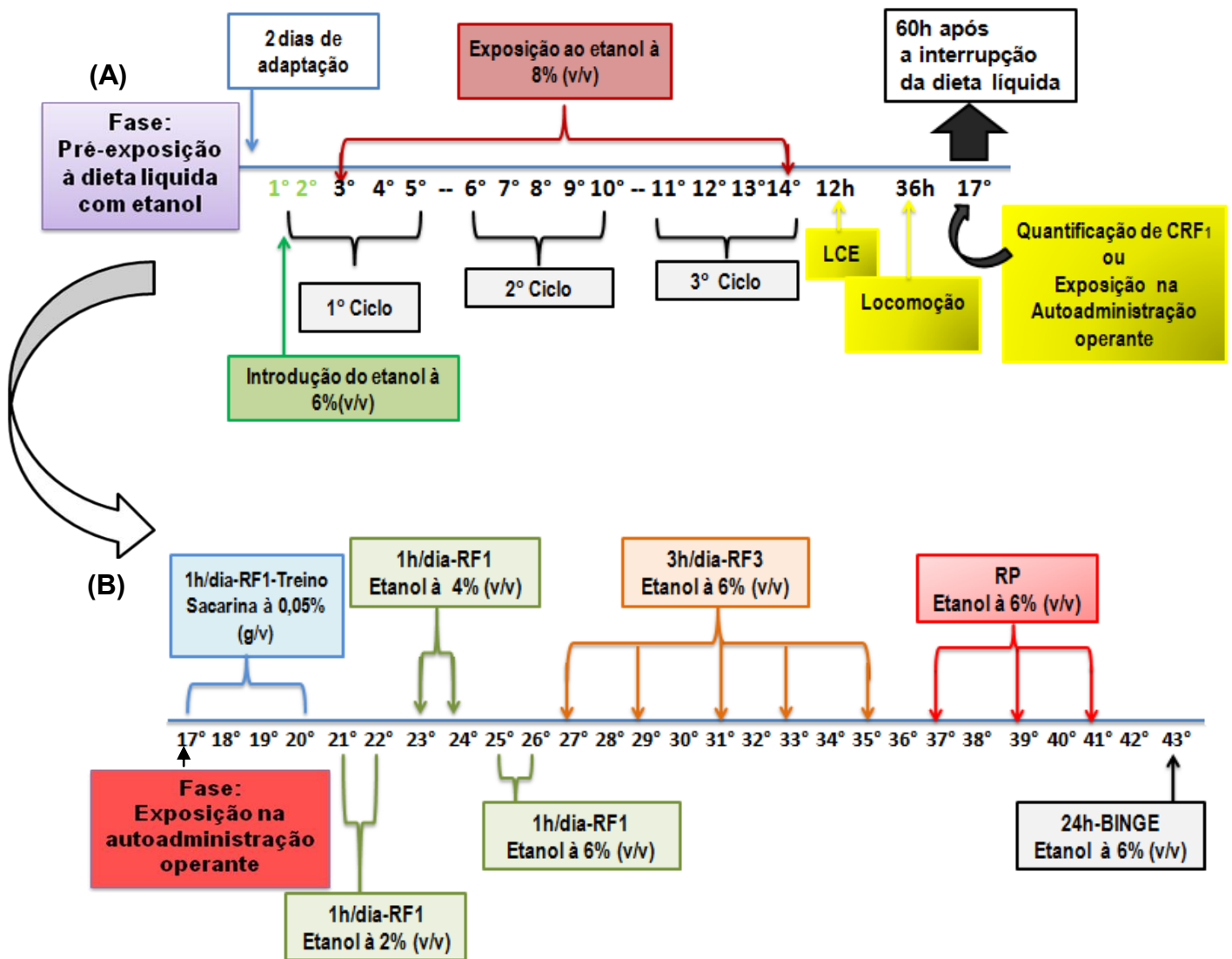


Figura 1. Resumo do protocolo experimental. (A) Tratamento com dieta líquida e testes comportamentais relacionados a ansiedade, posterior análise molecular ou protocolo de autoadministração operante. **(B)** Procedimento da autoadministração operante.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de massa corporal, consumo de dieta líquida, consumo calórico da dieta foram analisados por ANOVA bifatorial, considerando os fatores tempo de exposição (dias durante o procedimento) e pré-exposição (etanol vs controle). Quando ANOVA indicou diferenças significativas a comparação múltiplas das médias foi realizada pelo teste de Newman-Keuls. A análise da atividade locomotora a cada 5 minutos foi feita por ANOVA de medidas repetidas fatores tempo de locomoção e pré-exposição. Os dados comportamentais do LCE, atividade locomotora acumulada e expressão de CRF₁ foram analisados por teste t de Student. Os dados da autoadministração operante foram analisados por ANOVA bifatorial considerando os fatores pré-exposição (controle vs etanol) e exposição na autoadministração (sacarina vs etanol). Alterações significativas foram consideradas com $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Consumo do etanol na dieta líquida

Na figura 2 (A) representa o consumo de etanol (g/kg) ao longo de 14 dias de exposição à dieta líquida com etanol. Ao longo da exposição os animais apresentaram uma média de consumo de etanol com uma variação de $6,19 \pm 0,64$ à $10,93 \pm 0,5$. Na figura 2 (B) está representado a média do consumo em (g/kg) de dieta líquida. A comparação estatística ANOVA demonstrou diferenças significativas no consumo total de dieta líquida considerando o fator tempo ($F_{1,494} = 10,11$; $p < 0,05$) e pré-exposição ($F_{1,38} = 324,96$; $p < 0,05$). A interação entre os fatores também foi significativa ($F_{1,494} = 3,09$; $p < 0,05$), o que sugere que a presença de etanol diminui o consumo de dieta, sendo que para todos os dias a comparação entre os grupos da pré-exposição foi $p < 0,05$.

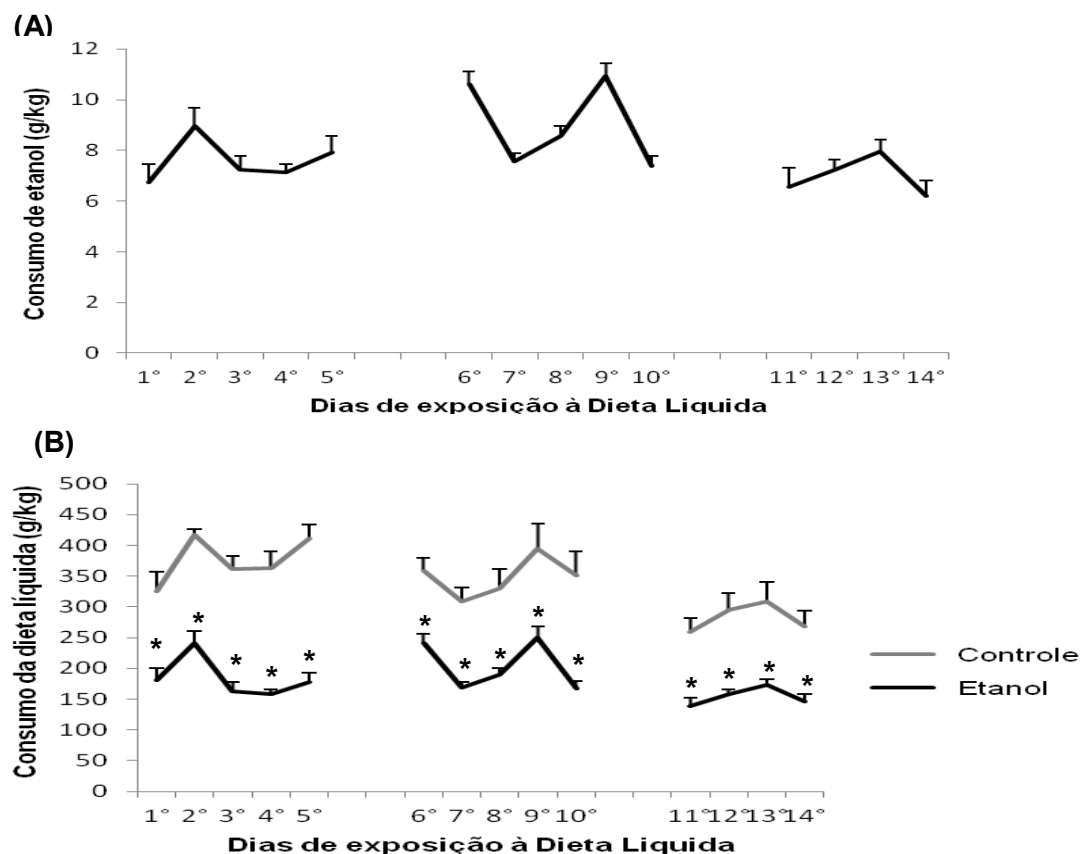


Figura 2. (A) Consumo de etanol em animais que receberam dieta líquida (6% de etanol, (v/v), nos dois primeiros dias e 8% no restante da exposição). **(B) Consumo da dieta líquida** contendo etanol ou sem etanol (controle). Os pontos representam a média \pm EPM ($n=21-25$ animais por grupo). * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Controle (teste Newman-Keuls).

Durante a fase de exposição à dieta líquida ANOVA para o consumo calórico demonstrou diferença entre os grupos com um consumo muito maior de calorias para o grupo controle. Para o fator pré-exposição ($F_{1,38}=201,49$; $p<0,05$) e tempo ($F_{1,494}=6,47$; $p<0,05$) e interação ($F_{1,494}=2,89$; $p<0,05$) em que durante todos os dias o consumo calórico entre os grupos foram diferente. A figura 3 está representada a análise da massa corporal dos ratos ao longo da exposição à dieta líquida com etanol (Grupo Etanol) e sem etanol na dieta líquida (Grupo Controle). A comparação estatística (ANOVA bifatorial) evidenciou diferenças para o fator pré-exposição ($F_{1,44} = 5,76$; $p<0,05$) e tempo ($F_{1,572}=53,60$; $p<0,05$). Apresentando interação entre os fatores ($F_{1,572}=2,49$; $p<0,05$), sendo que nos dias 4, 5, 7, 8, 9, 10 e 14 a diferença entre os grupos foi significativa ($p<0,05$, Newman-Keuls).

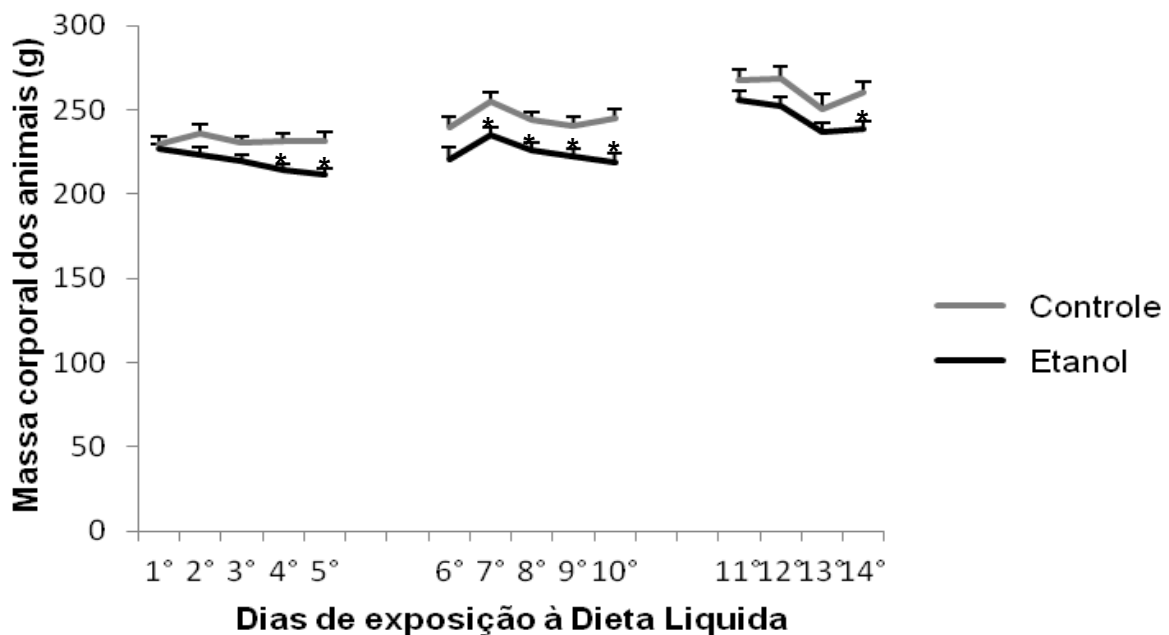


Figura 3. Massa corporal dos animais ao longo dos dias de exposição à dieta líquida. Os pontos representam a média \pm EPM ($n=21-25$ animais por grupo). * $p<0,05$, quando comparado ao grupo Controle (teste Newman-Keuls).

6.2. ALTERAÇÕES DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE E ATIVIDADE LOCOMOTORA

A exposição à dieta líquida com etanol não modificou a frequência de entradas nos braços fechados ($t_{2,40}=-0,03$; $p=0,97$) (Figura 4. A), também não modificou a porcentagem de entradas nos braços abertos ($t_{2,40}=1,19$; $p=0,24$) (Figura 4.B) e tempo nos braços abertos ($t_{2,40}=1,41$; $p=0,16$) (Figura 4. C) entre os grupos. Para todas estas análises foram feitas comparações estatísticas com base no teste t-Student.

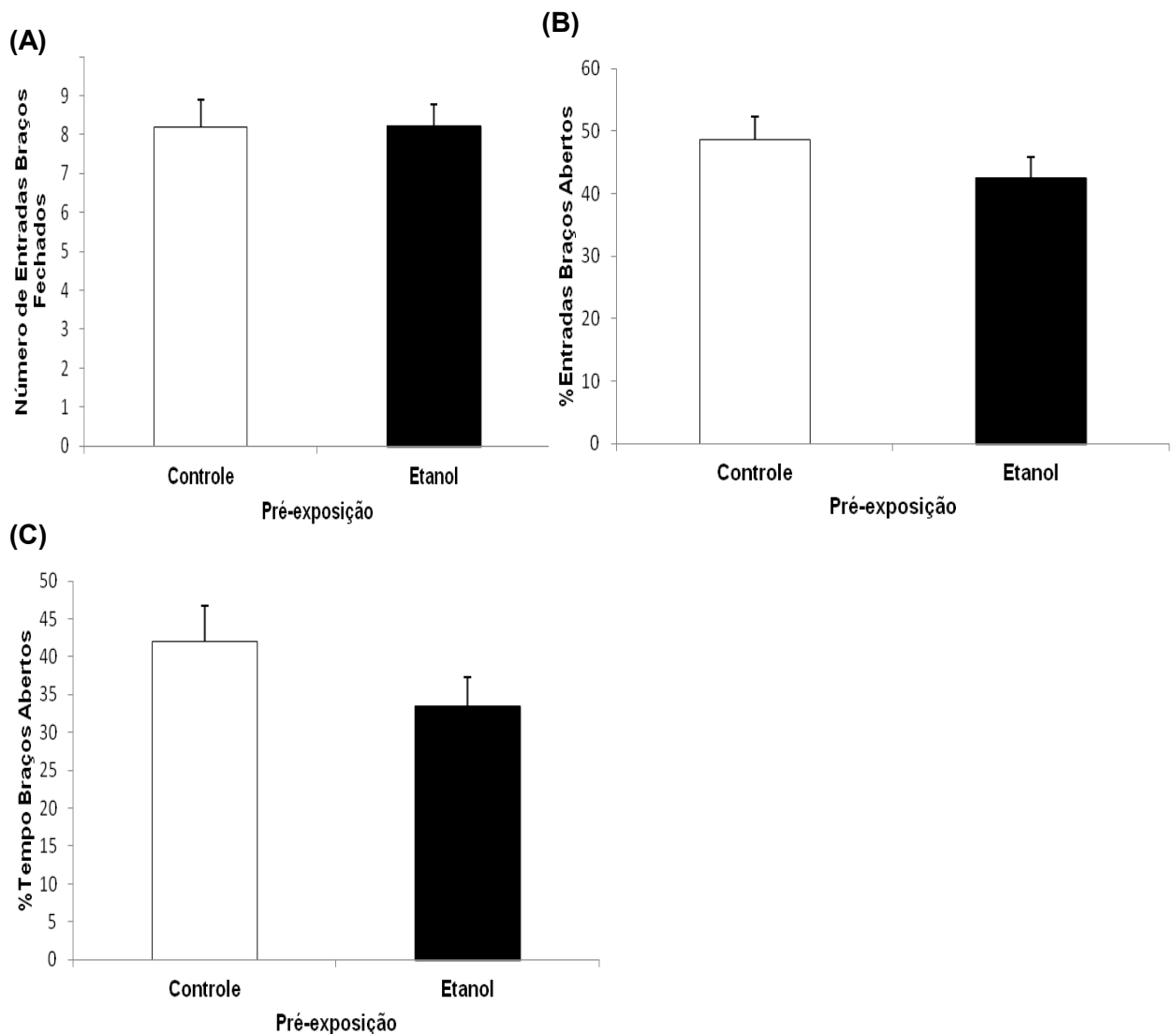


Figura 4. Comportamento dos animais no LCE 12 horas após a retirada da dieta líquida com etanol. (A) Frequência de entrada nos braços fechados. (B) Porcentagem de entrada nos braços abertos. (C) Porcentagem de tempo nos braços abertos. As barras representam a média \pm EPM (n=20-22 animais por grupo).

Na figura 5 está representada a atividade locomotora. A comparação estatística ANOVA apresentou diferença entre o fator tempo de locomoção 5, 10 e 15 minutos ($F_{1,116}=100,94$; $p<0,05$), porém não apresentou diferença no fator pré-exposição ($F_{1,58}=0,22$; $p=0,64$). Na atividade locomotora acumulada em 15 minutos, 36-48 horas após a retirada da dieta líquida com etanol, não se observaram diferenças significativas ($t_{2,58} = 0,64$; $p=0,64$).

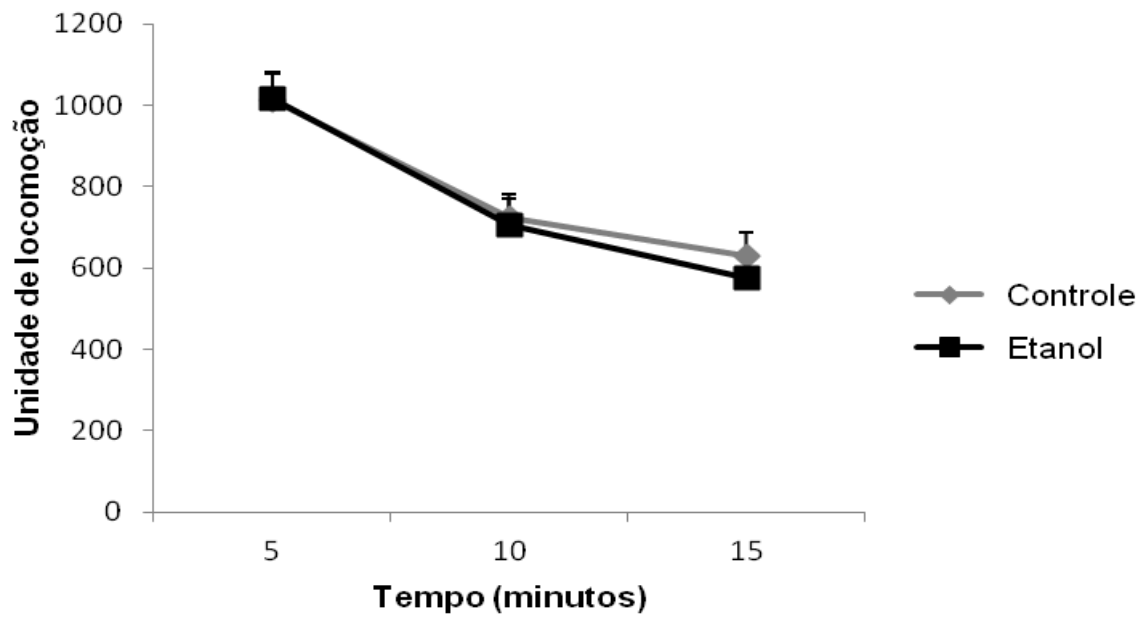


Figura 5. Atividade locomotora dos animais após 36 horas da retirada da dieta líquida com etanol. Os pontos representam Média \pm EPM (n=30 animais por grupo).

6.3. Expressão de CRF₁ na amígdala 60 horas após a interrupção da pré-exposição ao etanol

A figura 6 mostra a quantificação do receptor CRF₁ após 60 horas da interrupção abrupta da pré-exposição com a dieta líquida. A comparação estatística por teste-t não apresentou diferença entre o fator pré-exposição ($t_{2,14}=-0,92$; $p=0,37$) para as quantidades de receptores CRF₁. A figura 6 (B) está representada as bandas do CRF₁ com peso molecular entre 55-70 e a figura 6 (C) está representada as bandas de β -Actina.

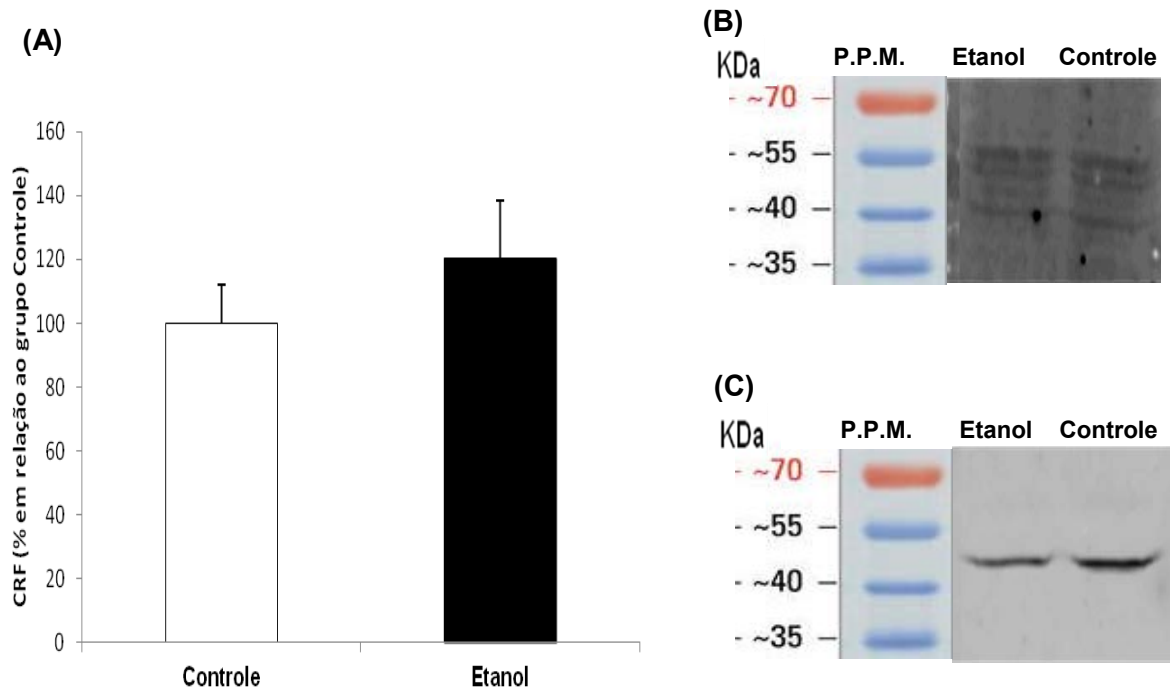


Figura 6. Quantidades de CRF₁ após 60h da retirada da dieta líquida com etanol. (A) As barras representam a Média \pm EPM ($n=8$ animais por grupo). **(B)** Representa as bandas dos grupos Etanol e Controle, P.P.M.= padrão de peso molecular. **(C)** Representa as bandas de β -Actina para cada grupo.

6.4. Alterações relacionadas a motivação e consumo de etanol na autoadministração

Na fase de treino a autoadministração operante os animais apresentaram o mesmo desempenho durante as sessões de treino em que todos aprenderam, sendo posteriormente separados aleatoriamente entre os grupos. A análise estatística (ANOVA) para as sessões de treino demonstrou diferença entre as sessões, porém não entre os grupos. Sendo para a análise das sessões do número de respostas o fator pré-exposição ($F_{1,58}=0,21$; $p=0,64$) e sessões de treino ($F_{1,174}=86,40$; $p<0,05$) e para a análise do número de reforços durante as sessões o fator pré-exposição ($F_{1,58}=0,50$; $p=0,48$) e sessões de treino ($F_{1,174}=97,97$; $p<0,05$).

Na figura 7 está representada a massa corporal dos animais ao longo de toda a exposição durante as sessões de autoadministração operante. ANOVA multifatorial não demonstrou diferença estatística para os fatores pré-exposição ($F_{1,56}=0,48$; $p=0,49$) e exposição ($F_{1,56}=0,19$; $p=0,66$), porém indicou ganho de massa corporal ao longo das sessões sendo para o fator tempo ($F_{18,1008}=714,56$; $p<0,05$). Nenhuma interação entre os fatores foi observada.

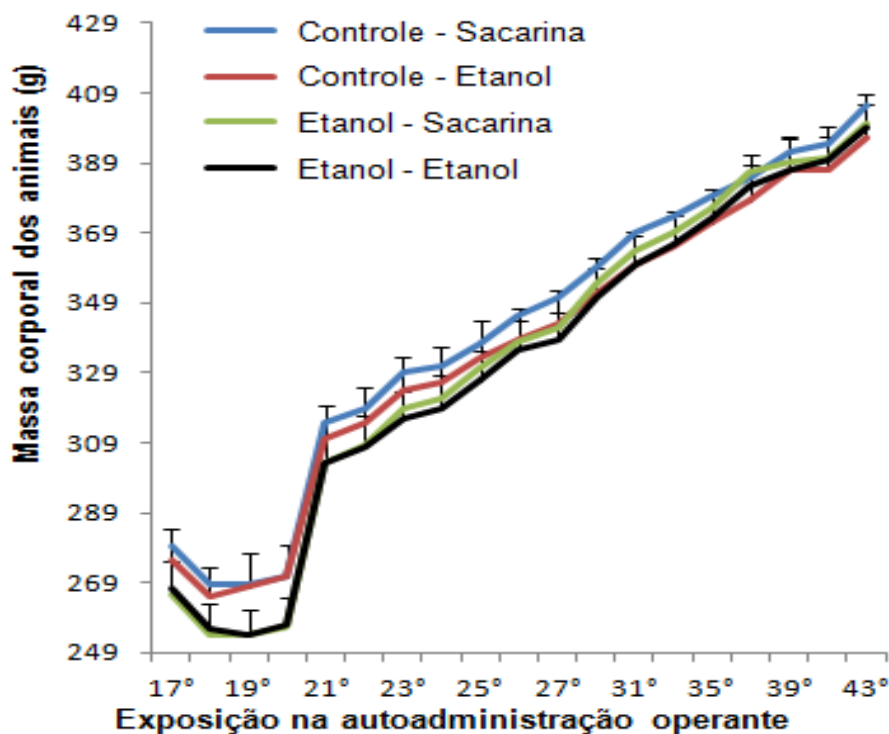


Figura 7. Massa corporal dos animais ao longo do tempo de exposição na autoadministração operante. Os pontos representam Média \pm EPM (n=14-16 animais por grupo).

A figura 8 representa todas as análises dos resultados da razão progressiva. Na figura 8 (A) observamos que os ratos do grupo pré-expostos à dieta líquida com etanol quando submetidos à autoadministração de sacarina (grupo Etanol-Sacarina) e etanol (grupo Etanol-Etanol) não tiveram diferença estatística no número de respostas em relação aos animais do grupo pré-exposição à dieta líquida controle durante a autoadministração de sacarina (grupo Controle-Sacarina). No entanto, o grupo de exposição à dieta líquida controle que foi submetido à autoadministração operante de etanol (grupo Controle-Etanol) segundo Newman-Keuls apresentou diferença estatística em relação a todos os outros grupos com $p < 0,05$. Sendo: Para o fator pré-exposição ($F_{1,56} = 7,33$; $p < 0,05$) e para o fator exposição ($F_{1,56} = 1,43$; $p = 0,24$).

A figura 8 (B) mostra o número de reforços. Segundo Newman-Keuls o grupo Controle-Etanol foi diferente do grupo Etanol-Etanol com $p < 0,05$ e o resultado foi próximo à significância em relação aos outros grupos com $p < 0,09$. Para o fator pré-exposição ($F_{1,56} = 4,76$; $p < 0,05$) e exposição ($F_{1,56} = 0,62$; $p = 0,43$) e interação ($F_{1,56} = 3,87$; $p = 0,054$).

A figura 8 (C) mostra o ponto de ruptura (Break Point). O grupo Controle-Etanol, segundo Newman-Keuls apresentou tendência em ser diferente do grupo Etanol-Sacarina ($p = 0,09$) e apresentou diferença estatística em relação a todos os grupos considerando o fator pré-exposição ($F_{1,56} = 5,21$; $p < 0,05$) e exposição ($F_{1,56} = 0,50$; $p = 0,48$) e interação ($F_{1,56} = 4,68$; $p < 0,05$).

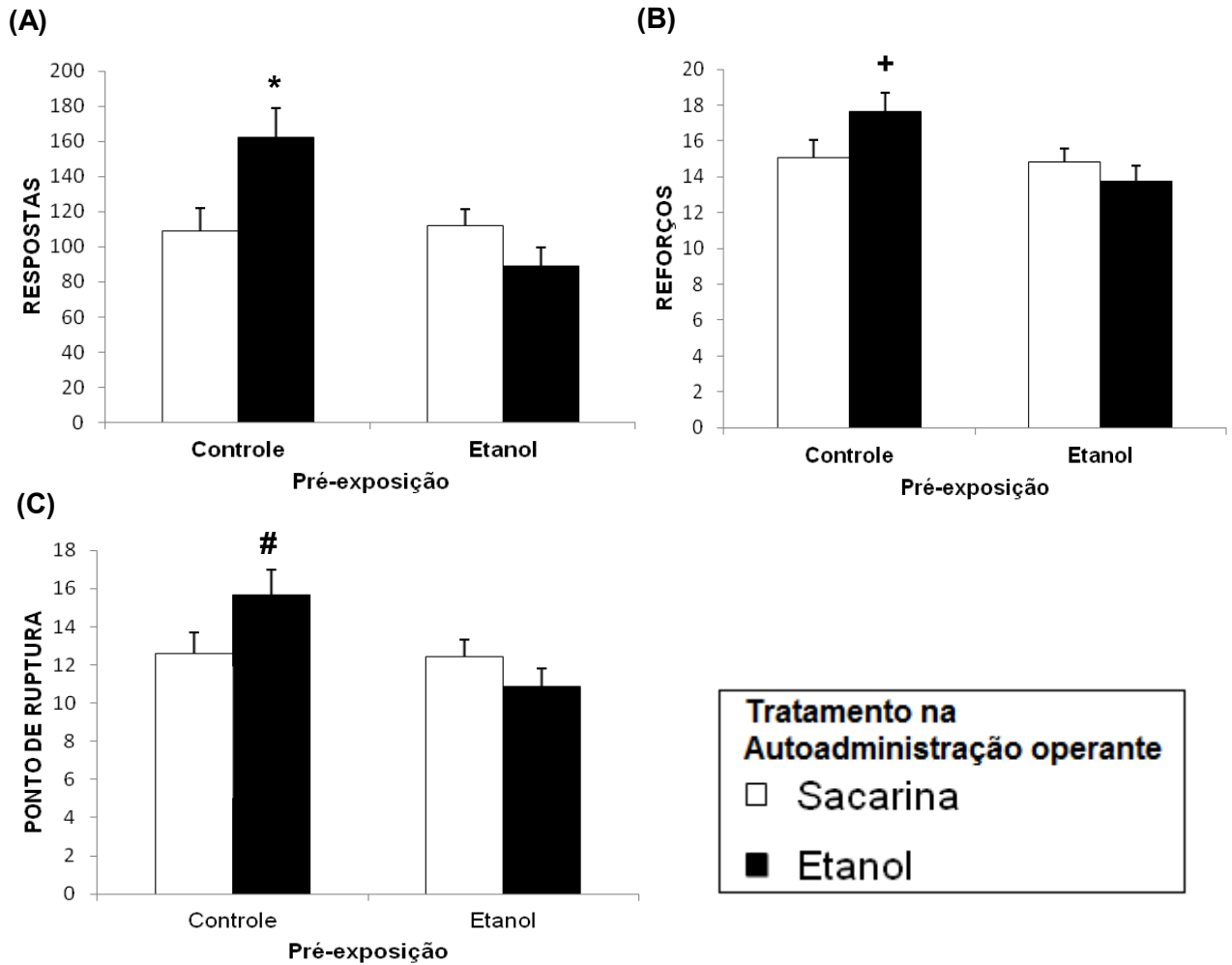


Figura 8. Comportamentos dos animais na autoadministração operante durante as sessões de Razão Progressiva. As barras representam a Média \pm EPM (n=14-16 animais por grupo). **(A)** Número de respostas. * $p < 0,05$ comparado a todos os outros grupos. **(B)** Número de reforços. + $p < 0,05$ comparado ao grupo Etanol-Etanol. **(C)** Ponto de ruptura. # $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle-Sacarina e Etanol-Etanol (teste Newman-Keuls).

Na figura 9 (A) mostra o número de respostas durante a exposição de razão fixa 1 por 24h na autoadministração “BINGE”. Segundo Newman-Keuls o grupo Etanol-Etanol foi diferente de todos os outros grupos com $p < 0,05$ sendo para o fator de pré-exposição ($F_{1,56}=2,26$; $p=0,14$) e exposição ($F_{1,56}= 5,42$; $p < 0,05$).

A figura 9 (B) representa o número de reforços durante a exposição ao BINGE. Segundo Newman-Keuls o grupo Etanol-Etanol foi diferente de todos os outros grupos com $p < 0,05$, sendo a estatística para os fatores pré-exposição ($F_{1,56}=2,71$; $p=0,11$) e exposição ($F_{1,56}=14,58$; $p < 0,05$).

Nas figuras 9 (C) e 9 (D) estão ilustradas as respostas e os reforços durante as 24 horas de acesso contínuo (“BINGE”), sendo que cada ponto representa a média à cada 3 horas.

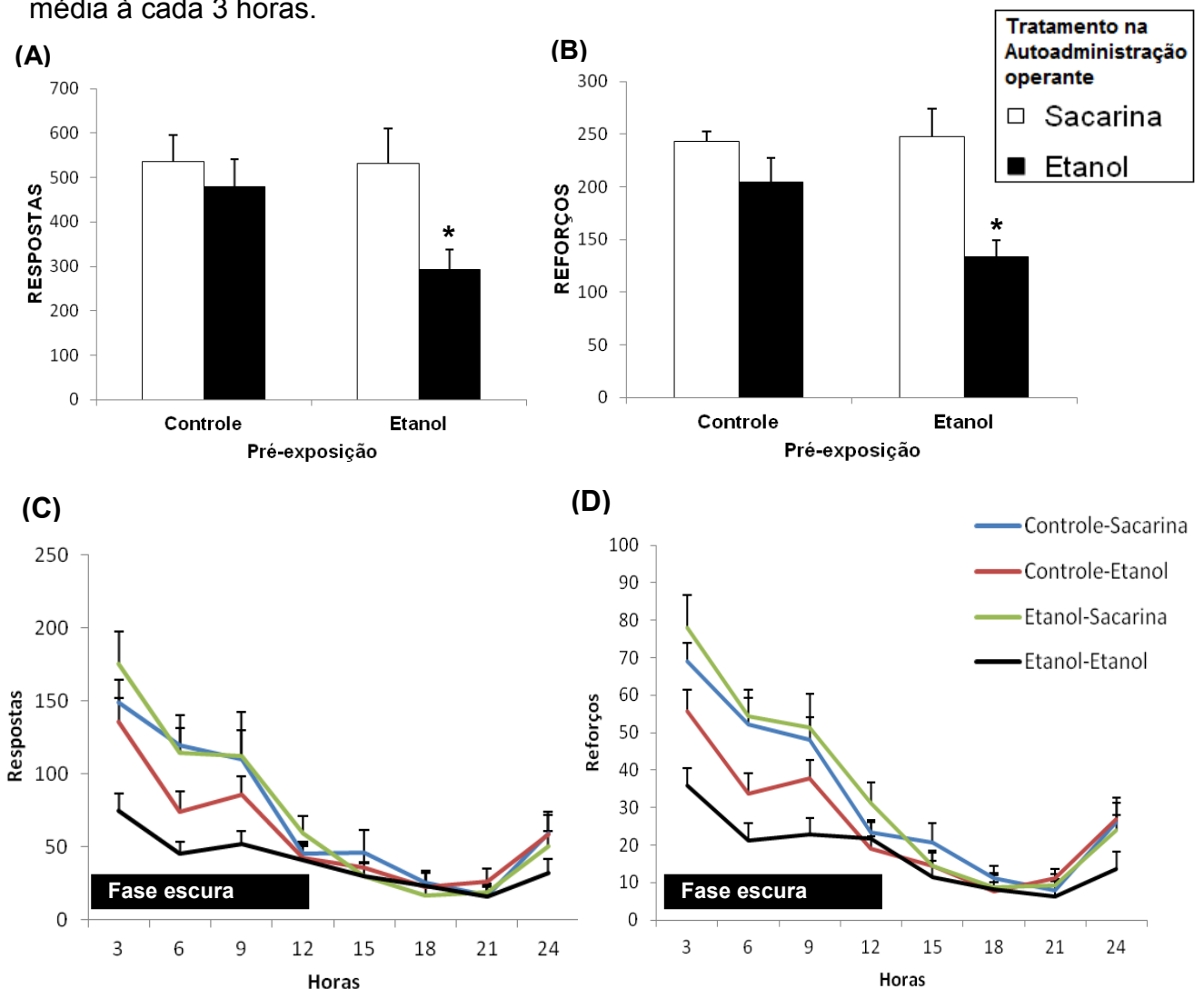


Figura 9. Comportamentos dos animais na autoadministração operante durante o BINGE. As barras representam a Média \pm EPM ($n=14-16$ animais por grupo). **(A)** Número de respostas. * $p < 0,05$ significa diferente de todos os outros grupos. **(B)** Número de reforços. Os pontos representam o comportamento a cada 3 horas no BINGE a Média \pm EPM dos grupos que variam um $n=14-16$. **(C)** Número de respostas. **(D)** Número de reforços.

7. DISCUSSÃO

A dependência de etanol é um problema de saúde pública devido aos inúmeros danos causados no organismo do indivíduo que faz uso abusivo do etanol e causa prejuízos sociais na convivência com a sociedade. É importante estudar este tema para entender a complexidade dos mecanismos de ação desta substância sobre os sistemas de funcionamento do organismo humano e elucidar os mecanismos neurais dos comportamentos relacionados à dependência. Podendo no futuro contribuir com o aperfeiçoamento dos tratamentos para alcoolistas.

Os modelos animais são importantes para investigar os mecanismos da dependência. No presente trabalho utilizamos a exposição ao etanol na dieta líquida para identificar alterações no período de retirada e da motivação na autoadministração operante de etanol.

No período de exposição à dieta líquida o grupo etanol consumiu menores quantidades de dieta líquida e apresentou menor ganho de peso. O consumo de etanol durante a exposição à dieta líquida foi compatível com os valores relatados na literatura. Não observamos diferenças nos comportamentos no LCE e locomoção e na expressão de CRF₁ comparando-se os animais pré-expostos (Etanol vs Controles).

A pré-exposição ao etanol não alterou o número de respostas e reforços para obtenção de sacarina, contudo, animais que receberam etanol na dieta líquida apresentaram diminuição do número de respostas e reforços para a obtenção de etanol nas sessões de razão progressiva e consumo nas sessões “binge”, sugerindo que a pré-exposição ao etanol reduz a autoadministração da própria substância. Quando analisamos o comportamento de consumo ao longo da exposição ao “binge” na autoadministração operante, observamos que os animais apresentavam maior padrão de respostas e reforços durante a fase escura do ciclo claro-escuro, com diminuição ao longo do tempo, atingindo um pequeno número de respostas durante a fase clara. Este padrão circadiano para o consumo de etanol foi demonstrado anteriormente por Richardson e Roberts, (1996). Entretanto, a variação rítmica do consumo de etanol pode estar relacionada com a variação da atividade motora do animal, pois os roedores apresentam maior atividade no período noturno (HANAI; ESASHI, 2012; MUNN et al., 2011).

Em nosso trabalho os animais foram submetidos à adaptação prévia a solução de complemento alimentar, uma vez que estudos sugerem que a exposição prévia é necessária para que o animal mantenha o consumo quando o etanol é adicionado (RYLKOVA et al., 2009; SHOBLOCK et al., 2011; WILLS et al., 2010).

Boas et al., (2012) demonstraram que durante a autoadministração contínua de etanol pode haver um decréscimo ao consumo da substância em ratos. Em nossos resultados a utilização do etanol por meio de dieta líquida não causou decréscimo do consumo de etanol durante os ciclos de pré-exposição, mesmo após aumentar a concentração do etanol de 6 para 8% (v/v), este fato pode ser atribuído à exposição intermitente.

Os resultados obtidos foram semelhantes ao consumo observado por outros autores quando os animais foram expostos ao etanol na dieta líquida. Em média nossos valores variaram de 6,18 a 10,93 g de etanol/kg do animal/dia. Assim, esses resultados estão de acordo com a literatura que mostra uma variação de consumo entre 4-12,1g de etanol/kg do animal/dia (SHOBLOCK et al., 2011; BONASSOLI et al., 2011; RYLKOVA et al., 2009; SERRANO et al., 2011). Além disso, foi relatado que as concentrações sanguíneas de etanol expostos a esse procedimento alcançavam valores que variaram de $96,2 \pm 8,0$ a $401,8 \pm 16,4$ mg/dL. Essas concentrações são capazes de alterar a neurotransmissão no sistema de recompensa dos animais durante o período de exposição (RYLKOVA et al., 2009; SERRANO et al., 2011), do mesmo modo, de acordo com a literatura 100-250 mg/dL de etanol no sangue de animais expostos por 3 semanas a soluções de etanol são capazes de desenvolver a tolerância (MATSON et al., 2013), e 4 g/kg injetadas em ratos adultos são suficientes para desenvolver tolerância aguda (BROADWATER et al., 2011) sendo que a tolerância funcional em roedores se desenvolve em 3 dias de acesso a solução de etanol (MATSON et al., 2013). Bonassolli et al., (2011) observaram que ratos expostos a etanol 6-8% na dieta líquida consumiram de 4,3-12,1 g de etanol/kg do animal/dia. Após a retirada do etanol várias regiões no SNC estavam mais ativas. Dessa forma, podemos supor que o mesmo ocorreu em nosso estudo.

Gilpin et al., (2009) observaram, por meio da exposição ao vapor de etanol, que as concentrações desta substância são similares no sangue e no sistema nervoso central. Quando os animais eram submetidos à dieta líquida contendo etanol

as concentrações permaneciam elevadas por todo o tempo de exposição. Após a interrupção abrupta da exposição às concentrações de etanol permaneciam elevadas, diminuindo de maneira gradual com o passar das horas. O etanol alcança o SNC, alterando rapidamente a neurotransmissão e conseqüentemente o comportamento (KOOB; Le MOAL, 2006a).

A partir da comparação dos nossos resultados com a literatura, podemos concluir que a metodologia de exposição ao etanol na dieta líquida, utilizada no presente trabalho, foi adequada para que os animais consumissem quantidades de etanol farmacologicamente relevantes.

Considerando-se o consumo de dieta líquida observamos que ele foi significativamente maior no grupo controle (não exposto ao etanol). Isto pode estar relacionado ao fato que o sabor do complemento alimentar não foi suficiente para mascarar o sabor desagradável do etanol adicionado à solução. Anderson et al., (2012), analisando ratos fêmeas e machos, observaram que o grupo exposto à dieta líquida sem etanol diminuía o consumo ao longo da exposição crônica, enquanto o grupo exposto a dieta líquida com etanol apresentava consumo crescente. Dentro de 2 semanas o consumo aumentava consideravelmente e no 14º dia de exposição, os animais apresentavam maior consumo de dieta líquida com etanol do que nos primeiros 10 dias em ambos os sexos. No entanto, em nosso estudo o consumo de dieta líquida com etanol não alterou ao longo da exposição. Este fato pode estar relacionado à exposição intermitente (O'DELL et al., 2004).

Cacace et al., (2012) observaram que a palatabilidade e sabor do etanol não são suficientes para interferir no comportamento dos animais em relação as propriedades farmacológicas e de ativação do sistema de recompensa do etanol no SNC.

A análise da massa corpórea também é importante, pois por meio dela é possível sugerir a presença de alterações metabólicas periféricas e verificar se o modelo experimental causa prejuízo ao animal. Nossos resultados mostram que animais do grupo etanol ganharam massa corpórea inferior em relação ao grupo controle. No mesmo sentido, Santucci et al., (2008) quando submeteu animais a dieta líquida com etanol por 26 dias, período de exposição maior que o nosso, não observou diferença estatística na massa corporal em relação ao controle. Carlson e Stevens (2006) também não observaram alterações na massa corporal dos grupos

controle e etanol expostos a dieta líquida por 14 dias, porém quando comparou o grupo que manteve o tratamento com ração e água pelo mesmo período de tempo, verificou diferença significativa no ganho de massa em relação aos outros grupos expostos a dieta líquida, independentemente da solução conter etanol ou não. Por outro lado, Bruijnzeel et al., (2010) quando submeteram roedores a dieta líquida com etanol de maneira intermitente por 16 semanas observaram um menor ganho de massa corporal em comparação ao grupo controle. A análise conjunta dos resultados sugere que a exposição à dieta líquida não é prejudicial aos animais. A variabilidade dos nossos dados relacionados aos dos demais autores pode estar relacionada à diferença entre as linhagens dos animais e período de exposição.

Comportamentos relacionados à ansiedade e alterações na atividade locomotora são características comuns no período de abstinência ao etanol (KLIETHERMES, 2005). Assim, para identificar alterações na síndrome abstinência, investigamos os comportamentos relacionados à ansiedade e alterações na atividade locomotora na retirada de etanol depois de um período de exposição de 21 dias de maneira intermitente. Nossos resultados não evidenciaram alterações de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE em ratos expostos ao etanol após um período de 12 horas de retirada. Rylkova et al., (2009) observaram alterações comportamentais no LCE 30 horas depois da interrupção abrupta da exposição ao etanol em animais que consumiram etanol na concentração de 10% (v/v) ao longo da exposição de 12 semanas em ratos Wistar. Estes animais diferiram dos animais controles no número de entradas no braço fechados, porcentagem de entrada nos braços abertos e na frequência de head dips (projeções da cabeça para fora do labirinto). Estes autores não observaram diferenças no LCE na concentração de 6,2% (v/v) de etanol, sugerindo que as alterações comportamentais podem estar relacionadas às concentrações de etanol. Por outro lado, Valdez et al., (2003) observaram que após 6 semanas da exposição intermitente à dieta líquida com etanol (10% v/v) por 21 dias não houve alteração dos comportamentos relacionados a ansiedade no LCE em relação ao grupo controle. Além disso, Rasmussen et al. (2001) observaram que a exposição por quatro semanas com etanol na concentração 5% (v/v) em ratos Sprague-Dawley causa sinais claros de abstinência após 4 semanas da interrupção do tratamento. As diferenças destes estudos podem ser

atribuídas às linhagens de animais utilizadas, à concentração de etanol e duração do protocolo experimental e à extensão do período de abstinência.

Nossas concentrações de etanol na dieta são compatíveis com a literatura, porém a ausência de sinais relacionados à ansiedade em nossos resultados pode ser explicada também pela exposição intermitente, pois Ciccociopo et al., (2003) compararam grupo controle exposto ao vapor de ar e dois grupos expostos as câmeras de vapor com etanol sendo um grupo cronicamente e outro de maneira intermitente. Estes autores observaram que o grupo exposto de maneira intermitente apresentou um atraso no aparecimento de sinais de abstinência em comparação aos demais grupos, sugerindo que a redução dos níveis de etanol no sangue foi mais lenta.

Outra possibilidade é que a análise de outros comportamentos no LCE, como por exemplo, head dipping (mergulho), hearing (levantar), Stretched Attend Posture (esticar), End Open Arm exploratory time (tempo gasto na extremidade do braço aberto) poderiam evidenciar alterações relacionadas à ansiedade após um período curto de abstinência (KLIETHERMES, 2005).

Nossos resultados não evidenciaram alterações na atividade locomotora no período de abstinência de 36-44 horas. Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por Andersson et al., (2012). Esses autores observaram que após um período de 48 horas de retirada de etanol na dieta líquida, depois da exposição por duas semanas, não houve alteração da atividade locomotora. No entanto, quando os autores Rimondini et al., (2002) submeteram os animais de maneira intermitente com intervalos de 7h durante a exposição de vapor de etanol por 8 semanas, observaram que após 6-7h da última exposição os animais apresentaram sinais claros de abstinência aguda e diminuição da atividade locomotora. Desse modo, o período de retirada empregado no presente estudo (36-44 horas) pode ter sido muito grande para observação das alterações da atividade locomotora.

Os núcleos central e basolateral da amígdala estão associadas ao substrato neural dos efeitos negativos presentes na síndrome de abstinência (SERRANO et al., 2011).

O sistema CRFérgico central medeia respostas comportamentais relacionadas à ansiedade. A desregulação deste sistema parece mediar estados negativos na abstinência do etanol, caracterizando a dependência (KOOB, 2006). Evidências

experimentais sugerem um papel fundamental do CRF no núcleo central da amígdala e núcleo leito da estria terminal (BNST). A retirada do etanol está associada ao aumento das concentrações extracelulares de CRF e com comportamentos da síndrome de abstinência. Além disso, a continuação da administração de etanol faz com que as concentrações de CRF retornem aos valores normais (BRUIJNZEEL et al., 2012). Estudos evidenciam que há um aumento da imunoreatividade do CRF na amígdala após 6 semanas da interrupção da exposição crônica do etanol (ZORRILLA et al., 2001).

Investigamos a expressão de CRF₁ na amígdala 60 horas após a interrupção da pré-exposição ao etanol e não observamos alterações significativas (Controle vs Etanol). Esta observação relaciona-se a ausência de alterações de comportamentos relacionados à ansiedade no período de abstinência observada neste estudo, que pode estar relacionado ao tempo curto para investigação após a interrupção abrupta da exposição crônica para proporcionar alterações significativas no receptor CRF₁ e consequentemente alterações comportamentais relacionadas a ansiedade. Porém a novidade deste trabalho é a análise do CRF₁, pois todos os achados na literatura são relacionados com as concentrações do neurotransmissor CRF. Entretanto, não podemos excluir alterações nas quantidades de CRF. Olive et al., (2002) observaram que as concentrações de CRF aumentavam 4,5 horas após a interrupção abrupta da exposição de duas semanas à dieta líquida com 8,5% (v/v) de etanol. Apesar das concentrações permanecerem altas por 7,5 horas e o CRF estar relacionado aos comportamentos relacionados à ansiedade, estes autores não observaram sinais físicos de abstinência neste período.

Na síndrome de abstinência pode ocorrer fissura com consequente aumento da motivação para o consumo do etanol. Assim, para investigar esses comportamentos utilizamos o modelo da autoadministração que é muito empregado para a avaliação dos efeitos reforçadores de substâncias de abuso, incluindo o etanol (KOOB; LE MOAL, 2001; PANLILIO; GOLDBERG, 2007). De acordo com Rylkova et al., (2009) a exposição intermitente e prolongada à dieta líquida com etanol pode aumentar a motivação para sua autoadministração no período de abstinência.

Em nosso estudo analisamos o consumo de etanol e sacarina após o pré-tratamento crônico com etanol em dieta líquida. Os nossos animais não apresentaram diferença em relação à pré-exposição para os parâmetros de

aprendizado durante as sessões de treino na autoadministração operante, e apresentaram ganho de massa corporal semelhante durante toda esta exposição.

A pré-exposição ao etanol não alterou o número de respostas e reforços para obtenção de sacarina, porém para a obtenção de etanol observamos que os animais do grupo pré-exposto ao etanol apresentaram menor número de respostas, reforços e ponto de ruptura em comparação aos animais que receberam dieta líquida controle (Controle-Etanol).

Nas sessões de razão progressiva o número de respostas foi maior para o grupo Controle-Etanol em relação a todos os outros grupos. O número de reforços deste mesmo grupo, mostrou tendência a ser maior em relação a todos os grupos com exceção ao grupo Etanol-Etanol que estatisticamente foi menor.

O ponto de ruptura foi maior no grupo Controle-Etanol em relação ao grupo etanol-etanol. Quando o número de respostas e reforços foram analisados na sessão de “binge” para o grupo Etanol-Etanol observamos menor consumo em relação a todos os outros grupos. Assim, nossos resultados sugerem que a pré-exposição ao etanol reduz o consumo e motivação para a autoadministração do etanol.

A adição de sacarina na solução é necessária para que o animal permaneça motivado a buscar a solução de etanol que é naturalmente aversiva para ratos (BAHI, 2013). Apesar da literatura apresentar relatos de propriedades reforçadoras para a sacarina (BEELER et al., 2012), animais que são submetidos a alimentação doce e calórica, quando submetidos a autoadministração de sabor doce artificial e sem calorias diminuem a busca pela solução (BEELER et al., 2012). Carlson e Stevens (2006) verificaram que os grupos expostos à dieta líquida e a ração animal após 24 horas de interrupção de tratamento não diferiram na autoadministração pela procura de solução doce sem adição de etanol. Isto pode explicar o motivo pelo qual os nossos animais apresentaram número de respostas e reforços semelhantes quando foram expostos para autoadministrar sacarina independentemente da exposição à dieta líquida ter sido com etanol ou controle.

Nossos resultados estão de acordo com Carlson e Stevens (2006). Esses autores verificaram que após a interrupção da exposição em dieta líquida a etanol 6% (v/v) por 14 dias ocorreu diminuição no número de respostas para autoadministração em RF10 de etanol. No entanto, esse efeito foi restrito aos animais com preferência para o lado esquerdo em comparação ao lado direito,

atribuindo este fato às diferenças de assimetria do SNC. Em nossos resultados os animais com preferência tanto para o lado esquerdo e direito estavam misturados apresentando uma diminuição do consumo. Entretanto, a maioria dos estudos demonstra que a pré-exposição ao etanol aumenta sua autoadministração. Gilpin et al., (2008) observaram que ratos expostos de maneira intermitente ao vapor de etanol 10% (v/v) por 8 semanas, apresentaram aumento nas respostas operantes para o etanol após 6 horas da interrupção do tratamento e em vários pontos do período de abstinência de 1-15 dias. Vendruscolo et al., (2012) demonstraram que animais expostos de maneira intermitente a câmara de vapor com etanol 2 vezes por semana durante 28-48 dias, com um período de abstinência de 6-8h, apresentaram um maior número de respostas em RF1 na autoadministração operante. Gilpin et al., (2009) compararam a exposição ao vapor e a dieta líquida. Animais foram treinados a autoadministrar etanol em RF1 e expostos de maneira intermitente ao vapor de etanol por 4 semanas. Os animais passaram por 19 sessões de autoadministração sendo duas por semana com um período de abstinência de 6-8h. Os animais expostos à dieta líquida 9,2% (v/v) de etanol, sete dias após a interrupção do tratamento passaram por sessões da autoadministração operante seguindo o mesmo padrão dos animais que sofreram exposição prévia ao vapor de etanol. Com os resultados obtidos eles verificaram que ambos os métodos são eficientes para o aumento da motivação ao consumo do etanol. Com o estudo de Gilpin et al., (2009) é possível observar que o método de dieta líquida é mais similar ao consumo humano em comparação a exposição ao vapor. Rimondi et al., (2003) observaram que depois de 7 semanas de exposição intermitente a câmara de vapor com etanol, seguidos de 3 semanas de abstinência, os animais apresentaram aumento na preferência e consumo de etanol com o protocolo por livre acesso a ração e água.

É importante ressaltar, ainda, que os autores citados acima não analisaram o ponto de ruptura e “binge”, que são parâmetros conceitualmente adequados para a investigação da motivação para o consumo de etanol (ROBERTS et al., 2007; HODOS, 1961).

Uma possível explicação para os resultados obtidos na autoadministração operante é a tolerância metabólica. Broadwater et al., (2011) observaram que roedores na fase adulta após à pré-exposição ao etanol quando submetidos a testes para observar os efeitos sedativos do etanol, apresentavam tolerância metabólica,

não apresentando sensibilidade aos efeitos do etanol. Gilpin et al., (2009) observaram que os animais pré-expostos ao etanol apresentaram tolerância metabólica apresentando concentrações mais baixas de etanol no SNC em comparação ao grupo controle.

Risher et al., (2013) observaram que ratos adultos expostos de maneira intermitente ao etanol apresentaram baixas concentrações de etanol no sangue durante exposições agudas ao etanol, e na autoadministração operante mostraram que estes efeitos não apresentaram alterações motivacionais devido a interrupção abrupta da exposição ao etanol. Estes autores sugeriram que a exposição intermitente causou tolerância farmacocinética persistente ao etanol.

Assim, podemos supor que no presente estudo os animais podem ter desenvolvido tolerância metabólica devido à pré-exposição intermitente à dieta líquida contendo etanol. Diferentemente do comportamento humano, que mesmo com a tolerância continua a fazer o uso da substância de abuso devido a fatores culturais e ambientais, os animais podem não ter sentido os efeitos farmacológicos do etanol e suspenderam o interesse em pressionar a barra da caixa de autoadministração operante para obter etanol.

Outra hipótese a ser considerada é a de alterações no limiar de recompensa. Schulteis et al., (1995) observaram alterações nos limiares de recompensa após um período de 17-20 dias à exposição crônica ao vapor de etanol. Estes autores observaram elevações nos limiares de recompensa significativos após 48 horas da interrupção abrupta da exposição, dentro deste período os animais apresentaram picos de limiares nos intervalos de 6-8 horas. As concentrações de etanol no sangue destes animais foram correlacionados com as elevações dos limiares de recompensa. Os resultados destes autores sugeriram que a diminuição da função do sistema de recompensa (elevações nos limiares de recompensa) é um elemento comum da retirada crônica das substâncias de abuso. O'Dell et al., (2004) sugeriram que a exposição intermitente ao etanol pode estar relacionada aos processos alostáticos que são responsáveis pelo aumento na autoadministração de etanol, e que a exposição crônica pode provocar alterações dentro dos mecanismos de recompensa na tentativa de manter a estabilidade. Devido a isto, animais com exposição intermitente ao etanol apresentam alterações no limiar de recompensa e alterações no sistema de recompensa. Nesta lógica a alteração do limiar de

recompensa pode proporcionar excessiva autoadministração de etanol ou pouca procura por ela.

Estudos com a autoestimulação elétrica intracraniana (ICSS) evidenciaram que ratos pré-expostos de maneira intermitente à dieta líquida de etanol 10% (v/v) apresentaram a um acentuado déficit na função de recompensa do SNC e comportamentos relacionados à ansiedade (RYLKOVA et al., 2009).

Os mecanismos neurais que impulsionam o consumo através da alteração do limiar de recompensa são pouco conhecidos. Sabe-se que estão envolvidos os processos neuroadaptativos que podem estar relacionados com a liberação do CRF e diminuição da dopamina no prosencéfalo de ratos (O'DELL et al., 2004).

Bruijnzeel et al., (2010) observaram que o bloqueio dos receptores centrais de CRF com um antagonista inespecífico dos receptores CRF₁ e CRF₂ impediu a elevação dos limiares de recompensa associadas com a interrupção abrupta do etanol. Observando que a liberação endógena do CRF mediava o déficit de recompensa durante este período. No mesmo sentido, Finn et al. (2007) observaram que a exposição intermitente ao vapor de etanol (3 ciclos com 16 horas de exposição) aumentava significativamente o consumo de etanol. Por outro lado, quando era administrado um antagonista do receptor CRF intra-amídala o consumo diminuía significativamente.

Apesar da pré-exposição intermitente à dieta líquida não ter alterado o CRF₁ durante o período de interrupção, seria interessante futuramente investigar se a exposição intermitente ao etanol é capaz de alterar a expressão do CRF₁ durante a autoadministração operante de etanol.

8. CONCLUSÃO

A exposição ao etanol na dieta líquida induziu consumo condizente com aquele relatado na literatura, conseqüentemente deve ter gerado concentrações plasmáticas e centrais que são farmacologicamente relevantes. Entretanto, não observamos alterações dos comportamentos relacionados à síndrome de abstinência ao etanol e da expressão do receptor CRF₁ na amígdala pela exposição ao etanol na dieta líquida. Contudo, observamos alterações nos parâmetros da autoadministração indicativos de redução da motivação pela substância. Dessa forma, experimentos futuros avaliando outros intervalos de tempo entre a interrupção da exposição ao etanol e as avaliações comportamentais podem revelar os sinais da abstinência no modelo experimental. A determinação da etanolemia também será importante para verificar a presença de tolerância metabólica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIL, H.A.; MORANO, M.I. Stress. In: —. BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J. **Psychopharmacol.** the fourth generation of progress., New York: Raven Press, 1995.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders.** Ed 4 Washington, DC, 1994.
- ANDERSON, M. L.; et al. Moderate drinking? Alcohol consumption significantly decreases neurogenesis in the adult hippocampus. **Neurosc.** v. 224 p.202–209, 2012.
- ARBORELIUS, L.; et al. Chronic Administration of the Selective Corticotropin-Releasing Factor 1 Receptor Antagonist CP-154,526: Behavioral, Endocrine and Neurochemical Effects in the Rat¹. **J. Pharmacol. Exp. Therap.** v. 294, n. 2, p. 588-597, 2000.
- BAHI, A. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice. **Pharmacol., Biochem. Behav.** v. 105, p. 83–88, 2013.
- BALDWIN, H. A.; et al. CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat. **Psychopharmacol.** v.103, p. 227-232, 1991.
- BEDFORD, J. A.; BAILEY, L. P.; WILSON, M. C. Cocaine reinforced progressive ratio performance in the rhesus monkey. **Pharmacol., Biochem. Behav.** v. 9, n. 5, p. 631-8, 1978.
- BEELEER, J.A.; et al. Taste uncoupled from nutrition fails to sustain the reinforcing properties of food. **Eur. J. Neurosc.** v. 36, p. 2533–2546, 2012
- BOAS, G. R. V; et al. GABAB receptor agonist only reduces ethanol drinking in light-drinking mice. **Pharmacol., Biochem. Behav.** v.102, p. 233–240, 2012.
- BONASSOLI, V. T.; MILANI, H.; OLIVEIRA, R. M. W. Ethanol withdrawal activates nitric oxide -producing neurons in anxiety-related brain areas. **Alcohol.** p. 1-12, 2011.
- BRACONI, S.; et al. Revisiting Intra-gastric Ethanol Intubation as a Dependence Induction Method for Studies of Ethanol Reward and Motivation in Rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v.34, p. 538-544, 2010.
- BROADWATER, M.; et al. Chronic intermittent ethanol exposure in adolescent and adult male rats: Effects on tolerance, social behavior and ethanol intake. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v.35, n.8, p. 1392–1403, 2011

BRUIJNZEEL, A. W.; et al. Corticotropin-releasing factor mediates the dysphoria-like state associated with alcohol withdrawal in rats. **Behav. Brain Res.** v. 210, p. 288–291, 2010.

BRUIJNZEEL, A. W.; et al. Blockade of CRF1 receptors in the central nucleus of the amygdala attenuates the dysphoria associated with nicotine withdrawal in rats. **Pharmacol., Biochem. Behav.** v. 1, p. 62-68, 2012.

BUTLER, T. R.; et al. Effect of β 3 adrenoceptor activation in the basolateral amygdala on ethanol seeking behaviors. **Psychopharmacol.** DOI 10.1007/s00213-013-3238-y, 2013.

CACACE, S.; et al. Alcohol preference, behavioral reactivity and cognitive functioning in female rats exposed to a three-bottle choice paradigm. **Behav. Brain Res.** v.234, p. 11– 19, 2012.

CARLINI, E.A. (Sup.) **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país.** São Paulo: CEBRID, 2006.

CARLSON, J. N.; STEVENS, K. D. Individual Differences in Ethanol Self-Administration Following Withdrawal Are Associated With Asymmetric Changes in Dopamine and Serotonin in the Medial Prefrontal Cortex and Amygdala. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 30 (10), p. 1678–1692, 2006.

CARRILLO, J.; GONZALES, R. A. A single exposure to voluntary ethanol self-administration produces adaptations in ethanol consumption and accumbal dopamine signaling. **Alcohol.** v. 45, p. 559 e 566, 2011.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL. **Alcoolemia em vítimas fatais de acidentes de trânsito do Distrito Federal, Brasil.** São Paulo, SP 2013a. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/385/alcoolemia-em-vitimas-fatais-acidentes-transito.php>>. Acesso em: 1 de Junho de 2013.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL. **Carga global de doenças, injúrias e custos econômicos atribuíveis ao consumo de álcool e transtornos relacionados ao uso de álcool.** São Paulo, SP 2013b. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/431/carga-global-doencas-injurias-custos-economicos.php>>. Acesso em: 1 de Junho de 2013.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL. **Problemas sociais decorrentes do uso do álcool.** São Paulo, SP 2013c. Disponível em: <http://www.cisa.org.br/artigo/221/problemas-sociais-decorrentes-uso-lcool.php>>. Acesso em: 1 de Junho de 2013.

CICCOCIOOPPO, R.; et al. Reinstatement of ethanol-seeking behavior by drug cues following single versus multiple ethanol intoxication in the rat: effects of naltrexone. **Psychopharmacol.** v. 168, p.208-215, 2003.

CORNÉLIO, A. M.; Nunes-de-Souza, R. L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition?. **Phys. & Behav.** v. 96, p. 440–447, 2009.

COVINGTON III, H. E.; et al. Brief social defeat stress: long lasting effects on cocaine taking during a binge and zif268 mRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex. **Neuropsychop.** v. 30, p. 310-21, 2005.

CRUZ, F.C.; et al. Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake. **Psychopharmacol.** v.201, p.459-468, 2008.

DEIMLING, M. J.; SCHNELL, C. Circadian Rhythms in the Biological Response and Disposition of Ethanol in the Mouse. **J. Pharmac. Experim. Therap.** v.213, n.1, p. 1-8, 1979.

DI CHIARA, G.; BASSAREO, V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. **Curr. Opin. Pharmacol.** v.7, p.69-76, 2007.

ECONOMIDOU, D.; et al. Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-141716A on ethanol self-administration and ethanol-seeking behavior in rats. **Psychopharmacol.** v.183, p.394-403, 2006a.

ECONOMIDOU, D.; et al. Effect of novel nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor ligands on ethanol drinking in alcohol-preferring msP rats. **Peptides.** v.27, n.12, p.3299-306, 2006b.

EDWARDS, S.; KOOB, G. F. Neurobiology of dysregulated motivational systems in drug addiction. **Future Neurol.** v. 5, n. 3, p. 393–401, 2010.

EGLI, M. Can experimental paradigms and animal models be used to discover clinically effective medications for alcoholism?. **Addiction Biology.** v. 10, p. 309 – 319, 2005.

EZZATI, M.; et al. The comparative risk assessment collaborating group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **Lancet.** v.360, p.1347-1360, 2002.

FADDA, F.; ROSSETTI, Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Progress in Neurobiology.** v.56, p.385-431, 1998.

FINN, D. A.; et al. Increased Drinking During Withdrawal From Intermittent Ethanol Exposure Is Blocked by the CRF Receptor Antagonist D-Phe-CRF(12–41). **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 31, n. 6, 2007.

FOX, J. H.; LOWRY, C. A. Corticotropin-releasing factor-related peptides, serotonergic systems, and emotional behavior. **Front. Neurosc.** v. 7, p. 1-16, 2013.

FUNK, C.K.; et al. Corticotropin-Releasing Factor within the Central Nucleus of the Amygdala Mediates Enhanced Ethanol Self-Administration in Withdrawn, Ethanol-Dependent Rats. **J. Neurosc.** v.26, p.11324 -11332, 2006.

FUNK, C. K.; KOOB, G. F. A CRF2 agonist administered into the central nucleus of the amygdala decreases ethanol self-administration in ethanol-dependent rats. **Brain Res.** v.1 1 5 5, p. 1 7 2 – 1 7 8, 2 0 0 7.

GALDUROZ, J. C.; et al. Trends in drug use among students in Brazil: analysis of four surveys in 1987, 1989, 1993 and 1997. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** v.37, n.4, p.523-531, 2004.

GETACHEW, B.; et al. Desipramine blocks alcohol-induced anxiety- and depressive-like behaviors in two rat strains. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.91, p.97-103, 2008.

GIGLIOTTI, A, BESSA M. A. Alcohol Dependence Syndrome: diagnostic criteria. **Rev. Bras. Psiquiatr.** São Paulo, v. 26, Supl.1, 2004.

GILPIN, N. W.; et al. Dependence-Induced Alcohol Drinking by Alcohol-Preferring (P) Rats and Outbred Wistar Rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** V. 39, n. 9, p. 1688-1696, 2008.

GILPIN, N. W.; et al. Operant behavior and alcohol levels in blood and brain of alcohol-dependent rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 33(12), p. 2113–2123. 2009.

GRIFFIN III, W. C.; et al. Repeated Cycles of Chronic Intermittent Ethanol Exposure in Mice Increases Voluntary Ethanol Drinking and Ethanol Concentrations in the Nucleus Accumbens. **Psychopharmacol. (Berl).** v.201, n. 4, p. 569–580, 2009.

GRIFFIN III, W. C.; et al. Increased Extracellular Glutamate In the Nucleus Accumbens Promotes Excessive Ethanol Drinking in Ethanol Dependent Mice. **Neuropsychop.** doi: 10.1038/npp.2013.256, 2013.

HANAI, M.; ESASHI, T. Effect of Dietary Protein Levels on Sex Hormones in Growing Male Rats Kept under Constant Darkness. **Exp. Anim.** v.61, n. 5, p. 555–561, 2012.

HECKMANN, Wolfgang; SILVEIRA, Camila Magalhães. **Dependência do álcool, aspectos clínicos e diagnósticos.** In: ANDRADE. Arthur Guerra de; ANTHONY, James C. *Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual.* 1ª ed. São Paulo: Minha Editora, 2009. Cap.3, p.67-87.

HEILIG, M.; KOOB, G.F. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. **TRENDS in Neurosc.** v.30, p.399-406, 2007.

HILLHOUSE, E. W.; GRAMMATOPOULOS, D. K. The Molecular Mechanisms Underlying the Regulation of the Biological Activity of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors: Implications for Physiology and Pathophysiology. **Endoc. Rev.** v.27, n.3, p. 260–286, 2006.

HIRANI, K.; et al. Behavioral action of ethanol in Porsolt's forced swim test: modulation by 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one. **Neuropharmacol.** v.43, p. 1339–1350, 2002.

HODOS, W. Progressive ratio as a measure of reward strength. **Science**. v.134:943–944, 1961.

JURUENA, M. F.; et al. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.26, n. 3, p.189-201, 2004.

KIIANMAA, K., et al. Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.52, p.29-34, 1995.

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

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychop.** v. 24, n. 2, p. 97-129, 2001.

KOOB, F.G. The Role of the Striatopallidal and Extended Amygdala Systems in Drug Addiction. **Ann. New York acad. scienc.es.** P. 445-460, 2006.

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Annu. Rev. Psychol.** v.59, p.29-53, 2008.

KOOB, G.F. Dynamics of Neuronal Circuits in Addiction: Reward, Antireward, and Emotional Memory. **Pharmacopsyc.** v.42, n. Suppl 1, p. S32–S41, 2009.

KOOB, George F.; LE MOAL, Michel. Alcohol. In: _____. **Neurobiology of addiction**. 1. ed. New York: Academic Press, 2006a. p. 178-183 to 196-202.

KOOB, George F.; LE MOAL, Michel. Alcohol. In: _____. **Neurobiology of addiction**. 1. ed. New York: Academic Press, 2006b. p. 28-32.

LARANJEIRA, R., et al. Consenso sobre a síndrome de abstinência do álcool (SAA) e o seu tratamento. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.22 (2), p. 62-71, 2000.

LECCA, D., et al. Reciprocal effects of response contingent and noncontingent intravenous heroin on in vivo nucleus accumbens shell versus core dopamine in the rat: a repeated sampling microdialysis study. **Psychopharmacol.** v.194, p.103-116, 2007.

LEE, A. M.; et al. Deletion of Prkcz Increases Intermittent Ethanol Consumption in Mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** doi: 10.1111/acer.12211, 2013.

LI, T.; HEWITT, B.G.; GRANT, B.F. The Alcohol Dependence Syndrome, 30 years later: a commentary. **Addiction**. v.102, p.1522-1530, 2007.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther.** v. 46, p. 321-340, 1990.

- LÖF, E., et al. Ethanol-induced dopamine elevation in the rat-modulatory effects by subchronic treatment with nicotinic drugs. **Eur. J. Pharmacol.** v. 555, p. 139-147, 2007.
- LOWERY, E. G.; et al. CRF-1 Antagonist and CRF-2 Agonist Decrease Binge-Like Ethanol Drinking in C57BL/6J Mice Independent of the HPA Axis. **Neuropsychop.** v. 35, p. 1241–1252, 2010.
- LU, L. et al. Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration in rats. **J. Neurochem.** v. 85, n. 6, p. 1604-13, 2003.
- LUNDKVIST, J.; et al. A non peptidic corticotropin releasing factor receptor antagonist attenuates fever and exhibits anxiolytic-like activity. **Eur. J. Pharmacol.** v. 309, p. 195-200, 1996.
- MANSBACH, R. S.; et al. Antidepressant-like effects of CP-154,526, a selective CRF receptor 1 antagonist. **Eur. J. Pharmacol.** v. 323, p. 21–26, 1997.
- MARIN, M.T.; et al. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: Lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.91, p.109-114, 2008.
- MATSON, L. M.; et al. Selectively Bred Crossed High-Alcohol-Preferring Mice Drink to Intoxication and Develop Functional Tolerance, But Not Locomotor Sensitization During Free-Choice Ethanol Access. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** doi: 10.1111/acer.12216, 2013.
- MORGAN, D.; ROBERTS, D. C. Sensitization to the reinforcing effects of cocaine following binge-abstinent self-administration. **Neurosc. Biobehav. Rev.** v. 27, n. 8, p. 803-12, 2004.
- MUNN, E.; et al. Reversed light–dark cycle and cage enrichment effects on ethanol-induced deficits in motor coordination assessed in inbred mouse strains with a compact battery of refined tests. **Behav. Brain Res.** v.224, p. 259– 271, 2011.
- O' DELL, L. E.; et al. Enhanced Alcohol Self-Administration after Intermittent Versus Continuous Alcohol Vapor Exposure. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 28, n. 11, p. 1676-1682, 2004.
- OLIVE, M. F.; et al. Elevated extracellular CRF levels in the bed nucleus of the stria terminalis during ethanol withdrawal and reduction by subsequent ethanol intake. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 72, p. 213–220, 2002.
- OVERSTREET, D. H.; et al. Antidepressant effects of citalopram and CRF receptor antagonist CP-154,526 in a rat model of depression. **Eur. J. Pharmacol.** v. 492, p. 195– 201, 2004.

PANDEY, S.C., et al. Potential Role of the Gene Transcription Factor Cyclic AMP-Responsive Element Binding Protein in Ethanol Withdrawal-Related Anxiety. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.288, p.866-878, 1999.

PANLILIO, L.V.; GOLDBERG, S.R. Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. **Addiction.** v.102, p.1863-1870, 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: The new coronal set - 161 diagrams.** 5^a ed. California: Elsevier Academic Press, 2005.

RASMUSSEN, D. D.; et al. Chronic Daily Ethanol and Withdrawal: 2. Behavioral Changes During Prolonged Abstinence. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 25, n°. 7, 2001.

RICHARDSON, N. R.; ROBERTS, D. C. S. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. **J. Neurosc. Meth.** v .66, p. 1 – 11, 1996.

RIMONDINI, R.; et al. Long-lasting increase in voluntary ethanol consumption and transcriptional regulation in the rat brain after intermittent exposure to alcohol. **FASEB J.** v.16, p.27-35, 2002.

RIMONDINI, R., et al. A Temporal Threshold for Induction of Persistent Alcohol Preference: Behavioral Evidence in a Rat Model of Intermittent Intoxication. **J. Stud. Alcohol.** p. 445-449, 2003.

RISHER, M. L.; et al. Long-Term Effects of Chronic Intermittent Ethanol Exposure in Adolescent and Adult Rats: Radial-Arm Maze Performance and Operant Food Reinforced Responding. **Plos One.**v.8, p. 1-14, 2013.

ROBERTS, D.C.; MORGAN, D.; LIU, Y. How to make a rat addicted to cocaine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.** v.31, p.1614-1624, 2007.

ROYCE, J. E. **Alcohol Problems and Alcoholism - A Comprehensive Survey.** New York Free Press, Royce. p.35; 1981.

RYLKOVA, D.; et al. Deficit in brain reward function and acute and protracted anxiety-like behavior after discontinuation of a chronic alcohol liquid diet in rats. **Psychopharmacol. (Berl).** v. 203 (3), p. 629–64, 2009.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addiction Biology.** v. 11, p. 2–38, 2006.

SANNA, P.P.; et al. ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal. **Brain Res.** v.948, p. 186-191, 2002.

SANTUCCI, A. C.; et al. Chronic ethanol consumption in rats produces residual increases in anxiety 4 months after withdrawal. **Behav. Brain Res.** V. 188, p.24–31, 2008.

SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS. **I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira.** Brasília, DF 2007. Disponível em: <<http://www.senad.gov.br>>. Acesso em: 01 de Junho de 2013.

SERRANO, A., et al. Differential Effects of Single Versus Repeated Alcohol Withdrawal on the Expression of Endocannabinoid System-Related Genes in the Rat Amygdala. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 36, N. 6, p. 984-94, 2011.

SILBERSTEIN, S.; et al. Immunology, Signal Transduction, and Behavior in Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis-related Genetic Mouse Models. **Neuroimmunomodulation: Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1153, p. 120–130, 2009.

SCHUCKIT, Marc A. **Etanol e metanol.** In: Brunton, Laurence L.; Knollman, Björn C., Chabner, Bruce A. Alcohol. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12a Ed. New York :McGraw-Hill Professional, 2012. p.629-644.

SHARKO, A. C.; et al. Individual Differences in Voluntary Ethanol Consumption Lead to Differential Activation of the Central Amygdala in Rats: Relationship to the Anxiolytic and Stimulant Effects of Low Dose Ethanol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 37, n. S1, p E172-E180, 2013.

SHOBLOCK, J. R.; et al. Selective blockade of the orexin-2 receptor attenuates ethanol self-administration, place preference, and reinstatement. **Psychopharmacol.** v. 215, p.191–203, 2011.

SCHULTEIS, G.; et al. Decreased brain reward produced by ethanol withdrawal. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 92, n.13, p. 5880-4, 1995.

SPANAGEL, S. Recent Animal Models of Alcoholism. **Alcohol Res. Health,** v.24, p.124-131, 2000.

SWIFT, R. M.; LEWIS, D. C. **Farmacologia da dependência e abuso de drogas.** In: Golan, David E.; Tashjian Jr., Armen H.; Armstrong, Ehrin J.; Armstrong, April W. Princípio de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia. 2^a Ed. Guanabara Koogan, 2009. P. 263-270.

TOSCANO Jr., A. **Um breve histórico sobre o uso de drogas.** In: S. D. SEIBEL; A. TOSCANO Jr (Ed.). Dependência de drogas.: Ed: Atheneu, 2001.

VALDEZ, G. R.; et al. Antagonism of corticotropin-releasing factor attenuates the enhanced responsiveness to stress observed during protracted ethanol abstinence. **Alcohol.** v.29, p. 55–60, 2003.

VENDRUSCOLO, L. F., et al. Corticosteroid-dependent plasticity mediates compulsive alcohol drinking in rats. **J. Neurosc.** v. 32(22), p. 7563–7571, 2012.

VENGELIENE, V., et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. **Br. J. Pharmacol.** v.154, p.299-315, 2008.

ZORRILLA, E. P.; et al. Changes in levels of regional CRF-like-immunoreactivity and plasma corticosterone during protracted drug withdrawal in dependent rats. **Psychopharmacol. (Berl)**. v.158, n.4: p.374-81, 2001.

ZORRILLA, E. P; et al. Effects of antalarmin, a CRF type 1 receptor antagonist, on anxiety-like behavior and motor activation in the rat. **Brain Res.** v. 952, p. 188–19, 2002.

WILLS T. A.; et al. Interactions of Stress and CRF in Ethanol-Withdrawal Induced Anxiety in Adolescent and Adult Rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 34, n. 9, p. 1603–1612, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical descriptions and diagnostic guidelines.** Disponível em: < http://www.who.int/substance_abuse/terminology/icd_10/en/>. Acesso: 12 de outubro de 2013.