

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

**Envolvimento da substância cinzenta periaquedutal dorsal  
nos efeitos da abstinência de álcool em ratos**

Alicia Cabral

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de concentração: Psicobiologia.

Ribeirão Preto - SP  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**Envolvimento da substância cinzenta periaquedutal dorsal  
nos efeitos da abstinência de álcool em ratos**

Alicia Cabral

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de concentração: Psicobiologia.

Ribeirão Preto - SP  
2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Cabral, Alicia.**

Envolvimento da substância cinzenta periaquedutal dorsal nos efeitos da abstinência de álcool em ratos. Ribeirão Preto – 2007. 130 p.:il.; 30cm.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

1. Medo. 2. Ansiedade. 3. Abstinência de álcool. 4. Álcool. 5. Labirinto em Cruz Elevado. 6. Sobressalto. 7. Inibição pré pulso. 8. Vocalização ultrasônica.

*Dedicatória*

*À minha mãe...*

*Exemplo de tudo que é bom na vida:*

*Amor, cuidado, paciência, humor, conselhos, apoio, companheirismo, positivismo, força, fé,  
ânimo, energia, Luz. As qualidades todas não caberiam aqui.*

*À minha família.*

*Agradecimentos*

*À Deus.  
Agradecimentos especiais àqueles que dividem comigo o dia-a-dia do laboratório.  
Um mais que especial ao Jorge, amigo, professor e orientador.  
Ao professor Marcus Lira Brandão, pelo acolhimento em seu laboratório e pela orientação:  
Exemplos de dedicação à ciência que fazem.  
Ao professor Silvio Morato.  
À Renata, secretária, amiga, confidente.  
À banca examinadora, pelo tempo dedicado a essa tese.  
À Capes, pelo apoio financeiro.*

*Muito obrigada!*

**I. INTRODUÇÃO**

1. DROGAS DE ABUSO.....	01
2. ÁLCOOL ETÍLICO.....	02
2.1. Tolerância.....	03
2.2. Dependência.....	03
2.3. Abstinência.....	06
2.4. Recaída.....	07
3. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA DEPENDÊNCIA DE ÁLCOOL	
3.1. Monoaminas e abstinência de álcool.....	09
3.2. Aminoácidos excitatórios e abstinência de álcool.....	10
3.3. Abstinência de álcool e canais de cálcio.....	10
4. MEDO E ANISIEDADE.....	11
4.1. Reações de defesa.....	13
4.2. Circuitos neurais do medo e da ansiedade.....	15
4.3. Substância cinzenta periaquedutal dorsal.....	16
4.4. Aspectos neuroanatômicos da substância cinzenta periaquedutal dorsal	19
5. MODELOS ANIMAIS UTILIZADOS NESTE ESTUDO	
5.1. Labirinto em cruz elevado.....	20
5.2. Inibição pré-pulso.....	21
5.3. Vocalizações ultra-sônicas.....	24
<b>II. OBJETIVOS</b>	
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3. Metodologia geral	
Animais.....	27
Procedimento para indução da dependência ao álcool.....	27
<b>3.1. Experimento I</b>	
3.1.1. Aparato.....	28
3.1.2. Procedimentos.....	29
3.1.3. Medidas comportamentais .....	29
3.1.4. Análise estatística.....	30

<b>3.2. Experimento II</b>	
3.2.1. Aparatos.....	32
3.2.2. Procedimentos.....	33
3.2.5 Análise estatística.....	33
<b>3.3. Experimento III</b>	
3.3.1. Cirurgia.....	36
3.3.2. Aparatos.....	37
3.3.3. Limiares aversivos.....	38
3.3.4. Procedimentos.....	38
3.3.5. Histologia.....	39
3.3.6 Análise estatística.....	39
<b>IV. RESULTADOS</b>	
4.1. Experimento I - Labirinto em cruz elevado.....	41
4.2. Experimento II - Sobressalto x inibição pré pulso.....	44
4.3. Experimento III - Estimulação elétrica x vocalização ultra-sônica .....	46
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>VI. CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>VII. RESUMO</b> .....	59
<b>VIII. ABSTRACT</b> .....	60
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61
<b>X. ANEXOS</b> .....	83



---

## **INTRODUÇÃO**

## **1. DROGAS DE ABUSO**

A prática de ingerir drogas psicoativas vem de longa data. Atualmente, as farmacodependências afetam indivíduos e sociedades em todo o mundo, tanto nos países desenvolvidos como nos em desenvolvimento, e segundo o Relatório sobre a Saúde no Mundo de 2002, cerca de 9% da carga global das doenças resulta do consumo de substâncias psicoativas (Murray e Lopez, 1996).

O avanço das neurociências nas últimas décadas aumentou a compreensão do mecanismo de ação das substâncias psicoativas, fornecendo novos conhecimentos sobre as razões que levam muitas pessoas a consumir tais substâncias e a fazê-lo de maneira a causar dano a si próprias ou a tornarem-se dependentes.

Também devido ao avanço das neurociências sabe-se hoje que a farmacodependência é um transtorno crônico, com uma base biológica e genética, e não uma simples falta de vontade ou desejo de parar de consumir; e que os tratamentos e intervenções eficazes para as farmacodependências implicam em intervenções tanto farmacológicas como comportamentais (Schmid e Room, 1999).

As drogas de abuso agem de forma diferente sobre o cérebro promovendo diferentes efeitos sobre o comportamento, taxas de desenvolvimento de tolerância, diferentes sintomas de dependência e diferentes efeitos a curto e longo prazo. Contudo, as substâncias psicoativas têm similaridades na maneira pela qual afetam importantes regiões cerebrais ligadas à motivação, e isto é um aspecto relevante em relação às teorias do desenvolvimento da dependência (Wise, 1998).

As substâncias psicoativas podem ser divididas em depressoras do SNC (álcool, sedativos/hipnóticos, solventes voláteis), estimulantes (cocaína, anfetamina, ecstasy), opióides (morfina e heroína) e alucinógenos (LSD, PCP). Sabe-se que, na

busca de prazer ou de alívio imediato da ansiedade, diversos indivíduos tendem a fazer uso de substâncias psicoativas sem finalidades terapêuticas, uma vez que a ansiedade é vivenciada como um estado de profundo desconforto (Graeff, 1990). Essas substâncias, agindo no SNC, aliviam a ansiedade e a dor ou induzem sensações de prazer intenso ou euforia; mas o seu consumo também implica potencial de dano, a curto ou a longo prazo, tornando-se uma via bilateral: prazer *versus* graves prejuízos individuais, principalmente por aqueles que não conseguem controlar a ingestão dessas substâncias (Babor, 2003). Dentre as drogas ansiolíticas, a mais popular é o álcool etílico, ou etanol.

## **2. ÁLCOOL ETÍLICO**

O álcool etílico é a principal droga psicoativa utilizada no mundo, consumido desde os primórdios da civilização. Mesmo as culturas mais primitivas desenvolveram tecnologia necessária para a obtenção do etanol pela fermentação de açúcares contidos nos frutos. O álcool, juntamente com a cocaína e os opiáceos foram as primeiras substâncias de abuso a serem utilizadas (Diana *et al*, 1992). Vários fatores como o fácil acesso à droga, seu alto potencial em gerar dependência e os graves problemas de saúde que o uso excessivo e prolongado pode acarretar é o que determina maior ou menor interesse por determinada droga e suas conseqüências sociais. Além de enquadrar-se em todos esses fatores, o álcool destaca-se entre as drogas de abuso mais consumidas e conseqüentemente que traz problemas sociais de maiores dimensões (Spooner *et al*, 2000).

## **2.1. Tolerância**

Sabe-se que o uso crônico de drogas de abuso gera tolerância e dependência (Koob e Bloom, 1988; Rossetti *et al*, 1992a). A tolerância caracteriza-se pela necessidade do organismo por doses crescentes da substância para obter o mesmo efeito, ou pelo fato da dose habitual produzir menor efeito, após o uso repetido de uma droga.

Igualmente como ocorre com outras drogas, há o desenvolvimento de tolerância após o uso continuado de álcool e a sua descontinuação provoca síndrome de abstinência (Schulteis *et al*, 1995). Em poucos meses desenvolve-se a dependência fisiológica e a interrupção do uso passa a desencadear síndrome de abstinência. Estas alterações resultam na redução de dopamina, aumento da ATPase sináptica dependente de cálcio, atividade serotoninérgica acentuada e colinérgica diminuída. Ainda tem sido atribuído aumento central da adenilciclase e redução da liberação de endorfinas endógenas. O desenvolvimento da tolerância e da dependência fisiológica leva o usuário a buscar uma dose adequada e suficiente para induzir os efeitos da droga, bem como evitar o aparecimento dos sintomas desagradáveis da retirada. Alguns usuários podem decidir enfrentar a síndrome de abstinência para poder voltar a consumir doses menores, quase sempre sem sucesso. A abstinência também ocorre após tratamento de desintoxicação.

## **2.2. Dependência**

A dependência resulta da interação entre um organismo vivo e uma droga e é um transtorno da função cerebral tanto como qualquer doença neurológica ou psiquiátrica (LeDuc e Mittleman, 1995), só que ocasionado pelo consumo de substâncias psicoativas. Depois da ingestão aguda ou crônica de substâncias e da

dependência instalada, certas regiões do SNC também funcionam de maneira anormal (Rosenzweig *et al*, 1999) e, assim como os distúrbios mentais, afetam os processos normais da senso-percepção, das emoções e da motivação (Rosenzweig *et al*, 1999).

Uma outra definição admite que a dependência pode ser definida como um estado de intoxicação periódico ou crônico, causado pelo uso repetido de uma droga, e que inclui em suas características: (1) desejo compulsivo de ingerir a droga e necessidade de obtê-la a qualquer custo, (2) tendência a aumentar a dose ou tolerância, (3) aparecimento de dependência psíquica e física aos seus efeitos e (4) crise de abstinência quando há privações da mesma (American Psychiatric Association, 2000).

Um indivíduo, ao iniciar o uso de uma substância psicoativa, pode experimentar um prazer incomum que tende a anular prazeres normais e, assim, repetir a situação reforçadora. Conforme mantém o uso, o cérebro aprende a exigir maiores descargas dos neurotransmissores dopaminérgicos, descompensando com isso o equilíbrio do sistema. As regiões mais antigas do cérebro fazem com que o córtex trabalhe apenas no sentido de obter o reforço (droga), o que deixa de ser um sistema orgânico bem integrado.

O processo pelo qual o consumo de certas substâncias evolui para padrões de comportamento compulsivo de procura e consumo, a incapacidade de parar com tal consumo e a recaída, parece residir em uma ação combinada e complexa de fatores psicológicos, neurológicos e sociais.

Esse desejo incontrolável caracteriza-se pelo 'craving' ou fissura, ou seja, a ativação de regiões específicas do prosencéfalo por estímulos que induzem na pessoa dependente uma compulsão, uma necessidade incontrolável de consumir a

droga para experimentar seu efeito psíquico e, às vezes, evitar o desconforto provocado por sua ausência (Pinel, 1990).

O consumo de drogas psicoativas leva o organismo a atuar por retroalimentações positivas, devido a hiperfunção do sistema de recompensa cerebral. A síndrome de abstinência e o craving são algumas das conseqüências dessas alterações. Estudos têm relacionado o craving com alterações em neurotransmissores como a depleção de dopamina, alterações do nível de serotonina (Satel *et al*, 1995; Little *et al*, 1996) e alterações no sistema límbico e lobo frontal (Childress *et al*, 1999; Jacobsen *et al*, 1999).

Em relação à dependência de álcool, devem-se destacar fatores como a hereditariedade, a freqüência e a quantidade de droga consumida (Prescott e Kendler, 1999; Enoch *et al*, 2001). Os genes que podem ser importantes nesta associação estão implicados no metabolismo do álcool e com os receptores de neurotransmissores GABAérgicos (Long *et al*, 1998), serotoninérgicos (Lappalainen *et al*, 1998) e dopaminérgicos (Long *et al*, 1998). Também foram identificadas alterações genéticas em enzimas metabolizadoras do álcool como causas possíveis do uso ou consumo abusivo de álcool (Agarwal, 2001; Ramchandani *et al*, 2001).

Tal como definido pela American Psychiatric Association (2000), a dependência de substâncias inclui seis critérios (Tabela 1). O indivíduo que se enquadre em pelo menos três deles, é diagnosticado como dependente.

**Tabela 1.** Critérios de dependência de substância psicoativas.

<b>Presença de três ou mais dos seguintes sintomas em qualquer momento durante o ano anterior:</b>
1. Um desejo forte ou compulsivo para consumir a substância;
2. Dificuldades para controlar o comportamento de consumo da substância em termos de

início, fim ou níveis de consumo;
3. Estado de abstinência fisiológica quando o consumo é suspenso ou reduzido, evidenciado por síndrome de abstinência característica, ou o consumo da mesma substância (ou outra muito parecida) com a intenção de aliviar ou evitar sintomas de abstinência;
4. Evidência de tolerância, definida como a necessidade de doses crescentes da substância psicoativa para se obter os efeitos anteriormente produzidos com doses inferiores;
5. Abandono progressivo de outros prazeres ou interesses devido ao consumo de substâncias psicoativas;
6. Aumento do tempo empregado em conseguir ou consumir a substância ou recuperar-se de seus efeitos;
7. Persistência no consumo de substâncias apesar de provas evidentes de conseqüências manifestamente prejudiciais, tais como lesões hepáticas causadas por consumo excessivo de álcool, humor deprimido conseqüente a um grande consumo de substâncias, ou perturbação das funções cognitivas relacionadas com a substância. Devem ser feitos esforços para determinar se o consumidor estava realmente, ou poderia estar, consciente da natureza do dano.

### 2.3. Abstinência

Após o consumo excessivo da maioria das substâncias psicoativas, sempre que o indivíduo diminuir ou se abster completamente da droga, ele pode apresentar um conjunto de sintomas denominados SA (síndrome de abstinência) (WHO, 1992; Drake e Wallach, 1993). Alguns sintomas como tremores, inquietude e hiperatividade são típicos. Entretanto, há muitos outros sinais físicos e psicológicos (Tabakoff *et al*, 1977; Tabakoff e Hoffman, 1977).

O aparecimento da SA, concomitante à interrupção súbita do tratamento com uma droga de abuso, reflete a adaptação do organismo à presença continuada da droga de tal forma que sua retirada desencadeia distúrbios fisiológicos, sensoriais e, principalmente afetivos acentuados, cujo sentido é geralmente oposto aos efeitos farmacológicos da droga (Koob e Le Moal, 2001; Koob, 2003). De fato, muitos trabalhos demonstraram que um dos principais sintomas presentes durante a

abstinência de diversos tipos de drogas de abuso é um alto nível de ansiedade (Koob e Le Moal, 1997; Koob e Nestler, 1997; Markou *et al*, 1998; Koob, 2000). Esse tipo de ansiedade pode incluir uma gama de sintomas que oscilam desde sintomas psicológicos como agitação, apreensão, alterações de humor (irritabilidade, disforia) e insônia, até outros eminentemente somáticos como palpitações, tremores, espasmos musculares, distúrbios gastrointestinais e outros como náuseas, vômitos, taquicardia, hipertensão arterial (Koob e Le Moal, 2006). Também ocorrem complicações como alucinações, *delirium tremens* e convulsões. O *delirium tremens* é caracterizado por grande agitação psicomotora e tremores, confusão mental e alucinações visuais.

Em relação ao álcool, uma série de outros fatores como a vulnerabilidade genética, o gênero e o padrão de consumo de álcool, as características individuais biológicas e psicológicas e os fatores sócio-culturais também influenciam o aparecimento e a evolução da síndrome de abstinência, assim como ocorre na dependência (Johnson *et al*, 1998). Os sintomas e sinais variam também quanto à intensidade e à gravidade, podendo aparecer após uma redução parcial ou total da dose comumente utilizada, voluntária ou não – como, por exemplo, em indivíduos que são hospitalizados para tratamento clínico ou cirúrgico.

#### **2.4. Recaída**

Durante a dependência, o indivíduo é submetido a uma sensação de bem-estar e redução da ansiedade após o consumo (Rossetti *et al*, 1992a). Quando privado da droga, o indivíduo abstinente apresenta crises subjetivas de necessidade da substância e este comportamento se acentua pouco antes da dose subsequente, aumentando no espaço entre 36 a 72 horas após a última dose, ponto em que os



sintomas de abstinência se tornam máximos – variando de acordo com a droga utilizada. Após isso, há uma diminuição gradativa da crise, passando a sentir-se fraco e deprimido.

Sem dúvida, um dos problemas mais relevantes no tratamento da conduta dependente é a recaída, o que tem levado ao desenvolvimento de técnicas de prevenção no tratamento de abuso de drogas (Marlatt *et al*, 1988). A recaída resulta no retorno ao uso da droga aos mesmos níveis antes da intervenção terapêutica ou abstinência e, normalmente ocorre quando o indivíduo se expõe a situações nas quais tradicionalmente consumiu a droga (Marlatt *et al*, 1993). Assim poderia se explicar, em parte, a alta taxa de recaídas. Por outro lado, existe a evidência de que a extinção é altamente específica ao contexto com o qual o indivíduo conviveu durante o consumo da droga. Então, os sujeitos que estão sob tratamento da adição (como desintoxicação ou contracondicionamento) se limitam somente àqueles eventos presentes no tratamento; as dicas contextuais não expostas terão plena capacidade de eliciar a resposta de tolerância (sintomas de abstinência). Isto explicaria, em parte, a alta taxa de recaídas.

Até seis meses após a retirada da droga (privação aguda), o dependente manifesta síndrome de abstinência importante em alta incidência de recaída, comum em um ex-dependente (Tabakoff, 1983). Pacientes que permanecem abstêmios por mais de 6 meses, demonstram menor taxa de recaída, com variações dependendo das características genéticas e ambientais em que o indivíduo está inserido (Johnson *et al*, 1998). A gravidade da síndrome de abstinência também é proporcional ao número de doses diárias e do tipo de droga.

Os hipno-analgésicos ou narcóticos (morfina, heroína e derivados), assim como o *crack* (carbonato de cocaína) produzem sinais de abstinência mais graves

após a sua retirada por serem de ação curta, proporcionando crise de abstinência em poucas horas após o consumo. O início da privação ocorre após 8 a 12 horas de abstinência. O pico dos sintomas evolui após 48 a 72 horas, tendo fim em 7 a 10 dias. Algumas vezes são fatais, levando o dependente à morte (Diana *et al*, 1992).

### **3. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA ABSTINÊNCIA DE ÁLCOOL**

#### **3.1. Monoaminas e abstinência de álcool**

Os sintomas e sinais da SA de álcool estão relacionados à alteração nos níveis de liberação de noradrenalina (NA) e dopamina (DA). A hiperestimulação adrenérgica, que pode ser intensa nesta condição, deve-se a uma redução da atividade de adrenoreceptores inibitórios pré-sinápticos do subtipo  $\alpha_2$ , um fenômeno conhecido como *down-regulation* (Nutt *et al*, 1988).

A hiperatividade de receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) também está relacionada ao aumento da liberação noradrenérgica no *locus ceruleus* de ratos, observada após a retirada do álcool (Diana *et al*, 1992; Engberg e Hajos, 1992; Rossetti *et al*, 1992b). Alguns trabalhos demonstram que a liberação de DA, durante a SA de álcool, apresenta níveis inferiores aos observados no período anterior à exposição crônica ao álcool, por cessação do disparo dopaminérgico na área tegmental ventral (Diana *et al*, 1992; Rossetti *et al*, 1992b). Esses efeitos são responsáveis por um grande número de reações fisiológicas, tais como taquicardia por ativação de receptores beta-adrenérgicos, hipertensão por ativação de vias alfa-adrenérgicas, aumento da força de contração do músculo cardíaco por ação adrenérgica inotrópica positiva, náuseas e vômitos devido à redução do esvaziamento gástrico, piloereção, midríase, tremores pela facilitação da

neurotransmissão muscular, aumento do consumo de oxigênio e aumento da temperatura corporal em até 2°C (Major *et al*, 1984; DePetrillo e McDonough, 1999).

### **3.2. Aminoácidos excitatórios e abstinência de álcool**

O etanol atua como um antagonista dos receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), um receptor do tipo excitatório do SNC (Carboni *et al*, 1990). O consumo crônico de bebidas alcoólicas provoca um aumento da densidade desses receptores (Rossetti e Carboni, 1995). Estudos em animais têm demonstrado que esse aumento persiste por cerca de 36 horas após a retirada do etanol, período que coincide com o aparecimento das crises convulsivas, fenômeno neurotóxico relacionado a hiperatividade glutamatérgica.

Na SA de etanol há uma hipoatividade GABAérgica. Os receptores GABA<sub>A</sub>, como se sabe, têm atividade inibitória. À medida que deixam de exercer sua atividade durante a SA de álcool, há uma estimulação do SNC. Essa hipoatividade é funcional, uma vez que, diferentemente do que ocorre com os receptores NMDA, não há evidências de alteração no número de receptores GABA<sub>A</sub> durante a exposição crônica ao álcool (Morrow *et al*, 1990; Devaud *et al*, 1997). Há também uma redução da densidade de RNAm relacionada ao local de ação dos benzodiazepínicos e do etanol.

### **3.3. Abstinência de álcool e canais de cálcio**

Com a exposição crônica ao etanol, há uma alteração nos canais de cálcio do tipo L, um dos canais de cálcio mais conhecidos. A ação do cálcio nos terminais nervosos é fundamental para a liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica. Diversos estudos têm demonstrado que a administração crônica de etanol leva a

uma redução na atividade dos canais de cálcio do tipo L, reduzindo a atividade elétrica dentro do neurônio e, assim, reduzindo a ação de neurotransmissores (Lovinger, 1997).

As alterações na neurotransmissão e os sintomas correspondentes a cada neurotransmissor envolvido na SA de etanol estão representados no esquema abaixo.



Bases biológicas dos sinais e sintomas da síndrome de abstinência de álcool.

#### 4. MEDO E ANSIEDADE

A ansiedade pode ser entendida como um estado emocional resultante de sentimentos de apreensão, incerteza e medo, freqüentemente experimentados pela espécie humana e por outros mamíferos (Darwin, 1872). Pelo menos no homem, sabemos que estas respostas vêm acompanhadas de uma experiência extremamente desagradável (Graeff, 1989). Quando um animal é confrontado com uma ameaça à sua integridade física ou à própria sobrevivência, seja esta representada por um predador, um agressor da mesma espécie, uma pista

ambiental (um estímulo que o advirta da ocorrência de um dano iminente), ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo (Graeff, 1989).

Apesar do aspecto desagradável da ansiedade, quando manifestada em níveis adequados e normais, este estado envolve a ativação e a mobilização do organismo, cumprindo um papel funcional na interação do indivíduo com o meio ambiente, ajustando e até otimizando seus recursos frente a diversas exigências ambientais. Neste contexto, a ansiedade é vista como um estado emocional de importante significado adaptativo e evolutivo, vivenciado subjetivamente como não prazeroso ou ameaçador (Graeff *et al*, 1997; Brandão *et al*, 1999). A ansiedade é também vista como um estado emocional desagradável com as qualidades subjetivas do medo, apreensão, temor e sentimentos correlatos, mas necessário para motivar um bom desempenho do organismo (Graeff *et al*, 1993). No entanto, quando a ansiedade se torna excessiva e prejudica o desempenho do indivíduo, passa a ser considerada patológica (Graeff, 1989).

As respostas comportamentais de medo são acompanhadas de intensas alterações neurovegetativas e hormonais, diversas manifestações do estresse, insegurança e um conjunto de alterações comportamentais e psicológicas, como sintomas de cunho psicológico, tais como hipervigilância, dificuldades de concentração, de conciliação do sono e sentimentos de apreensão e angústia. Podem aparecer, conjuntamente, algumas manifestações somáticas, tais como dor precordial, dificuldade de respiração, tremor, aumento da sudorese, taquicardia, hiperventilação, aumento da tensão muscular, inquietude e alerta (Nutt, 1990). Durante o congelamento, por exemplo, ocorrem tremores musculares,

irregularidades dos movimentos respiratórios, bater de dentes, piloereção, micção, defecação e exoftalmia (Nutt, 1990).

A ansiedade e o medo estão intimamente relacionados. No âmbito evolutivo, ambos constituem reações naturais que ocorrem sempre diante de uma situação potencial de perigo para o organismo. De modo geral, a diferenciação mais utilizada entre estes dois tipos de emoções admite que a ansiedade nada mais é do que um medo sem objeto, diferenciando-se deste pela ausência de um estímulo externo diretamente perceptível (LeDoux, 1996). Em circunstâncias onde o perigo é apenas potencial, porém vago e persistente, ou os sinais de advertência que provocam o medo não são conscientemente percebidos, tem-se a ansiedade. Frente a uma ameaça ao seu bem-estar, à sua integridade física ou à própria sobrevivência, o animal exibe um conjunto de respostas comportamentais e neuro-vegetativas que caracterizam a reação de medo. Contudo, as alterações psicofisiológicas que compõe a ansiedade são similares às do medo, podendo-se admitir a identidade básica dos mecanismos neurais que integram ambos os estados emocionais (LeDoux, 1996).

O medo ou a ansiedade ocorrem também em situações de conflito, em que um mesmo comportamento é simultaneamente recompensado e punido, ou em situações novas ou desconhecidas, inibindo o comportamento exploratório motivado pela curiosidade.

#### **4.1. Reações de defesa**

Apesar das variações existentes entre os padrões de comportamento defensivo, certas estratégias básicas são empregadas pelas diferentes espécies. Em um ambiente novo, potencialmente perigoso, ou quando presente uma ameaça

porém não avaliou ainda todas as conseqüências, o animal fica imóvel e quieto, com a musculatura tensa, vigilante e de prontidão para uma ação rápida e vigorosa. Esta reação de defesa é o que chamamos de congelamento. Alternando com a imobilidade, o animal pode ainda realizar uma exploração cautelosa do ambiente, fazendo uma avaliação de risco. Uma vez definido o perigo, o animal recorre à fuga da situação ameaçadora ou, alternativamente, luta contra o agressor.

Por outro lado, a luta ou a fuga são precedidas e acompanhadas de alterações cardiovasculares e respiratórias que dão o suporte autonômico necessário ao intenso desempenho muscular: aumento da freqüência cardíaca, elevação da pressão sangüínea arterial e da ventilação pulmonar e aumento da irrigação dos músculos esqueléticos - enquanto se diminui o fluxo sangüíneo cutâneo e visceral (Brandão *et al*, 1994, 1999, 2005).

As alterações neurovegetativas que acompanham o medo e a ansiedade não são importantes apenas do ponto de vista fisiológico e comportamental. Admite-se que a inibição dessas respostas por drogas bloqueadoras autonômicas possa atenuar a ansiedade. Este seria o principal mecanismo de ação do propranolol e outros bloqueadores beta-adrenoceptores, que podem aliviar estados de ansiedade em indivíduos com manifestações neurovegetativas particularmente intensas (Audi *et al*, 1991).

Muito do conhecimento a respeito dos substratos neuroanatômicos da ansiedade tem sido obtido através de observações experimentais, utilizando-se de modelos animais desenvolvidos para tal propósito (Graeff, 1990).

Uma crescente quantidade de evidências tem demonstrado que a ativação de algumas estruturas mesencefálicas, particularmente a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), estrutura central do chamado sistema cerebral

aversivo, produz comportamentos e respostas somáticas características de estado aversivo acentuado, similar ao ataque de pânico (Brandão *et al*, 1999; Vianna *et al*, 2001b), e comumente observado em animais confrontados com um predador ou com um perigo ambiental imediato (Graeff, 1990; Brandão *et al*, 1999; Graeff, 2004). Enquanto os efeitos da abstinência de álcool sobre a ansiedade tem sido muito investigados (Kliethermes, 2005), pouco tem sido feito no sentido de estudar a participação dos substratos neurais da reação de defesa na SCPd durante esta condição.

#### **4.2. Circuitos neurais do medo e da ansiedade**

Diversos trabalhos, incluindo os experimentos clássicos com estimulação elétrica de estruturas do sistema nervoso central, demonstraram que a amígdala no prosencéfalo, o hipotálamo medial no diencéfalo, os colículos superiores e inferiores e a SCPd no mesencéfalo, constituem o principal substrato neural responsável pela elaboração das respostas a estímulos aversivos ou situações de perigo (Hunsperger, 1956; Olds e Olds, 1963; Graeff, 1990). A estimulação elétrica ou química dessas áreas resulta numa série de alterações neurovegetativas semelhantes às aquelas evocadas quando o animal, em seu hábitat natural, é confrontado com estímulos aversivos: hiperventilação, aumento da frequência de batimentos cardíacos, aumento da pressão arterial e aumento da irrigação muscular, acompanhada de diminuição da irrigação visceral e cutânea. Inseridas num contexto de ansiedade, estas respostas relacionam-se à expressão de estados emocionais aversivos e de certa forma preparam o animal para respostas comportamentais de luta e fuga. Nesse sentido, Graeff (1981) propôs a existência de um sistema anátomo-funcional, o qual denominou *Sistema Encefálico Aversivo* (SEA), formado



basicamente por essas estruturas, e que atuaria na geração e elaboração de respostas a estímulos que produzem medo. Posteriormente, o mesmo autor sugeriu que a substância cinzenta periaquedutal (SCP) que circunda o terceiro ventrículo e o aqueduto, por suas conexões características através do eixo rostro-caudal, parece não apenas coordenar a expressão desse estado emocional, mas também ser responsável por suas propriedades motivacionais ou aversivas (Graeff, 1994).

A substância cinzenta periaquedutal é uma estrutura proeminente, possuindo um tamanho relativo de cerca de 10% do mesencéfalo do encéfalo de mamíferos como o homem, o gato e o rato. Sua localização, entre o romboencéfalo e o diencéfalo, lhe proporciona uma posição privilegiada para influenciar e participar dos diversos sistemas ascendentes e descendentes. É uma das partes do encéfalo que menos sofreu mudanças no curso evolutivo sugerindo que ela esteja envolvida em importantes funções de proteção ou regulação homeostática que requerem essa aparente estabilidade (Beitz, 1982; Carrive, 1993). Foi demonstrado que a estimulação elétrica do teto mesencefálico do homem produz o mesmo padrão de respostas somáticas e afetivas observado em animais, suportando a idéia de que esta estrutura participaria ativamente na expressão do medo (Nashold *et al*, 1969).

#### **4.3. Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP)**

Durante os últimos trinta anos tem sido observado o desenvolvimento de duas grandes linhas de pesquisa sobre as funções da SCP, as quais, apesar de serem conduzidas independentemente, acumulam resultados que pressupõe uma total inter-relação entre elas. A primeira dessas linhas investiga o papel da SCP na mediação dos processos nociceptivos e a outra estuda o envolvimento dessa

estrutura na integração das respostas comportamentais aos estímulos ameaçadores e/ou estressantes (Bandler *et al*, 1991; Behbehani, 1995).

Trabalhos utilizando a técnica da estimulação elétrica cerebral mostram que a estimulação da SCPd é capaz de eliciar comportamento de defesa em ratos, gatos e macacos (Delgado, 1955; Fernandez e Hunsperger, 1959; Schmitt e Karli, 1980). Dados mais recentes sugerem que a estimulação elétrica da SCPd não apenas elicia comportamento de defesa como também induz analgesia nos limiares elétricos que induzem comportamentos aversivos de congelamento e fuga (Coimbra *et al*, 1992).

DeMolina e Hunsperger (1959) demonstraram que lesões na SCPd provocam um prejuízo crônico nos padrões das respostas evocadas por ameaças ambientais ou por estimulação elétrica no hipotálamo medial ou amígdala. Por outro lado, a destruição do hipotálamo medial ou amígdala não afeta a reação de defesa eliciada pela estimulação elétrica da SCPd. Foi demonstrado que ratos descerebrados, porém com o mesencéfalo intacto, continuam capazes de coordenar comportamentos defensivos (Woods, 1964).

Trabalhos com paradigmas de aprendizagem mostram que a estimulação elétrica da SCPd e regiões do teto mesencefálico juntamente com o hipotálamo medial levam animais a aprenderem uma tarefa para esquivar-se da estimulação elétrica nessas estruturas (Delgado *et al*, 1954; Delgado, 1955; Olds e Olds, 1962; Olds, 1963). Outra importante fonte de dados sobre o papel funcional da porção dorsal da SCP nas respostas defensivas é aquela oferecida pelos trabalhos de Graeff e colaboradores (Schenberg e Graeff, 1978; Graeff, 1990; Nogueira e Graeff, 1991; Deakin e Graeff, 1991; Graeff, 1993) e Brandão e colaboradores (Cardoso *et al*, 1994; Brandão *et al*, 1999; Brandão *et al*, 2003). Diversos trabalhos de ambos os

grupos têm demonstrado que a SCPd está envolvida nas respostas típicas de fuga caracterizadas por corridas e saltos causados por estimulação elétrica ou químicas diretamente dessa região.

As respostas de defesa expressadas pelos diferentes organismos, particularmente os mamíferos, estão organizadas dentro de um padrão hierárquico específico que varia desde estados de alerta e congelamento, até a fuga (Blanchard e Blanchard, 1988). As respostas comportamentais eliciadas por estimulação elétrica da SCP (Brandão *et al*, 1982; Brandão *et al*, 1994; Brandão *et al*, 1999; Castilho e Brandão, 2001) partilham muitas das características observadas na reação de defesa induzida pela estimulação de outras estruturas pertencentes ao SEA, tais como a amígdala, colículo inferior, camadas profundas do colículo superior, e hipotálamo medial (Cardoso *et al*, 1994; Brandão *et al*, 1999; Nobre *et al*, 2002; Nobre *et al*, 2003; Brandão *et al*, 2003; Oliveira *et al*, 2004; Brandão *et al*, 2005). Em geral, essas respostas são acompanhadas também de alterações autonômicas, mudanças na pressão arterial, frequência de batimento cardíaco e respiração que vão dar o suporte necessário ao organismo para uma possível fuga ou confronto direto em uma situação de ameaça (Schmitt *et al*, 1986; Leão-Borges *et al*, 1988; Brandão *et al*, 1999; Andreatini *et al*, 2001; Vianna *et al*, 2001a; Brandão *et al*, 2003).

A estimulação elétrica da SCP tem sido proposta como um dos melhores modelos de ataque do pânico (Graeff, 1990; Lovick, 2001). De acordo com este modelo, um aumento gradual na intensidade da corrente elétrica para estimular a SCP produz alerta, congelamento e respostas tipo pânico, como a corrida e o salto (Schenberg *et al*, 2001). Já como modelo animal de ansiedade, tem sido amplamente utilizado a resposta de congelamento ao contexto previamente

associado com choque elétrico nas patas. Lesões na amígdala ou na SCP ventral interrompem essa resposta condicionada, enquanto a estimulação dessas estruturas induz comportamento de congelamento bem definido (Graeff, 1990; LeDoux, 2000).

Dessa forma, o condicionamento do medo contextual e a estimulação elétrica da SCP podem ser utilizados como modelos animais com o objetivo de investigar a relação entre ansiedade e ataques de pânico. Esta é uma questão extremamente interessante uma vez que estudos que empregam experimentos com humanos apresentam resultados altamente conflitantes. Há evidências sugerindo que a ansiedade pode preceder e precipitar a ocorrência do ataque do pânico (Bouton *et al*, 2001). Por exemplo, pacientes com esse transtorno relatam que a maioria dos ataques do pânico foi precedida e ocorreu sempre depois de alcançado um platô de ansiedade (Basoglu, 1992).

#### **4.4. Aspectos neuroanatômicos da SCP**

As diversas projeções ascendentes e descendentes que convergem na SCP sugerem que essa estrutura está interligada a um grande número de redes neuronais que coordenam estratégias distintas para enfrentar diferentes tipos de ameaças, estímulos dolorosos e/ou estressantes. A SCP recebe aferências diretas da medula espinhal e núcleo trigeminal, o que implica num papel funcional no processo de estímulos somato-sensoriais, provavelmente de natureza nociceptiva (Mantyh, 1982a; Mantyh, 1982b; Mantyh, 1982c). Também recebe aferências de outras estruturas relacionadas do tronco cerebral, como as camadas profundas do colículo superior, o núcleo mediano da rafe e a formação reticular ascendente (Beitz, 1982; Mantyh, 1982a; Mantyh, 1982b; Mantyh, 1982c). Por outro lado, a SCP também está conectada a uma série de estruturas prosencefálicas que estão

relacionadas aos estados emocionais, como o córtex límbico, a amígdala, o núcleo do leito da estria terminal e o hipotálamo (Graeff, 1990; Rizvi *et al*, 1991). Essas conexões sugerem que a SCP cumpre um papel de relê na expressão de estados emocionais (Bandler e Carrive, 1988; Depaulis *et al*, 1992), sustentando uma mediação entre as funções de estruturas subcorticais e estruturas prosencefálicas.

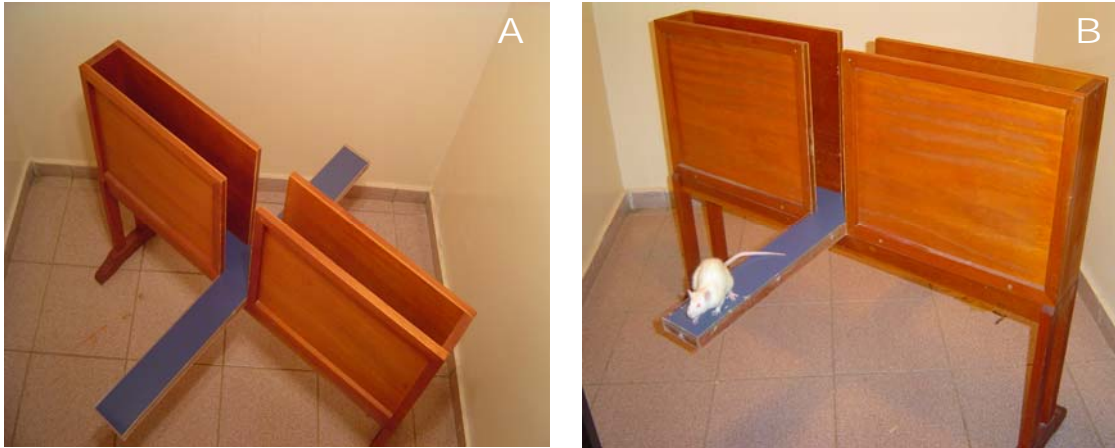
O labirinto em cruz elevado, o sobressalto a um estímulo acústico intenso, o procedimento de estimulação elétrica da SCPd e a medida de vocalizações ultrassônicas são os modelos animais de ansiedade mais usados neste laboratório, tanto para avaliar a ação ansiolítica de drogas, efeitos de manipulações da estrutura social dos animais, como os efeitos de inativação ou estimulação de estruturas do SNC sobre o funcionamento dos circuitos neurais de medo.

## **5. MODELOS ANIMAIS UTILIZADOS NESTE ESTUDO**

### **5.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)**

O LCE foi validado farmacológica, fisiológica e comportamentalmente como modelo animal de ansiedade por Pellow e colaboradores (1985), quando demonstraram que a exposição aos braços abertos do labirinto produzia comportamentos relacionados à ansiedade. Composto por dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços fechados elevados a cinquenta centímetros do piso, o LCE é um equipamento que pode ser utilizado para o estudo da ansiedade, aprendizagem e memória em ratos. Possui a vantagem do conflito ser gerado entre a exploração de um novo ambiente e a esquiva de áreas abertas, que podem levar tanto ao impulso de exploração como ao impulso de medo gerando assim, conflito de aproximação-avoidância. Além disso, baseia-se na exploração natural do animal, sem a utilização de estímulos aversivos ou dolorosos

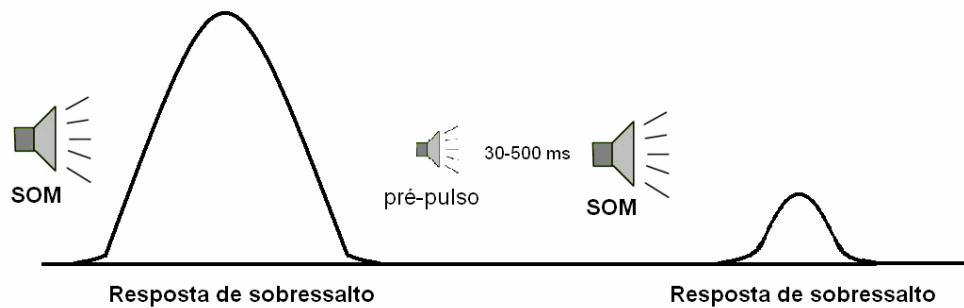
(Montgomery e Monkman, 1955) ou treinos prolongados. Os aspectos dos braços abertos que levam o animal a passar pela experiência da situação de conflito são a aversão inata do animal a lugares abertos e iluminados, à altura e à impossibilidade do animal realizar a tigmotaxia (Treit *et al*, 1993).



(A) Fotografia do labirinto em cruz elevado, equipamento utilizado para avaliação dos índices de ansiedade dos animais controle e abstinentes de álcool. (B) Exploração pelo animal em um dos braços abertos do equipamento.

## 5.2. Inibição pré-pulso

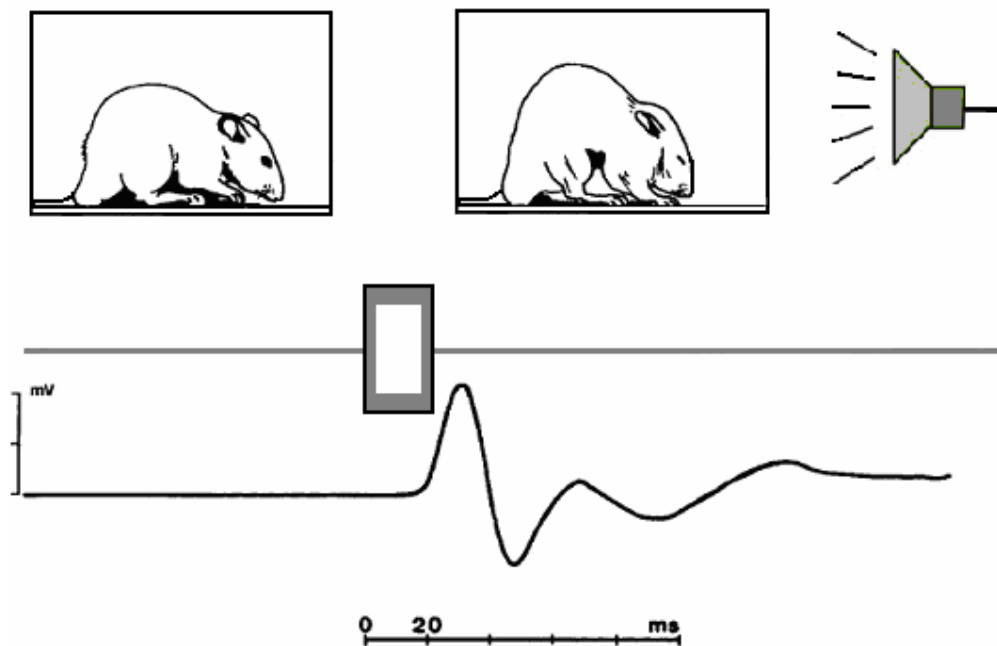
A apresentação de um estímulo sonoro de pequena intensidade, alguns milissegundos antes de um estímulo acústico intenso, reduz a resposta de sobressalto a ele associada. Esta condição conhecida como inibição pré-pulso tem sido utilizada como modelo animal de atenção (Hoffman e Ison, 1980; Kock, 1999). Como diversos distúrbios mentais causam um prejuízo da atenção – que são medidos por déficits na inibição pré-pulso, este modelo tem sido útil no estudo do funcionamento dos processos sensoriais alterados em distúrbios mentais como a esquizofrenia e o abuso de drogas.



Esquema representativo dos efeitos da apresentação de um pré-pulso (som de baixa intensidade) sobre a resposta de sobressalto induzida por um estímulo acústico.

O reflexo de sobressalto (RS) é uma rápida contração da musculatura esquelética a um estímulo sensorial súbito e intenso (Davis, 1993). Em humanos, a “via de sobressalto” consiste em uma propulsão da cabeça para frente e de uma reação de flexão descendente, estendendo-se pelo tronco e joelhos (Grillon, 2002).

A amplitude e a latência do RS pode ser mensurada registrando-se o reflexo do piscar dos olhos (Grillon, 2002). Em animais, o sobressalto é mensurado através do reflexo do corpo. Acompanhando a atividade motora caracterizada pelo sobressalto, há uma supressão do comportamento em curso e um aumento da frequência cardíaca (Koch, 1999). A duração do RS é um período curto, aproximadamente 200ms, antes que movimentos evasivos possam ocorrer (Frankland e Yeomans, 1995).



Esquema representativo da resposta de sobressalto induzida. A apresentação de um estímulo sonoro de alta intensidade produz, 30 ms após, uma resposta de sobressalto. Adaptado de Koch (1999).

Constituindo-se na preparação para a resposta de luta ou fuga do animal, o RS sugere uma função adaptativa de proteção contra injúrias provenientes de um predador. Ao promover a contração de todos os músculos do corpo, especialmente os dorsais do pescoço, se reduz a exposição dessa área bastante vulnerável e alvo freqüentemente preferencial de predadores, e também a danos em potencial resultante de um ataque pelas costas. O RS constitui-se, portanto, em uma resposta protetora difusa, encontrada em todas as espécies de mamíferos estudadas (Koch, 1999).

A amplitude da resposta de sobressalto pode ser modulada por diversas variáveis como intervalo entre estímulos (Davis, 1970), diferenças genéticas (Glowa e Hansen, 1994), variabilidade entre sujeitos (Plappert *et al*, 1993), ambiente



acústico, como ruídos de fundo (Hoffman e Fleshler, 1963), iluminação (Walker e Davis, 1997) e por drogas (Davis *et al*, 1980). A inibição pré-pulso serve, portanto, como uma ferramenta comportamental importante para a investigação de mecanismos de plasticidade sensório-motora. Também, os resultados obtidos em estudos com animais têm sido generalizados para humanos, o que implica que mecanismos neurais subjacentes à inibição pré-pulso, e suas formas de plasticidade em ratos podem auxiliar na compreensão da integração sensório-motora em humanos (Koch, 1999).

Animais que têm preferência ao álcool respondem mais ao sobressalto sozinho e ao sobressalto potencializado pelo medo condicionado (McKinzie *et al*, 2000). Ratos adictos exibem reação de medo excessivo em modelos de medo condicionado (Rorick *et al*, 2003). Quando expostos a várias experiências de abstinências, uma quantidade moderada de álcool leva à sensibilização de comportamentos relacionados à ansiedade (Overstreet, 2002).

### **5.3. Vocalizações ultra-sônicas (VUS)**

É sabido que a detecção e a emissão de sinais na frequência de ultra-som podem estar associada à sinalização de situações ameaçadoras ou a produção de estados aversivos (Sales e Pye, 1974; Oswald e Meier, 1975; Amsel *et al*, 1977; Hofer e Shair, 1978; Lyons e Banks, 1982; Takahashi *et al*, 1983; Cuomo *et al*, 1988; Kaltwasser, 1991; Blanchard *et al*, 1991; Brudzynski e Ociepa, 1992) assim como a situações de recompensa social e encontros sexuais (Oswald e Meier, 1975; Conely e Bell, 1978; Hofer e Shair, 1978; Anisko *et al*, 1978; Hennessy *et al*, 1980).

O registro de VUS tem sido considerado uma medida segura da resposta de medo, eliciada por estímulos aversivos em animais de laboratório (Blanchard *et al*,

1991; Blanchard *et al*, 1993; Vivian *et al*, 1994; Brudzynski e Barnabi, 1996; Beckett *et al*, 1996; Commissaris *et al*, 1998; Commissaris *et al*, 2000).

Diante disso, diversos experimentos têm demonstrado que experiências aversivas evocam predominantemente vocalizações com frequência de aproximadamente 22 kHz (Tonoue *et al*, 1986; Cuomo *et al*, 1988; Blanchard *et al*, 1991). Ratos adultos emitem VUS na faixa de frequência de 22 kHz diante de situações estressantes ou potencialmente perigosas como, por exemplo, diante de um predador (Cuomo *et al*, 1988; Kaltwasser, 1991; Blanchard *et al*, 1991; Brudzynski e Ociepa, 1992; Blanchard *et al*, 1993). Diversos outros experimentos demonstraram o vínculo existente entre VUS e estados aversivos. Ansel e colaboradores (1977) mostraram que a emissão de ultra-sons por ratos recém-nascidos, como resultado de ausência de recompensa em experimentos de aprendizagem e extinção, pode ser um indicativo de estado aversivo. Takahashi e colaboradores (1983) analisaram a emissão de ultra-som por ratos residentes durante encontros agressivos. Outros experimentos demonstraram que as VUS podem ser inibidas pela administração de benzodiazepínicos e opióides (Insel *et al*, 1986; Cuomo *et al*, 1988; Kaltwasser, 1991; Vivian *et al*, 1994; Goodwin *et al*, 1994; Jourdan *et al*, 1998).

Animais que apresentam preferência ao álcool respondem mais ao sobressalto sozinho e ao sobressalto potencializado pelo medo condicionado (McKinzie *et al*, 2000). Ratos adictos exibem reação de medo excessivo em modelos de medo condicionado (Rorick *et al*, 2003). E, quando expostos a várias experiências de abstinências, uma quantidade moderada de álcool leva à sensibilização de comportamentos relacionados à ansiedade (Overstreet *et al*, 2002).

Os relatos acima demonstram que a abstinência de álcool facilita a ocorrência de respostas emocionais negativas exageradas, principalmente medo e ansiedade. Nesse sentido é sabido que boa parte dos estados emocionais alterados presentes durante a abstinência de uma droga de abuso é comumente observada em animais expostos a situações de perigo, ou a partir da estimulação elétrica ou química de estruturas do tronco cerebral pertencentes ao sistema encefálico aversivo, tais como a amígdala, o hipotálamo medial, os colículos superiores e inferiores, e a SCP (Brandão *et al*, 1999), o que sugere a implicação de mecanismos neurobiológicos análogos, tanto na ansiedade promovida pela abstinência de álcool quanto naquela induzida por estímulos que produzem medo.

---

## **OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo Geral**

2.1.1. Investigar se a SCPd está vinculada ao medo induzido pela suspensão da ingestão crônica de álcool.

## **2.2. Objetivos Específicos**

2.2.1. Verificar os efeitos da abstinência de álcool no labirinto em cruz elevado, um modelo animal de ansiedade.

2.2.2. Verificar os efeitos da abstinência de álcool sobre os processos atencionais através do modelo animal de atenção conhecido como inibição pré-pulso.

2.2.3. Verificar os efeitos da abstinência de álcool sobre os limiares de congelamento e fuga determinados pelo procedimento de estimulação elétrica da SCPd e sobre as vocalizações ultra-sônicas induzidas por esta estimulação.

---

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3. Metodologia Geral**

#### **Animais**

Ratos Wistar machos, ingênuos, pesando entre 180-190 g, provenientes do biotério central da USP/RP foram alojados, inicialmente, em grupos de 04 em caixas de acrílico (40 x 33 x 18 cm) forradas com raspas de madeira (maravalha) trocadas a cada três dias. Os animais foram mantidos em um biotério setorial com temperatura controlada ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo de iluminação de 12 x 12 h (início às 7 horas). Antes do início do tratamento, os animais permaneceram três dias no biotério para habituação às condições de alojamento, recebendo água e ração comercial, e mais dois dias nos quais foi oferecida apenas uma dieta líquida a base de Sustagem M (Mead-Johnson, Brasil) com vitaminas e sais minerais (1,3 Kcal/ml) como única fonte de alimentação. Após esses cinco dias, os animais que mantiveram ou diminuíram de peso – em relação ao dia da chegada ao biotério, foram descartados dos experimentos. Os ratos tiveram livre acesso à água durante todo o período experimental. Os protocolos experimentais foram utilizados de acordo com as normas para animais experimentais da SBNeC (Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento).

#### **Procedimento para indução da dependência de álcool**

O tratamento selecionado para induzir a dependência ao álcool foi o método semi-voluntário de dieta líquida. Após o período de habituação às condições do biotério e adaptação à dieta líquida, iniciou-se o tratamento para indução de dependência ao álcool. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo 1 (Controle) e Grupo 2 (Abstinente), nos quais os animais recebiam dieta

líquida sem álcool e com álcool, respectivamente. Estes grupos foram divididos em dois subgrupos: 12 e 48 horas, nas quais os tratamentos eram interrompidos após estes períodos.

Os animais do grupo controle receberam uma dieta contendo 68,44 g de Sustagem M sabor chocolate diluída em um volume de 240 ml de água/dia (4 animais por caixa) durante 21 dias. Após esse período, recebiam as dietas líquidas sem álcool por mais dois dias (23 dias). Os animais do grupo experimental também receberam, por 21 dias, a mesma quantidade de Sustagem M diluída em um mesmo volume, sendo adicionado a esta mistura diferentes concentrações de álcool ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ). Nos dois primeiros dias do tratamento, a concentração de álcool foi de 6%. Após esse período e até o término dos experimentos (3º ao 21º dia), a concentração foi de 8% de álcool. Após esse período, houve a suspensão do álcool na dieta e os animais recebiam as dietas líquidas sem álcool por dois dias (23 dias).

## **Experimento I**

### **EFEITOS DA ABSTINÊNCIA DE ÁLCOOL SOBRE OS ÍNDICES DE ANSIEDADE DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

#### **3.1.1. Aparatos**

Foi utilizado o labirinto em cruz elevado (LCE) que consiste de dois braços abertos (50x10 cm) unidos perpendicularmente a dois braços fechados (50x10x40 cm) todo confeccionado em madeira, com o teto aberto, elevado a 50 cm do piso (Pellow *et al*, 1985).



O registro dos comportamentos no LCE foi feito dentro de uma sala refrigerada com ruído de fundo constante (50 dB) através de uma câmera (Everfocus, USA) ligada a um monitor e um vídeo-cassete, externos à sala experimental, o que possibilitou a gravação dos comportamentos para posterior análise.

### **3.1.2. Procedimentos**

O animal foi colocado no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, segundo os grupos e condições descritas no delineamento experimental abaixo. O teste consistiu em uma única sessão de 5 minutos. Após cada sessão o animal era retirado do labirinto e levado ao biotério, e o aparelho limpo com álcool 20% e seco com um papel absorvente.

### **3.1.3. Medidas comportamentais**

O desempenho dos animais no teste do LCE foi avaliado a partir do registro das medidas tradicionalmente utilizadas neste teste: a frequência de entradas nos braços abertos e braços fechados, o tempo total e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos.

As categorias comportamentais: número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos foram validadas comportamental e farmacologicamente para ratos (Pellow *et al.*, 1985) e camundongos (Lister, 1987; Rodgers and Cole, 1993) e são utilizadas como indicadores de ansiedade.

As medidas comportamentais no teste do LCE foram definidas operacionalmente de acordo com trabalhos anteriores desse laboratório (Cruz *et al*, 1994; Anseloni e Brandão, 1997):

*Entradas nos braços fechados:* Considerado como todas as vezes que o animal entrou, com as quatro patas, em um dos braços fechados do labirinto, e reflete a atividade locomotora geral do animal.

*Porcentagem de entradas nos braços abertos:* obtido através da relação entre o número de entradas nos braços abertos pelo número total de entradas (abertos + fechados) x 100;

*Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos:* obtido através da relação entre o tempo gasto nos braços abertos pelo tempo total despendido no teste (abertos + fechados).

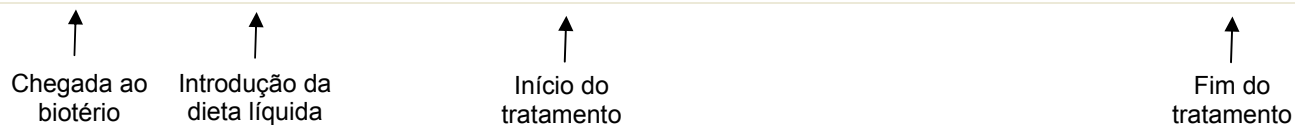
#### **3.1.4. Análise Estatística**

Os dados obtidos no LCE foram analisados utilizando teste t de Student, 12 ou 48 horas após a interrupção do tratamento crônico com álcool, para cada variável em estudo. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

**EXPERIMENTO I – DELINEAMENTO**

**EFEITOS DA ABSTINÊNCIA DE ÁLCOOL SOBRE OS ÍNDICES DE ANSIEDADE DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Grupos	Habituação		Tratamento		Testes	
			1º e 2º dia	3º ao 21º dia	12 hs	48 hs
Controle	1º ao 3º dia	4º e 5º dia	Sustagem M	Sustagem M	Dep 1	*
	1º ao 3º dia	4º e 5º dia	Sustagem M	Sustagem M	*	Dep 2
Experimental	1º ao 3º dia	4º e 5º dia	Sustagem M + Álcool 6%	Sustagem M + Álcool 8%	Dep 1	*
	1º ao 3º dia	4º e 5º dia	Sustagem M + Álcool 6%	Sustagem M + Álcool 8%	*	Dep 2



Dep = dependência  
 Abst = abstinência  
 n total = 48 animais

## Experimento II

### EFEITOS DA ABSTINÊNCIA DE ÁLCOOL SOBRE A AMPLITUDE DA RESPOSTA DE SOBRESSALTO E INIBIÇÃO PRÉ-PULSO

#### 3.2.1. Aparatos

A resposta de sobressalto foi registrada através de um estabilímetro sensível à pressão (PHM 250-60, Med Associates). Firmemente fixada ao estabilímetro estava uma gaiola de contenção com dimensões internas de 16,5 x 9,5 x 7,6 cm, suspensa em uma armação de PVC de 25 x 13,5 x 9,0 cm (ENV-262A, Med Associates) na qual os animais permaneceram durante todo o tempo do teste. Essas gaiolas foram colocadas separadamente em duas caixas idênticas (64 x 60 x 40 cm), com revestimento interno de espuma com finalidade de isolamento acústico (ENV-018S, Med Associates).

A resposta de sobressalto do animal gerou uma pressão na plataforma, que foi captada por sensores, amplificada (PHM250-60; Med Associates), convertida de sinal analógico para sinal digital e analisada por um software específico (Startle Reflex 4,1v; Med Associates) que armazenou e representou graficamente os dados (apresentação dos estímulos, tipo, duração e intensidade da resposta) através de uma interface (Dig 729, Med Associates). A resposta de sobressalto foi medida durante os primeiros 200 ms após a apresentação do estímulo de sobressalto. O estímulo de sobressalto acústico foi um ruído branco de intensidade de 100 dB, duração de 50 ms e *rise-decay* de 5 ms, sendo liberado dentro das caixas de isolamento acústico por um alto-falante localizado a 10 cm de distância da gaiola de contenção. O ruído de fundo foi apresentado pelo mesmo alto-falante, que gerou um

ruído branco de 55 dB. Uma lâmpada vermelha (6 W), instalada em cada caixa, permitiu a observação dos animais por meio de uma câmera de vídeo instalada no seu interior. As plataformas foram calibradas sempre no início de cada experimento, para garantir igual nível de sensibilidade entre elas.

### **3.2.2. Procedimentos**

Um quadro geral com o delineamento experimental desse estudo está apresentado na Tabela 2 na página 35.

Linha de base: A sessão experimental consistiu inicialmente na habituação do animal à condição experimental por um período de 5 minutos, sendo logo em seguida iniciado, o teste. Todos os animais foram submetidos, durante a sessão experimental, a 10 estímulos sonoros (100 dB, 50 ms), com intervalo variável (30 a 90 s) sendo registrada então a amplitude de 10 respostas de sobressalto, que no fim da sessão foram promediadas. Esta sessão durou aproximadamente 10 minutos.

Inibição pré-pulso: Durante a sessão de PPI, três condições experimentais foram apresentadas: Som (100 dB), pré-pulso (50 dB) e pré-pulso + som (com 30 ms de intervalo entre eles). Foram apresentadas 60 tentativas aleatórias (20 som, 20 pré-pulso, 20 pré-pulso + som), com intervalo randômico de 30 a 90 segundos entre elas.

### **3.2.5. Análise estatística**

Os dados obtidos nas sessões de sobressalto e PPI foram analisados

utilizando ANOVA de dois fatores (fator 1: controle x tratado; fator 2: pulso x pré-pulso + pulso) dentro de cada condição experimental (abstinência 12 ou 48 h). Em caso de significância estatística, todas as análises foram seguidas pelo teste *post-hoc* de Tukey. O PPI foi expresso como porcentagem da inibição da resposta de sobressalto. O nível dessa inibição é dado pela fórmula:  $(100 - [\text{amplitude do sobressalto nas tentativas pré-pulso + pulso} / \text{amplitude do sobressalto nas tentativas só pulso}] \times 100)$ . Foi utilizado o teste t de Student para avaliação da significância estatística. Em ambos os casos, para critérios de significância foi considerado  $p < 0,05$ .

**EXPERIMENTO II – DELINEAMENTO**

**EFEITOS DA ABSTINÊNCIA DE ÁLCOOL SOBRE A AMPLITUDE DA RESPOSTA DE SOBRESSALTO E INIBIÇÃO PRÉ-PULSO**

Grupos	Habituação	LB	Som / pP / pP + som	Teste
				48 h
Controle	5'	10 estímulos  (100 dB, 50 ms)	60 estímulos  20 som (100 dB)  20 pP (80 dB)  20 pP + som	*
	5'			Dep 2
Experimental	5'			*
	5'			Dep 2

↑  
Intervalo de 30 ms

↑  
Abstinência

Dep= dependência  
pP = pré-pulso  
LB = linha de base  
n total = 53 animais

### Experimento III

## EFEITOS DA ABSTINÊNCIA DE ÁLCOOL SOBRE OS LIMIARES DE CONGELAMENTO E FUGA DETERMINADAS PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA SCPd E SOBRE AS VOCALIZAÇÕES ULTRA-SÔNICAS

### 3.3.1. Cirurgia

Cada animal foi anestesiado com tribromo ethanol (Sigma-Aldrich, EUA), por injeção i.p. na concentração de 250 mg/Kg, volume de 1 ml/kg, e levado posteriormente a um aparelho estereotático digital (Insight, Brasil) onde teve o crânio fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após tricotomia, uma injeção subcutânea de 0,2 ml de lidocaína a 2% (Harvey, Brasil) foi aplicada na área de incisão. Logo após, o tecido subcutâneo e o periósteo foram removidos (por raspagem, com auxílio de pinça e algodão). Já com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre *bregma* e *lambda*, três orifícios foram feitos nos ossos parietais através de uma broca elétrica (Foredom, EUA) para fixação da prótese ao crânio do animal. Em seguida, tomando-se o *bregma* como referência, foi feito um orifício para implante de um eletrodo bipolar (7mm x 150 $\mu$ m), isolados em toda a sua extensão – com exceção da secção transversal, e direcionados à parte dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd), segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1997): ântero-posterior = -7,0 mm; médio lateral = +0,6 mm; dorso-ventral = -5,0 mm. Posteriormente, foi feito mais dois orifícios onde foram colocados dois parafusos de aço inoxidável. Parafusos e crânio foram revestidos com acrílico dental (JET, Brasil) para fixação do eletrodo. Ao término da cirurgia cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção de pentabiótico 60.000UI.



### **3.3.2. Aparatos**

*Estimulação elétrica*: Para monitorar e analisar as respostas de congelamento e fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPd foi utilizada uma caixa experimental (30 x 18 x 25 cm) com piso e paredes de barras de aço inoxidável, pintadas com verniz isolante para evitar a ressonância induzida pelas altas frequências, espaçadas 12 mm entre si, situada dentro de uma câmara de isolamento acústico (60 x 40 x 45 cm) cuja ventilação oferecia um ruído constante de 30 dB. A iluminação foi fornecida por uma lâmpada vermelha, 15 W, localizada no topo da caixa de isolamento. Para o procedimento de estimulação elétrica foram utilizados um estimulador de corrente contínua, um osciloscópio (Philips, EUA), swivel e cabos para estimulação (Plastics One, EUA). As respostas de congelamento e fuga foram monitoradas através de um sistema de vídeo-câmera, localizada na parede traseira da caixa de condicionamento, 12 cm acima do piso inferior.

*Vocalização ultra-sônica (VUS)*: As vocalizações ultra-sônicas (20 - 26 kHz) foram medidas por 4 detectores Mini-3 Bat (Ultra Sound Advice, UK). Após passar por um filtro de áudio (Noldus Inc. EUA) o sinal foi enviado a um computador, digitalizado e registrado pelo software Ultravox (Noldus Inc. EUA). As VUS foram registradas durante 5 minutos, imediatamente após o surgimento da resposta comportamental de congelamento e fuga, para cada animal em estudo.

### **3.3.3. Limiares aversivos**

O limiar de congelamento foi estabelecido como sendo a mais baixa intensidade de corrente capaz de produzir a resposta de congelamento – aqui definido como imobilidade total do animal (exceto as vibrissas), acompanhada de

pelo menos duas das seguintes respostas: retração das orelhas, arqueamento do dorso, piloereção, exoftalmia, micção, defecação. O limiar de fuga foi estabelecido como a mais baixa intensidade de corrente necessária para produzir corridas e saltos.

#### **3.3.4. Procedimentos**

Cinco dias antes do fim do tratamento (16º dia) foram realizadas as cirurgias para implante dos eletrodos na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) dos animais. Cada animal foi testado individualmente, sendo colocado na caixa experimental, para habituação, 5 minutos antes do teste.

O pré-teste (limiar basal) foi realizado aos 21 dias de tratamento (último dia de dependência) e o teste, 48 horas após a suspensão da administração de etanol (período de abstinência). Após esse tempo, foi iniciado o procedimento de estimulação cerebral, através de um estimulador de onda senoidal. A corrente de estimulação foi monitorada, através de uma queda de tensão em cima de um resistor de 1K $\Omega$ , com um osciloscópio (Philips, EUA). Os estímulos elétricos (AC, 60 Hz, 15 seg) foram apresentados a intervalos variáveis (30 a 90 seg) com a intensidade de corrente aumentando gradualmente a passos de 5  $\mu$ A. Animais que apresentaram limiares acima de 200  $\mu$ A foram descartados do experimento. Cada animal de cada grupo foi testado no período de dependência e no período de abstinência.

#### **3.3.5. Histologia**

Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com uretana,

perfundidos intraventricularmente com salina 0,9%, seguido de solução de paraformaldeído 4%. Após decapitação, os cérebros foram removidos e submersos em solução de sacarose 30% por dois dias. Os cérebros foram congelados e fatiados em um micrótomo, em cortes seriais de 60  $\mu\text{m}$ , com o objetivo de verificar o local exato da inserção do eletrodo e conseqüente estimulação elétrica, de acordo com o Atlas Paxinos e Watson (1997). Os animais que tiveram eletrodos implantados fora da SCPd foram descartados do experimento.

### **3.3.6. Análise estatística**

Os limiares de congelamento e fuga obtidos durante as sessões de estimulação elétrica foram analisados utilizando o teste t de Student comparando os grupos controle e tratado. Os índices de vocalização ultra-sônica foram analisados com a ANOVA de dois fatores sendo: fator 1 = grupos (controle e tratado), e fator 2 = frequências. Em caso de significância estatística, todas as análises foram seguidas pelo teste *post-hoc* de Tukey, com  $p < 0,05$ .

**EXPERIMENTO III – DELINEAMENTO**

**EFEITOS DA ABSTINÊNCIA DE ÁLCOOL SOBRE OS LIMIARES DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E VUS INDUZIDOS PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA SCPD**

Grupos	Habituação	Pré-Teste				Tempo	Teste			
		CG	VUS	FG	VUS		CG	VUS	FG	VUS
Controle	5'	μA	kHz	μA	kHz	48 h	μA	kHz	μA	kHz
Experimental	5'	μA	kHz	μA	kHz	48 h	μA	kHz	μA	kHz

↑  
Abstinência

CG = congelamento

FG = fuga

VUS = vocalizações ultra-sônicas

Estímulo: Corrente contínua, 60 Hz, com duração de 10 segundos, a passos de 5 μA.

Intervalo médio entre estimulações: 60 segundos.

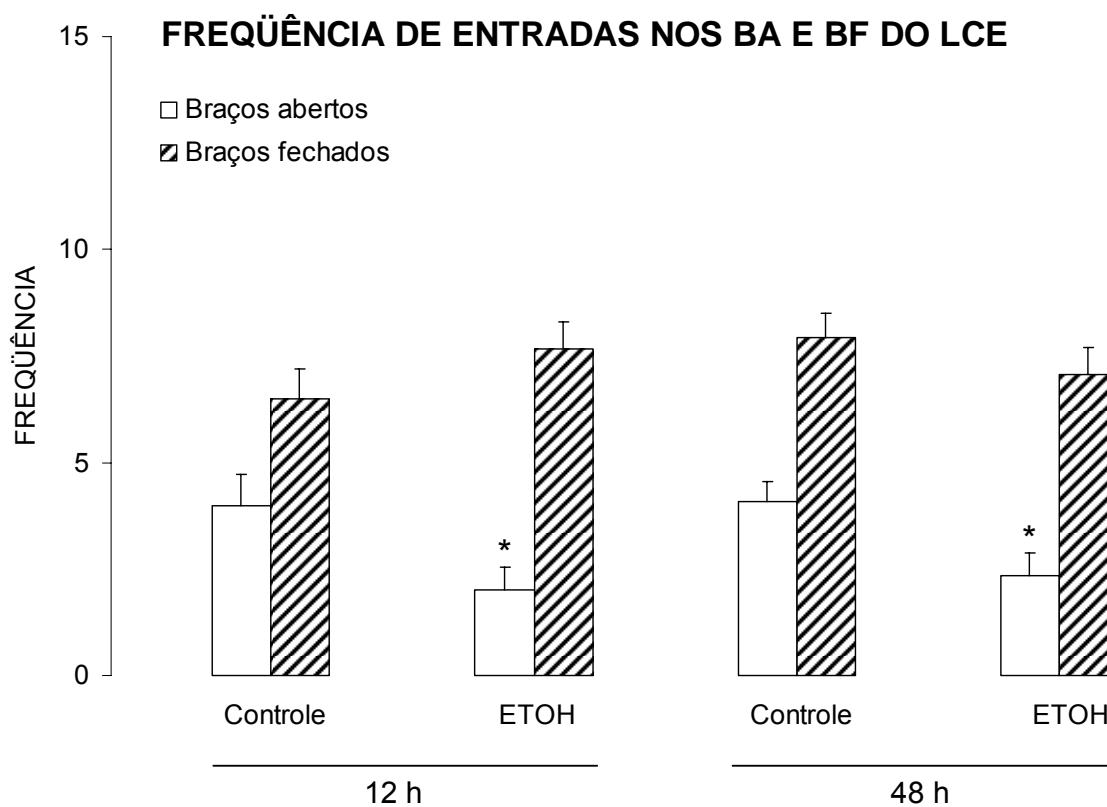
n total = 20 animais

---

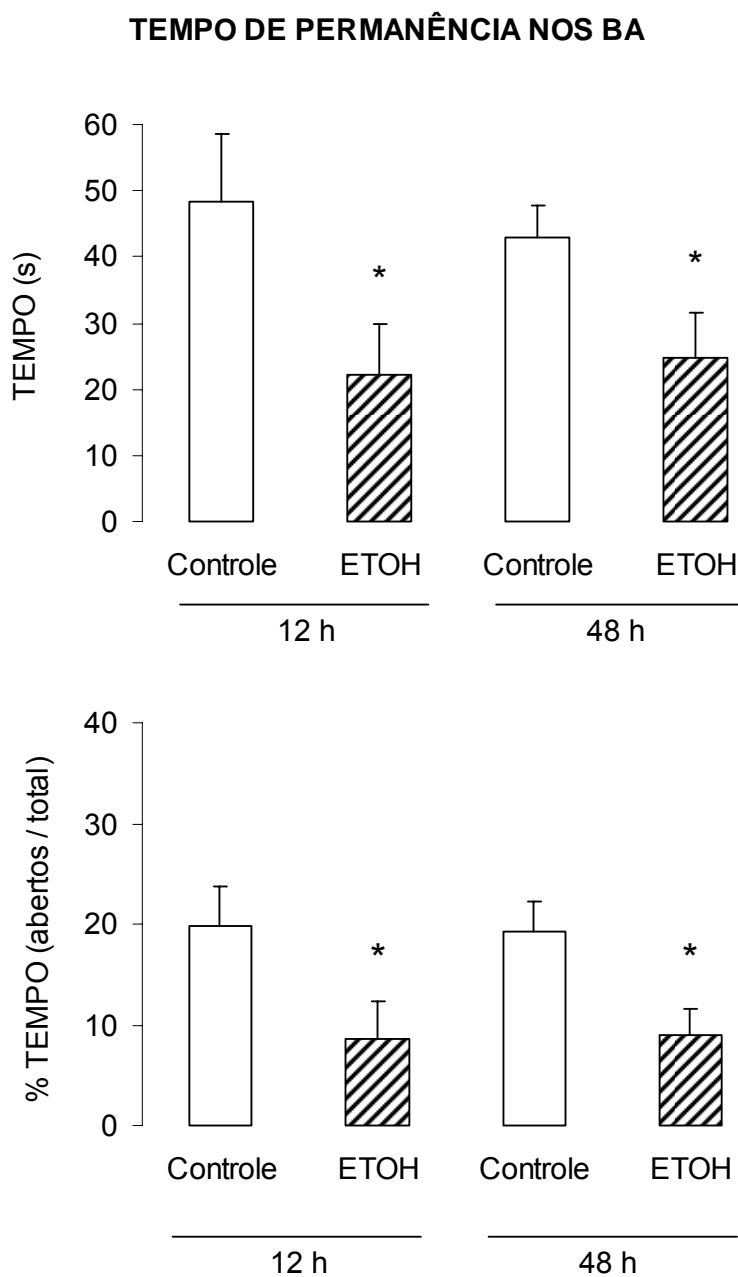
**RESULTADOS**

#### **4.1. Experimento I**

Neste experimento procuramos avaliar a extensão dos efeitos aversivos decorrentes da suspensão do tratamento crônico com álcool em ratos submetidos ao teste do LCE. Estes efeitos aversivos já são evidentes 12 horas após a retirada do álcool da dieta. O teste t de Student mostrou uma diminuição estatisticamente significativa na frequência de entrada ( $t_{22} = 8,52, p < 0,05$ ), no tempo de permanência nos braços abertos ( $t_{22} = 6,57, p < 0,05$ ) e na porcentagem de tempo no labirinto ( $t_{22} = 6,17, p < 0,05$ ) dos animais abstinentes de álcool por 12 horas, quando comparados ao controle. De forma similar, ocorreu uma diminuição significativa na frequência de entradas ( $t_{22} = 5,98, p < 0,05$ ) (Fig.1), no tempo de permanência nos braços abertos do labirinto ( $t_{22} = 4,65, p < 0,05$ ) e na porcentagem de tempo ( $t_{22} = 6,81, p < 0,05$ ), 48 horas após a suspensão do tratamento (Fig. 2). O teste também mostrou que não houve alterações significativas no número de entradas nos braços fechados dos animais abstinentes, quando comparado ao grupo controle, tanto 12 horas ( $t_{22} = 0,98, p > 0,05$ ) quanto 48 horas ( $t_{22} = 0,96, p > 0,05$ ) após a suspensão do tratamento.



**Fig.1** – Efeitos da suspensão do tratamento crônico com álcool (ETOH) sobre a freqüência de entradas nos braços abertos e fechados do LCE (Média ± EPM). Os animais foram testados 12 ou 48 horas após o término do tratamento. n=12 para cada grupo. \* significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, dentro de cada condição (12 ou 48 horas).

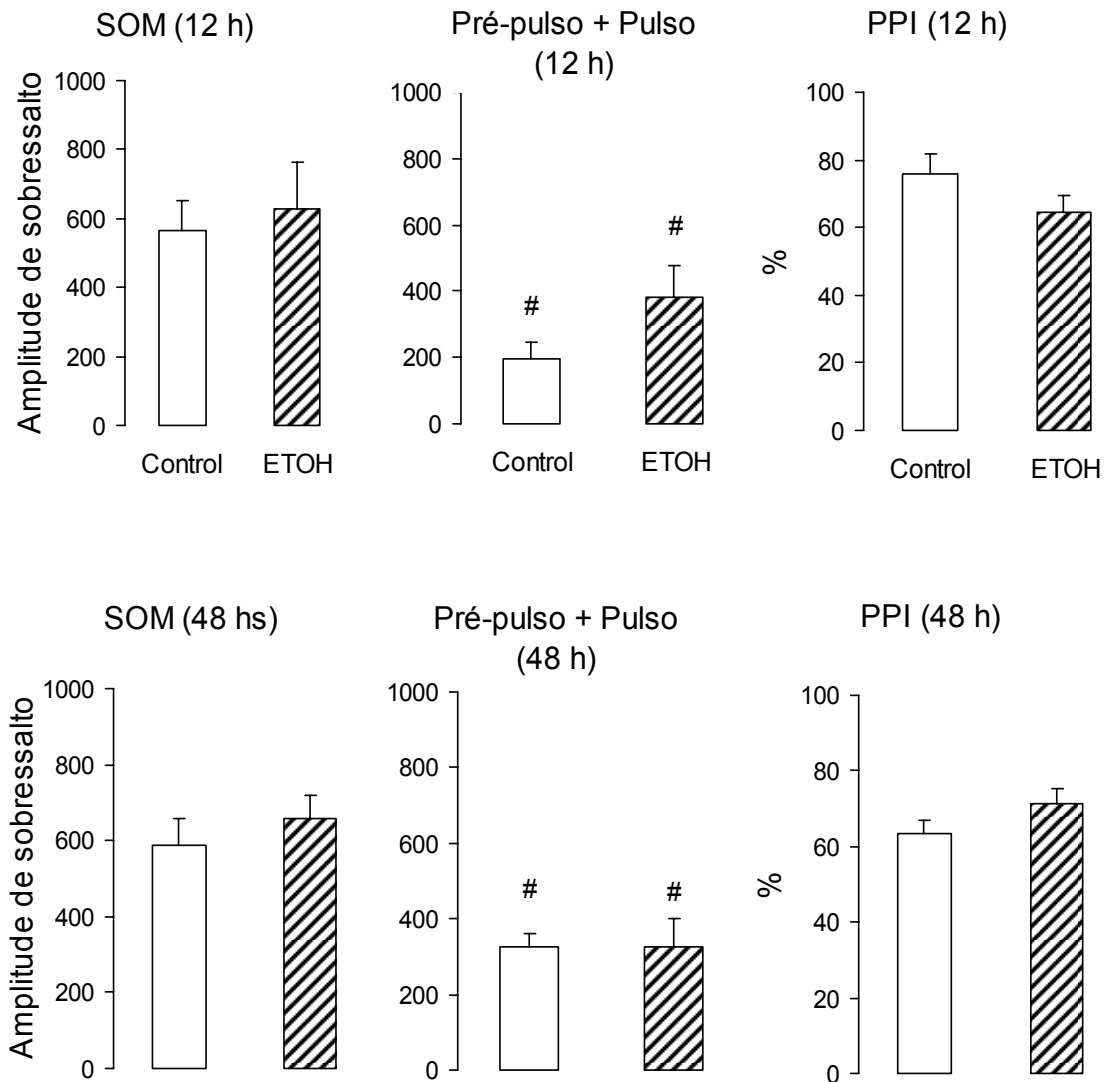


**Fig.2** – Efeitos da suspensão do tratamento crônico com álcool (ETOH) sobre o tempo e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE (Média  $\pm$  EPM). Os animais foram testados 12 ou 48 horas após o término do tratamento.  $n=12$  para cada grupo. \* significa  $p<0,05$  em relação ao grupo controle, dentro de cada condição (12 ou 48 horas).



## 4.2. Experimento II

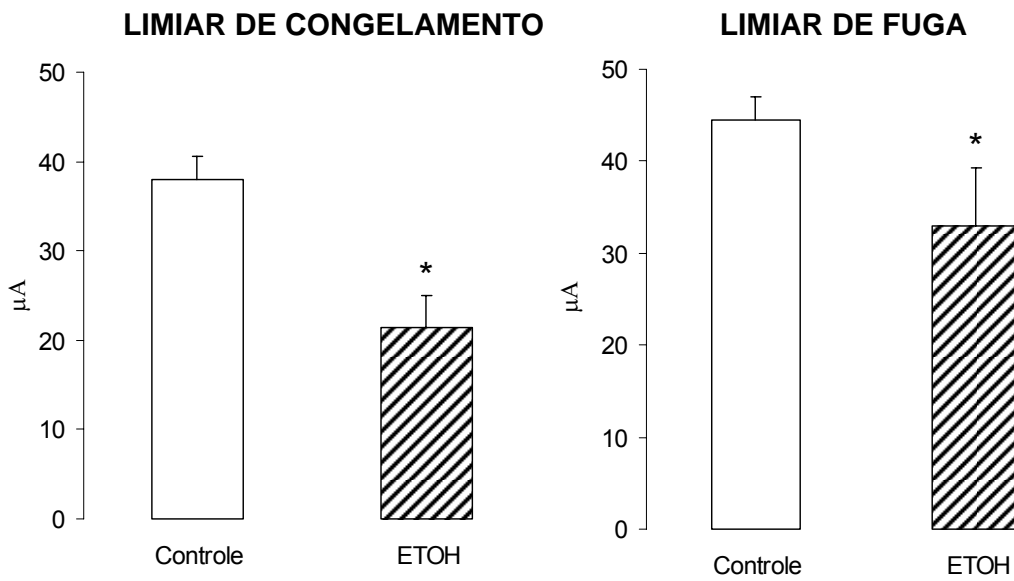
Nesse experimento analisamos os efeitos decorrentes da suspensão do tratamento crônico com álcool sobre o desempenho de ratos no teste de inibição pré-pulso. A ANOVA de dois fatores (two-way) com medidas repetidas (tratamento x condição) demonstrou que, 12 horas após a suspensão do tratamento crônico com álcool, não foi verificada qualquer alteração na amplitude média de sobressalto ( $F_{1,29} = 1,21, p > 0,05$ ). A apresentação de um estímulo sonoro de baixa intensidade (pré-pulso) imediatamente antes do estímulo que gera a resposta de sobressalto foi efetiva em reduzir a amplitude dessa resposta em ambos os grupos, controle e abstinente ( $F_{1,29} = 20,35, p < 0,05$ ), não havendo, no entanto, qualquer interação entre os fatores ( $F_{1,29} = 0,86, p > 0,05$ ). Este padrão de respostas se repetiu nos grupos testados 48 horas após o término do tratamento (Fig. 3). A ANOVA de dois fatores com medidas repetidas mostrou que a resposta de sobressalto a um som intenso se mantém preservada ( $F_{1,29} = 0,22, p > 0,05$ ) e que a apresentação do pré-pulso reduz a amplitude dessa resposta em ambos grupos ( $F_{1,29} = 35,51, p < 0,05$ ). Não houve interação entre os dois fatores ( $F_{1,29} = 0,48, p > 0,05$ ). O teste t de Student não mostrou qualquer efeito do tratamento sobre a porcentagem de inibição pré-pulso (PPI) tanto na condição 12 ( $t_{22} = -1,33; p > 0,05$ ) quanto na de 48 horas ( $t_{22} = -1,61; p > 0,05$ ).



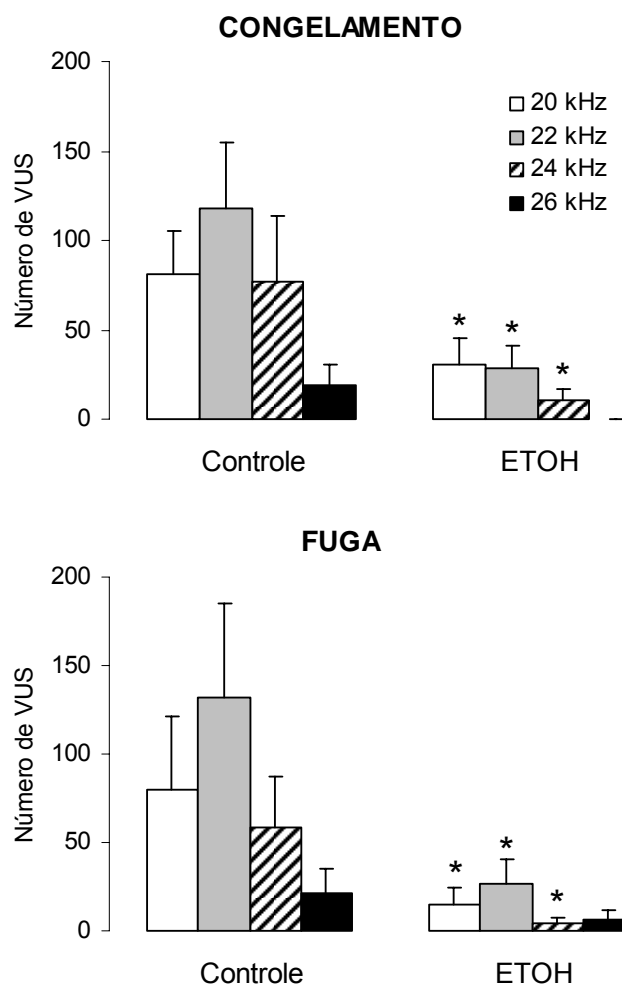
**Fig.3** – Efeitos da suspensão do tratamento crônico com álcool (ETOH) sobre a amplitude da resposta de sobressalto, pré-pulso e porcentagem de inibição da resposta de sobressalto, pela apresentação de um som de baixa intensidade (PPI), induzidos por um estímulo sonoro (Média  $\pm$  EPM). Os animais foram testados 12 ou 48 horas após o término do tratamento. n=12 para o grupo controle e n=22 para o grupo ETOH. # significa  $p < 0,05$  em relação ao som.

### 4.3. Experimento III

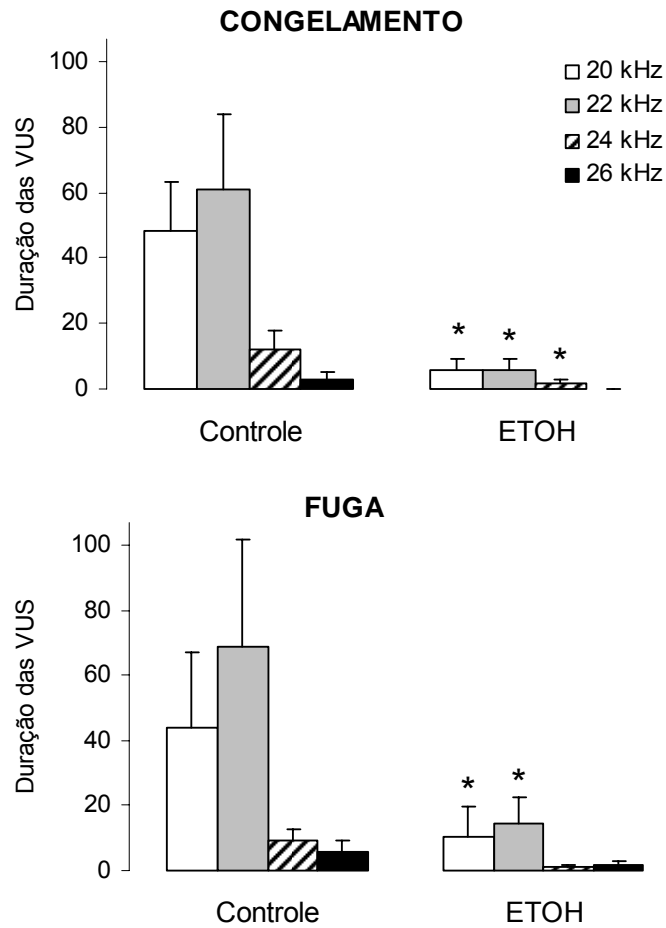
Este experimento foi idealizado para avaliar a influência da abstinência de álcool sobre os limiares aversivos e vocalização ultra-sônica induzidos pela estimulação elétrica da parte dorsal da SCP. O teste t de Student mostrou que a abstinência do tratamento crônico com álcool levou a uma diminuição significativa no limiar de congelamento ( $t_{18} = 3,79$ ,  $p < 0,05$ ) e no limiar de fuga ( $t_{18} = 3,70$ ,  $p < 0,05$ ) dos animais, 48 horas após a interrupção (Figuras 5). Com referência ao número e duração das vocalizações ultra-sônicas induzidas pela estimulação elétrica da SCPd nos limiares de congelamento, a ANOVA (two-way) com medidas repetidas (2 tratamentos x 4 frequências) mostrou que a abstinência de álcool praticamente aboliu essa respostas diminuindo significativamente o número de vocalizações ocorridas durante a resposta de congelamento ( $F_{1,15} = 32,06$ ,  $p < 0,05$ ) e fuga ( $F_{1,15} = 14,18$ ,  $p < 0,05$ ) 12 ou 48 horas (congelamento:  $F_{1,15} = 11,56$ ,  $p < 0,05$ ; fuga:  $F_{1,15} = 6,22$ ,  $p < 0,05$ ) após a suspensão do tratamento. A análise *post-hoc* com o teste de Newman-Keuls mostrou que a frequência de 22 kHz foi praticamente abolida nos animais submetidos a 12 horas de abstinência (Figura 6). Da mesma forma, a interrupção do tratamento também afetou a duração (tempo) das vocalizações após a estimulação elétrica da SCPd nos mesmos limiares, com diminuição significativa das VUS ocorridas durante a resposta de congelamento ( $F_{1,15} = 14,41$ ,  $p < 0,05$ ) e fuga ( $F_{1,15} = 12,97$ ,  $p < 0,05$ ) 12 ou 48 horas (congelamento =  $F_{1,15} = 14,95$ ,  $p < 0,05$ ; fuga =  $F_{1,15} = 4,42$ ,  $p < 0,05$ ) após o término do tratamento. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o tratamento diminuiu significativamente o tempo de duração das VUS na faixa de 22 kHz (Figura 7).



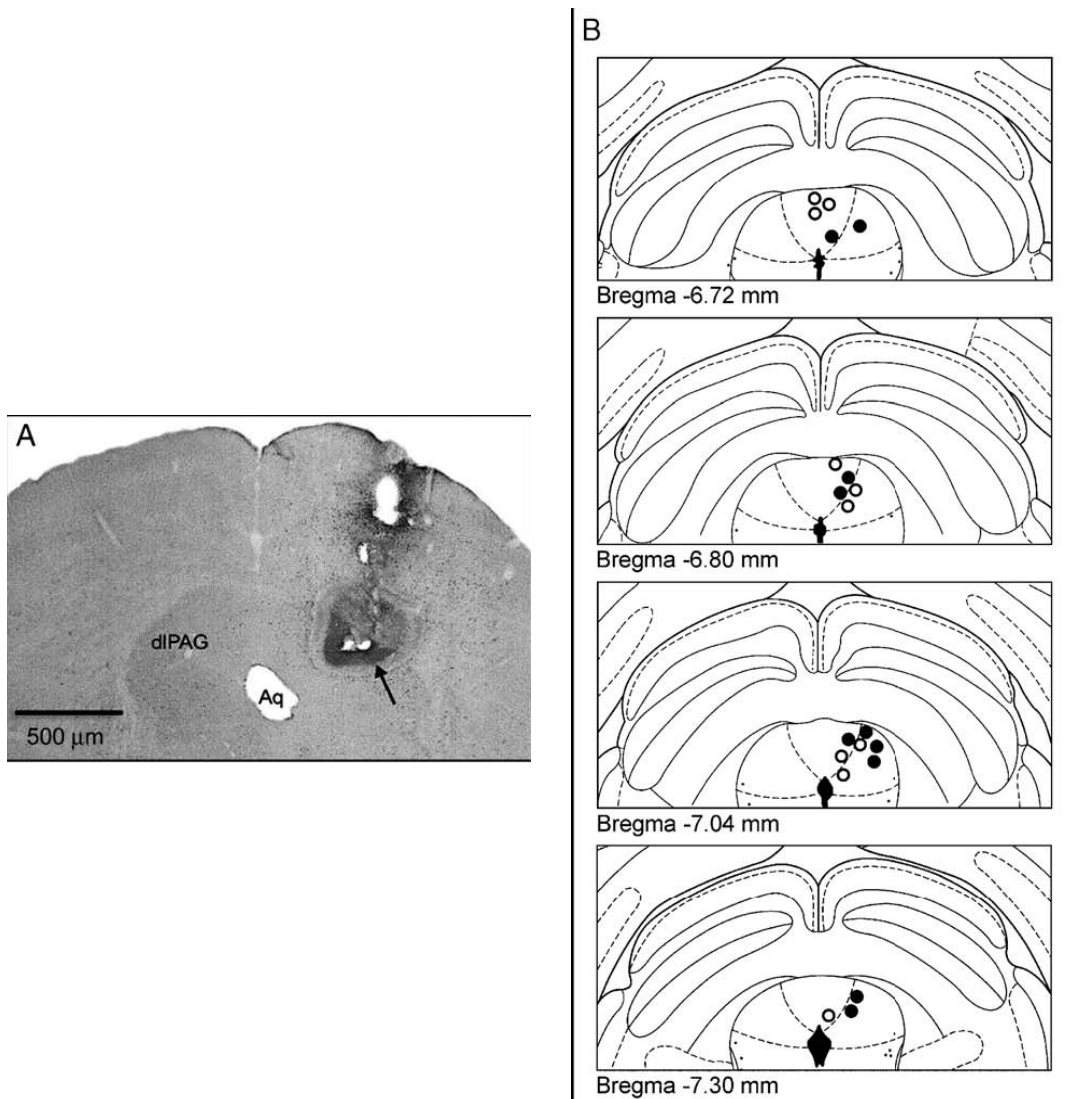
**Fig.5** – Efeitos da suspensão do tratamento crônico com álcool (ETOH) sobre os limiares de congelamento e fuga após estimulação elétrica na SCPd (Média  $\pm$  EPM). Os animais foram testados 48 horas após o término do tratamento.  $n=10$  para cada grupo. \* significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Fig.6** – Efeitos da suspensão do tratamento crônico com álcool (ETOH) sobre o número de VUS induzidas pela estimulação elétrica da SCPd (Média  $\pm$  EPM). Os animais foram testados 48 horas após o término do tratamento. n=10 para o grupo controle e n=10 para o grupo ETOH. \* significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Fig.7** – Efeitos da suspensão do tratamento crônico com álcool sobre a duração de VUS induzidas pela estimulação elétrica da SCPd (Média  $\pm$  EPM). Os animais foram testados 12 (acima) e 48 horas (abaixo) após o término do tratamento. ANOVA (two-way) com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls.  $n=8$  para o grupo controle e  $n=9$  para o grupo ETOH. \* significa  $p<0,05$  em relação ao grupo controle.



**Fig. 8** - (A) Fotomicrografia mostrando um sítio representativo da localização dos eletrodos bipolares na parte dorsal da substância cinzenta periaquedutal dorsal. Barra representa 500  $\mu\text{m}$ . (B) Localização dos pontos de estimulação dos eletrodos bipolares implantados na parte dorsal da substância cinzenta periaquedutal dorsal. Círculos abertos representam os pontos de estimulação nos animais do grupo controle. Círculos fechados representam os pontos de estimulação nos animais abstinente de álcool. dPAG = substância cinzenta periaquedutal dorsal.

---

## **DISCUSSÃO**



Uma série de estudos comportamentais tem demonstrado que a abstinência de diversos tipos de drogas de abuso tais como álcool, benzodiazepínicos, psicoestimulantes e opióides provoca o aparecimento de disforia, irritabilidade e ansiedade, acompanhadas de alterações sensoriais e autonômicas (Markou *et al*, 1998; Koob e Le Moal, 2001). Em animais, a retirada provoca efeitos ansiogênicos no LCE e aversão condicionada por lugar (Schulteis *et al*, 1995; Schulteis *et al*, 1998). Dessa forma, a abstinência produz um estado aversivo que pode facilitar ou potencializar a ocorrência de respostas de medo e ansiedade a diversos tipos de estímulos que sinalizam perigo.

O LCE foi primeiramente validado como um modelo animal de ansiedade e tem sido um dos testes mais utilizados para avaliar efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos de drogas ou outras variáveis (Pellow e File, 1986; Anseloni *et al*, 1995; Anseloni e Brandão, 1997). O uso do LCE neste estudo é baseado no fato da ansiedade ser considerada um dos principais sintomas da síndrome de abstinência ao etanol (Devaud *et al*, 1997; Wilson *et al*, 1998). De fato, ratos que tiveram o uso crônico de álcool descontinuado por 12 ou 48 horas demonstraram alto nível de ansiedade quando testados no LCE. Estes animais permaneceram mais tempo nos braços fechados e entraram menos vezes nos braços abertos do LCE, quando comparados ao controle, o que caracteriza um típico perfil ansiogênico. Com estes resultados validamos novo procedimento de suspensão do uso crônico do álcool por 21 dias como um modelo de abstinência a essa droga.

A redução do tempo de permanência nos braços abertos não pode ser atribuída a alterações inespecíficas na atividade motora, causadas pelo tratamento, uma vez que a frequência de entradas nos braços fechados nos animais abstinentes não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comprado com os

animais controle. Os resultados obtidos corroboram outros relatos já publicados que mostram um aumento na frequência dos comportamentos defensivos após a interrupção da administração crônica de álcool (File, 1994; Rasmussen *et al*, 2001). Os efeitos promovidos pela abstinência de álcool observados no teste do LCE seguem um padrão oposto ao produzido pelo tratamento crônico com álcool, que apresenta um perfil ansiolítico (Kliethermes, 2005, Martijena *et al*, 2001).

Em nosso trabalho investigamos também os efeitos da abstinência de álcool sobre a atividade motora e atencional de ratos, utilizando os modelos de resposta de sobressalto e inibição pré-pulso, respectivamente. Nossos resultados mostram que a interrupção do tratamento crônico com álcool não produz, por si só, qualquer déficit motor ou atencional nos animais abstinentes, já que a resposta de sobressalto e a inibição pré-pulso não se alteraram nos animais abstinentes em comparação com o grupo controle. Em conjunto, esses dados indicam que ratos abstinentes de álcool não apresentam prejuízo na reatividade motora a um estímulo acústico intenso e nem alterações na sua capacidade de processar estímulos sensoriais em condições que requerem um bom funcionamento de mecanismos atencionais.

Como esperado, e de acordo com vários estudos já publicados, os resultados obtidos mostram que o aumento gradual na estimulação elétrica da SCPd promove o aparecimento das respostas de congelamento e fuga (Brandão *et al*, 1994; Brandão *et al*, 1999). A natureza aversiva dessa estimulação tem sido determinada em paradigmas de esquiva em que ratos aprendem rapidamente a desligar essa estimulação (Brandão *et al*, 1982). Além disso, injeções sistêmicas ou locais de agonistas GABAérgicos ou benzodiazepínicos na SCPd reduzem as conseqüências aversivas dessa estimulação (Brandão *et al*, 1982; Brandão *et al*, 1994; Brandão *et al*, 2005). A expressão desses comportamentos defensivos não pode ser atribuída à

estimulação elétrica de estruturas vizinhas à SCPd, uma vez que comportamentos característicos da ativação do colículo superior, como rotações, não foram observados neste estudo (Brandão *et al*, 1994; Brandão *et al*, 1999).

No presente estudo houve uma redução significativa nos limiares de congelamento e fuga, determinados pela estimulação elétrica da SCPd, em animais testados 48 horas após interrupção da administração crônica de álcool. Baseado nas evidências obtidas no experimento anterior com o uso do LCE de que o procedimento usado para provocar abstinência de álcool neste estudo é ansiogênico, os resultados neste experimento com estimulação elétrica da SCPd sugerem que a interrupção do uso do álcool leva a um estado aversivo decorrente da ativação dessa estrutura. Dessa forma, após a interrupção da ingestão crônica de álcool, a intensidade da corrente elétrica necessária para eliciar respostas de congelamento e fuga foi menor nos ratos abstinentes que aquela necessária para eliciar a mesma resposta nos animais do grupo controle. Esses resultados estão relacionados à sensibilização da SCPd à estimulação elétrica.

Com relação aos efeitos da abstinência de álcool sobre os índices de vocalização ultra-sônica, nossos resultados mostraram uma redução significativa na emissão dessas vocalizações, conseqüente à estimulação elétrica da SCPd, na faixa de frequência de 22 kHz que normalmente está aumentada quando ratos são expostos direta ou indiretamente a estímulos que produzem medo, como a presença de um predador ou pistas contextuais que sinalizam perigo iminente. Nossos resultados corroboram a hipótese que prediz que altos níveis de aversão promovem o acionamento de mecanismos neurais diferentes daqueles ativados por estímulos que eliciam baixos níveis de medo (Nobre e Brandão, 2004; Nunes Mamede Rosa *et al*, 2005). Nesse sentido, sabemos que a exposição a estímulos moderados de

medo, como um estímulo condicionado previamente associado com choque nas patas (aplicado em baixa intensidade de corrente), promove um aumento na emissão de vocalizações ultra-sônicas na faixa de frequência de 22 kHz (Brudzynski e Chiu, 1995; Nobre *et al*, 2003). Em ratos ingênuos expostos a pistas ambientais que sinalizam perigo, as respostas de vocalização aumentam na medida em que aumenta a intensidade do estímulo (Wohr *et al*, 2005). Altos níveis de vocalizações ultra-sônica, durante a expressão da resposta de congelamento, também são obtidos com a utilização de choques nas patas. De forma inversa, a inibição da neurotransmissão GABAérgica no colículo inferior (estrutura pertencente ao sistema encefálico aversivo e principal relé das vias vias auditivas ascendentes) através da microinjeção do inibidor da síntese de GAD semicarbazida, conhecida por seus efeitos altamente aversivos, promove uma inibição acentuada das vocalizações ultra-sônicas em ratos Wistar (Nobre *et al*, 2003) da mesma forma como o faz a abstinência de álcool, neste estudo. Por outro lado, um trabalho recente deste laboratório mostrou que uma função não-linear pode ocorrer se ratos com uma experiência anterior de estresse são novamente submetidos à estimulação aversiva, ou seja, após um determinado nível de estimulação aversiva, o número e a duração de vocalizações ultra-sônicas começa a diminuir (Nunes Mamede Rosa *et al*, 2005; Tomazini *et al*, 2006). Estes achados sugerem que a exposição anterior a uma situação de estresse pode, numa exposição posterior, levar à ativação dos substratos neurais da aversão na SCPd. Como a exposição a estímulos que promovem medo intenso, como um ataque predatório iminente ou a estimulação prolongada do teto mesencefálico induzem uma redução nas vocalizações ultra-sônicas na faixa de 22 kHz, tem sido sugerido que este padrão de resposta pode resultar da ativação dos substratos neurais do medo nesta região mesencefálica

(Nobre e Brandão, 2004; Brandão *et al*, 2005). Dessa forma, parece que as respostas defensivas a estímulos aversivos seguem uma função não-monotônica, dependendo então do tipo ou da intensidade da estimulação aversiva.

De forma geral, nossos resultados confirmam a teoria que prediz que as respostas defensivas são hierarquicamente organizadas, assim como distintas respostas defensivas dentro de uma mesma reação de defesa podem ser eliciadas por estímulos aversivos de diferentes intensidades (Blanchard e Blanchard 1969). Por exemplo, o comportamento de alerta resulta da apresentação de estímulos distais enquanto que a resposta de congelamento é o resultado da apresentação de estímulos proximais ou de média intensidade. Nesse sentido, enquanto os estímulos condicionados supostamente ativam estruturas prosencefálicas, como hipocampo e amígdala, a exposição a um estressor incontrolável, como um ataque predatório iminente, por exemplo, parece ativar estruturas mesencefálicas como a SCPd (Graeff, 2004; Brandão *et al*, 2005). A abstinência de drogas de abuso, em nosso caso o álcool, que apresenta a característica de um estressor incontrolável, pode se enquadrar na última categoria de estimulação aversiva. De fato, o baixo índice de vocalizações ultra-sônicas e o aumento na reatividade à estimulação da SCPd, foram os principais efeitos comportamentais derivados da interrupção da ingestão crônica de álcool.

Além de induzir uma reatividade emocional exagerada, a abstinência à maioria das drogas de abuso induz um déficit na expressão da resposta de fuga (Lacerra *et al*, 1999). Além disso, a exposição a experiências aversivas inescapáveis vai resultar, posteriormente, na expressão de respostas emocionais exageradas, principalmente medo e ansiedade (Martijena *et al*, 1997; Zurita *et al*, 2000; Rodriguez Manzanares *et al*, 2005). A ativação dos circuitos neurais da aversão na

SCPd parece então estar subjacente à expressão dos comportamentos defensivos observados em animais com experiência prévia de estresse (Santos *et al*, 2005). Portanto, os resultados obtidos no presente estudo nos levam a especular se a interrupção abrupta ao acesso ao estímulo reforçador – como a abstinência de álcool, ou outra droga – promove a expressão de respostas defensivas similares àquelas induzidas pela estimulação elétrica da SCPd.

A ingestão crônica de álcool causa danos irreversíveis à integridade microestrutural de várias áreas cerebrais, oscilando desde alterações na diferenciação neuronal, à inibição de fatores neurotróficos cerebrais que modulam a comunicação intracelular e morte celular (O'Neill *et al*, 2001; Li *et al*, 2004). Entretanto, nossos resultados não podem ser atribuídos a possíveis lesões na SCPd induzidas pelo tratamento crônico com álcool, já que lesões nessa área frequentemente causam aumento nos limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd, o que não ocorreu no presente estudo.

De forma geral, os presentes resultados mostram que a abstinência de álcool promove um estado aversivo decorrente da ativação dos substratos neurais do medo incondicionado na SCPd. Entretanto, nenhuma alteração significativa foi observada na resposta de sobressalto ou inibição pré-pulso nos animais testados, indicando que as alterações emocionais observadas foram determinadas por um incremento da atividade da SCPd destes animais aos estímulos aversivos da abstinência de álcool, sem qualquer comprometimento motor ou atencional. O mesmo tipo de interação (estimulação da SCPd e interrupção do uso crônico de álcool) foi eficaz em reduzir as respostas de vocalização ultra-sônica que acompanham as respostas de congelamento e fuga. Esses achados são indicativos de que a abstinência ao álcool sensibiliza os substratos neurais do medo na SCPd. A redução tanto no número

quanto na duração das vocalizações ultra-sônicas obtidas no presente estudo é usualmente observada em animais expostos a estressores incontroláveis, como um ataque iminente por um predador. A similaridade entre respostas dos neurônios da SCPd à estimulação que produz medo intenso e os efeitos da abstinência de álcool sugere que ambas condições compartilham o mesmo substrato neurobiológico.

**CONCLUSÕES**

---



1. A abstinência de álcool em ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado promove efeitos ansiogênicos significativos. Estes resultados validam o nosso procedimento com o uso crônico de álcool como um modelo animal de dependência.
  
2. A interrupção abrupta no consumo de álcool potencializa os efeitos comportamentais induzidos pela estimulação elétrica da SCPd.
  
3. A abstinência de álcool após tratamento crônico também promove uma redução nas VUS, a exemplo do que ocorre com a estimulação prolongada da SCPd.
  
4. A SCPd pode estar vinculada ao medo induzido pela retirada de álcool ou seja, o estado aversivo da síndrome de abstinência de álcool pode ser decorrente da ativação dos substratos neurais do medo na SCPd.
  
5. Os efeitos aversivos da abstinência de álcool não podem ser atribuídos a uma alteração sensorial ou motora, uma vez que os animais nessa condição não apresentaram qualquer alteração no reflexo de sobressalto a um som intenso ou na inibição pré-pulso.

---

**RESUMO**

Ainda não estão claros quais são os substratos neurais ativados pelos efeitos aversivos da abstinência de álcool. Um candidato na promoção desses efeitos é a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), uma estrutura do sistema cerebral aversivo. O principal objetivo deste trabalho foi examinar o papel da SCPd como um possível local dos efeitos aversivos decorrentes da suspensão abrupta de álcool. Com essa finalidade, ratos foram submetidos a um procedimento de auto-administração oral de álcool, em que os animais recebiam solução de etanol na concentração de 8% em uma dieta líquida a base de Sustagem M por um período de 21 dias, seguido da suspensão abrupta do tratamento nos dois dias subsequentes. Os animais controle recebiam a mesma dieta líquida com exceção do etanol na solução, pelo mesmo período de tempo. Os efeitos da abstinência de álcool foram avaliados no labirinto em cruz elevado (Experimento I), no modelo de inibição pré-pulso (Experimento II) e no modelo de estimulação elétrica da SCPd nos limiares de congelamento e fuga (Experimento III). Nesse último experimento, os ratos tinham um eletrodo implantado na SCPd e o número e duração das vocalizações ultra-sônicas foram também registrados após a estimulação elétrica na SCPd nos limiares aversivos. Os dados obtidos mostraram que a abstinência de álcool eliciou efeitos ansiogênicos significativos, evidenciados pela redução do número de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE. O reflexo de sobressalto e a inibição pré-pulso permaneceram inalteradas nos animais abstinentes. A interrupção do tratamento crônico com álcool promoveu redução dos limiares de congelamento e fuga e do número e duração de vocalizações ultra-sônicas. Em conjunto, esses efeitos podem ser interpretados como parte de um intenso estado de medo eliciado pela ativação da SCPd. Esses resultados são indicativos de que a abstinência de álcool sensibiliza os substratos neurais do medo nessa importante estrutura do sistema cerebral aversivo.

**ABSTRACT**

---

The neural substrate underlying the aversive effects induced by ethanol abstinence is still unclear. One candidate for such effects is the dorsal periaqueductal gray (dPAG), a core structure of the brain aversion system. The main aim of this study is to examine the role of the dPAG as a possible locus of the aversive effects following abrupt alcohol withdrawal. To this end, rats were subjected to an oral ethanol self-administration procedure, in which animals were offered 6-8% (v/v) ethanol solution for a period of 21 days followed by an abrupt discontinuation of the treatment on the two subsequent days. Control animals received control dietary fluid for similar periods of time. The effects of ethanol withdrawal were examined in the elevated plus-maze (EPM) (Exp. I), on the prepulse inhibition of startle to loud sounds (Exp. II) and on the freezing and escape responses induced by electrical stimulation of the dPAG (Exp. III). In Experiment III, rats were implanted with an electrode aimed at the dPAG and the number and duration of ultrasonic vocalizations (USVs) were also recorded in the rats that received dPAG stimulation at freezing and escape thresholds. Data obtained showed that ethanol withdrawal elicited significant "anxiety-like" behaviors, as revealed by the decrease in the number of entries into and time spent onto the open arms of the EPM. Startle reflex and prepulse inhibition remained unchanged in withdrawn animals. In addition, discontinuation from the chronic ethanol regimen caused a reduction in the stimulation thresholds for freezing and escape and in the number and duration of USVs. Together, these effects have been interpreted in the frame of a high fear state elicited by activation of the dPAG. These findings are indicative that ethanol withdrawal sensitizes the substrates of fear at the level of this midbrain structure.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, D.P. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. **Pathol. Biol.** (Paris), v. 49, p. 703-709, 2001.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION . Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4<sup>th</sup> edition, 2000. Washington DC, **American Psychiatric Association**. 2000.

AMSEL, A.; RADEK, C.C.; GRSHAM, M.; LETZ, R. Ultrasound emission in infant rats as an indicant of arousal during appetitive learning and extinction. **Science**, v. 197, p. 786-788, 1977.

ANDREATINI, R.; BLANCHARD, C.; BLANCHARD, R.; BRANDÃO, M.L.; CAROBREZ, A.P.; GRIEBEL, G.; GUIMARÃES, F.S.; HANDLEY, S.L.; JENCK, F.; LEITE, J.R.; RODGERS, J., SCHENBERG, L.C.; DA CUNHA, C.; GRAEFF, F.G. The brain decade in debate: II. Panic or anxiety? From animal models to a neurobiological basis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 145-154, 1977.

ANISKO, J.J.; SUER, S.F.; McCLINTOCK, M.K.; ADLER, N.T. Relation between 22-kHz ultrasonic signals and sociosexual behavior in rats. **J. Comp Physiol Psychol.**, v. 92, p. 821-829, 1978.

ANSELONI, V.Z.; BRANDÃO, M.L. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behav. Pharmacol.**, v. 8, p. 533-540, 1997.

ANSELONI, V.Z.; MOTTA, V.; LIMA, G.; BRANDÃO, M.L. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 597-601, 1995.

AUDI, E.A.; De OLIVEIRA, R.M.; GRAEFF, F.G. Microinjection of propranolol into the dorsal periaqueductal gray causes an anxiolytic effects in the elevated plus-maze antagonized by ritanserin. **Psychopharmacol.** (Berlin), v. 105, n. 4, p. 553-557, 1991.

BABOR, T. No Ordinary Commodity: Alcohol and Public Policy. London: Oxford University Press, 2003.

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

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S.P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Prog. Brain Res.**, v. 87, p. 269-305, 1991.

BASOGLU, M. Pharmacological and behavioural treatment of panic disorder. **Psychother. Psychosom.**, v. 58, p. 57-59, 1992.

BECKETT, S.R.; ASPLEY, S.; GRAHAM, M.; MARSDEN, C.A. Pharmacological manipulation of ultrasound induced defence behaviour in the rat. **Psychopharmacol.** (Berl), v. 127, p. 384-390, 1996.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog. Neurobiol.**, v. 46, p. 575-605, 1995.

BEITZ, A.J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience**, v. 7, p. 133-159, 1982.



BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **J. Comp Physiol Psychol.**, v. 68, p. 129-135, 1969.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; AGULLANA, R.; WEISS, S.M. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. **Physiol Behav.**, v. 50, p. 967-972, 1991.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 155-165, 1993.

BOUTON, M.E.; MINEKA, S.; BARLOW, D.H. A modern learning theory perspective on the etiology of panic disorder. **Psychol. Rev.**, v. 108, p. 4-32, 2001.

BRANDÃO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDOSSIO, J.E.; De ARAUJO, J.E.; CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 863-875, 1999.

BRANDÃO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDOSSIO, J.E.; De ARAUJO, J.E.; CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 863-875, 1999.

BRANDÃO, M.L.; BORELLI, K.G.; NOBRE, M.J.; SANTOS, J.M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A.R.; MARTINEZ, R.C. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 29, p. 1299-1311, 2005.

BRANDÃO, M.L.; CARDOSO, S.H.; MELO, L.L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N.C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 18, p. 339-346, 1994.

BRANDÃO, M.L.; De AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 16, p. 397-402, 1982.

BRANDÃO, M.L.; TRONCOSO, A.C.; DE SOUZA SILVA, M.A.; HUSTON, J.P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, p. 225-233, 2003.

BRANDÃO, M.L.; TRONCOSO, A.C.; SOUZA SILVA, M.A.; HUSTON, J.P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, p. 225-233, 2003.

BRUDZYNSKI, S.M.; BARNABI, F. Contribution of the ascending cholinergic pathways in the production of ultrasonic vocalization in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 80, p. 145-152, 1996.

BRUDZYNSKI, S.M.; CHIU, E.M. Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. **Physiol Behav.**, v. 57, p. 1039-1044, 1995.

BRUDZYNSKI, S.M.; OCIEPA, D. Ultrasonic vocalization of laboratory rats in response to handling and touch. **Physiol Behav.**, v. 52, p. 655-660, 1992.

CARBONI, S.I.R.; GESSA, G.L.; ROSSETTI, Z.L. Ethanol prevents the glutamate release induced by N-methyl-D-aspartate receptors in the rat striatum. **Neurosci Letters**, v. 152, p. 133-136, 1990.

CARDOSO, S.H.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behav. Brain Res.*, v. 63, p. 17-24, 1994.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 27-47, 1993.

CASTILHO, V.M.; BRANDÃO, M.L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rats. **Psychopharmacol.** (Berl), v. 155, p. 154-162, 2001.

CHILDRESS, A.R.; MOZLEY, D.; McELGIN, W.; FITZGERALD, J.; REIVICH, M.; O'BRIEN, C.P. Limbic activation during cue-induced cocaine craving. **Am. J. Psychiatry**, 156: 11-18, 1999.

COIMBRA, N.C.; TOMAZ, C.; BRANDÃO, M.L. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. **Behav. Brain Res.**, v. 50, p. 77-83, 1992.

COMMISSARIS, R.L.; BECKETT, S.R.; MARSDEN, C.A. Strychnine effects on ultrasound-elicited behaviours in Lister hooded rats. **Psychopharmacol.** (Berl), v. 136, p. 162-171, 1998.

COMMISSARIS, R.L.; PALMER, A.; NEOPHYTOU, S.; GRAHAM, M.; BECKETT, S.; MARSDEN, C.A. 2000. Acoustically elicited behaviours in Lister hooded and Wistar rats. **Physiol. Behav.**, v. 68, p. 521-531, 2000.

CONELY, L.; BELL, R.W. Neonatal ultrasounds elicited by odor cues. **Dev. Psychobiol.**, v. 11, p. 193-197, 1978.

CRUZ, A.P.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 49, p. 171-176, 1994.

CUOMO, V.; CAGIANO, R.; DE SALVIA, M.A.; MASELLI, M.A.; RENNA, G.; RACAGNI, G. Ultrasonic vocalization in response to unavoidable aversive stimuli in rats: effects of benzodiazepines. **Life Sci.**, v. 43, p. 485-491, 1988.

DARWIN, C. A expressão das emoções nos homens e nos animais. 1ª edição. São Paulo, Companhia das Letras, 1872.

DAVIS, M. Effects of interstimulus interval length and variability on startle-response habituation in the rat. **J. Comp Physiol Psychol.**, v. 72, p. 177-192, 1970.

DAVIS, M. Pharmacological analysis of fear-potentiated startle. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, p. 235-260, 1993.

DAVIS, M.; ASTRACHAN, D.I.; GENDELMAN, P.M.; GENDELMAN, D.S. 5-Methoxy-N,N-dimethyltryptamine: spinal cord and brainstem mediation of excitatory effects on acoustic startle. **Psychopharmacol.** (Berl), v. 70, p. 123-130, 1980.

DEAKIN, J.F.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J. Psychopharmacol.**, v. 5, p. 305-315, 1991.

DELGADO, J.M. Cerebral structures involved in transmission and elaboration of noxious stimulation. **J. Neurophysiol.**, v. 18, p. 261-275, 1955.

DELGADO, J.M.; ROBERTS, W.W.; MILLER, N.E. Learning motivated by electrical stimulation of the brain. **Am. J. Physiol.**, v. 179, p. 587-593, 1954.

DEPAULIS, A.; KEAY, K.A.; BANDLER, R. Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region of the rat. **Exp. Brain Res.**, v. 90, p. 307-318, 1992.

DEPETRILLO, P.B.; MCDONOUGH, M.K. AWS and the AWS typology. In: **Alcohol Withdrawal Treatment Manual**, New York: Adobe Trade markers, p. 7-17, 1999.

DEVAUD, L.L.; FRITSCHY, J.M.; SIEGHART, W.; MORROW, A.L. Bidirectional alterations of GABA(A) receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. **J. Neurochem.**, v. 69, p. 126-130, 1997.

DIANA, M.; GESSA, G.L.; ROSSETTI, Z.L. Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine system. **Alcohol Alcohol.**, v. 27, p. 329-333, 1992.

DRAKE, R.E.; WALLACH, M.A. Moderate drinking among people with severe mental illness. **Hosp. Community Psychiatry**, v. 44, p. 780-782, 1993.

ENGBERG, G.; HAJOS, M. Ethanol attenuates the response of locus coeruleus neurons to excitatory amino acid agonists in vivo. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 345, p. 222-226, 1992.

ENOCH, M.A.; WHITE, K.V.; HARRIS, C.R.; ROHRBAUGH, J.W.; GOLDMAN, D. Alcohol use disorders and anxiety disorders: relation to the P300 event-related potential. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 25, p. 1293-1300, 2001.

FERNANDEZ DE, M.O.L.I.; HUNSPERGER, R.W. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. **J. Physiol**, v. 145, p. 251-265, 1959.

FILE, S.E. Chronic exposure to noise modifies the anxiogenic response, but not the hypoactivity, detected on withdrawal from chronic ethanol treatment. **Psychopharmacol.** (Berl), v. 116, p. 369-372, 1994.

FRANKLAND, P.W.; YEOMANS, J.S. Fear-potentiated startle and electrically evoked startle mediated by synapses in rostralateral midbrain. **Behav. Neurosci.**, v. 109, p. 669-680, 1995.

GLOWA, J.R.; HANSEN, C.T. Differences in response to an acoustic startle stimulus among forty-six rat strains. **Behav. Genet.**, v. 24, p. 79-84, 1994.

GOODWIN, G.A.; MOLINA, V.A.; SPEAR, L.P. Repeated exposure of rat pups to isolation attenuates isolation-induced ultrasonic vocalization rates: reversal with naltrexone. **Dev. Psychobiol.**, v. 27, p. 53-64, 1994.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 811-829, 1994.

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

GRAEFF, F.G. Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. 2ª edição. São Paulo, EPU, 1989.

GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. **Rev. Neurosci.**, v. 4, p. 181-211, 1993.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 28, p. 239-259, 2004.

GRAEFF, F.G. Brain Defense Systems and Anxiety. Amsterdam: Elsevier, 1990.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.; OLIVEIRA, R.M. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 123-131, 1993.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; MORA, P.O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 21, p. 791-799, 1997.

GRILLON, C. Startle reactivity and anxiety disorders: aversive conditioning, context, and neurobiology. **Biol. Psychiatry**, v. 52, p. 958-975, 2002.

HENNESSY, M.B.; LI, J.; LOWE, E.L.; LEVINE, S. Maternal behavior, pup vocalizations, and pup temperature changes following handling in mice of 2 inbred strains. **Dev. Psychobiol.**, v. 13, p. 573-584, 1980.

HOFER, M.A.; SHAIR, H. Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-week-old rats. **Dev. Psychobiol.**, v. 11, p. 495-504, 1978.

HOFFMAN, H.S.; FLESHLER, M. Startle reaction: modification by background acoustic stimulation. **Science**, v. 141, p. 928-930, 1963.

HOFFMAN, H.S.; ISON, J.R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychol. Rev.**, v. 87, p. 175-189, 1980.

HUNSPERGER, R.W. Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats. **Helv. Physiol Pharmacol. Acta**, v. 14, p. 70-92, 1956.

INSEL, T.R.; HILL, J.L.; MAYOR, R.B. Rat pup ultrasonic isolation calls: possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 1263-1267, 1986.

JACOBSEN, LK., STALEY, J.K., MALISON, R.T., ZOGHBI, S.S., SEIBYL, J.P., JAFFE, J.H. Transtornos Relacionados à Cocaína. Em: KAPLAN, I.H., SADOCK, B.S. et al. *Tratado de Psiquiatria Compreensiva*. Porto Alegre, Artmed, p. 883-898, 1999.

JOHNSON, E.O.; VAN DEN BREE, M.B.; GUPMAN, A.E.; PICKENS, R.W. Extension of a typology of alcohol dependence based on relative genetic and environmental loading. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 22, p. 1421-1429, 1998.

JOURDAN, D.; ARDID, D.; CHAPUY, E.; LE BARS, D.; ESCHALIER, A. Effect of analgesics on audible and ultrasonic pain-induced vocalization in the rat. **Life Sci.**, v. 63, p. 1761-1768, 1998.

KALTWASSER, M.T. Acoustic startle induced ultrasonic vocalization in the rat: a novel animal model of anxiety? **Behav. Brain Res.**, v. 43, p. 133-137, 1991.

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



KOCH, M. The neurobiology of startle. **Prog. Neurobiol.**, v. 59, p. 107-128, 1999.

KOOB, G.F. Alcoholism: allostasis and beyond. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 27, p. 232-243, 2003.

KOOB, G.F. Neurobiology of addiction. Toward the development of new therapies. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 909, p. 170-185, 2000.

KOOB, G.F.; BLOOM, F.E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242, p. 715-723, 1988.

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

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

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Neurobiology Of Addiction. **Amsterdam: Elsevier**, 2006.

KOOB, G.F.; NESTLER, E.J. The neurobiology of drug addiction. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.**, v. 9, p. 482-497, 1997.

LACERRA, C.; MARTIJENA, I.D.; BUSTOS, S.G.; MOLINA, V.A. Benzodiazepine withdrawal facilitates the subsequent onset of escape failures and anhedonia: influence of different antidepressant drugs. **Brain Res.**, v. 819, p. 40-47, 1999.

LAPPALAINEN, J.; LONG, J.C.; EGGERT, M.; OZAKI, N.; ROBIN, R.W.; BROWN, G.L.; NAUKKARINEN, H.; VIRKKUNEN, M.; LINNOILA, M.; GOLDMAN, D. Linkage of antisocial alcoholism to the serotonin 5-HT1B receptor gene in 2 populations. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 55, p. 989-994, 1998.

LEÃO-BORGES, P.C.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, p. 1027-1031, 1988.

LEDOUX, J. O Cérebro Emocional: os misteriosos alicerces da vida emocional. Rio de Janeiro, **Objetiva**. 1996.

LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci**, v. 23, p. 155-184, 2000.

LEDUC, P.A.; MITTLEMAN, G. Schizophrenia and psychostimulant abuse: a review and re-analysis of clinical evidence. **Psychopharmacol.** (Berl), v. 121, p. 407-427, 1995.

LI, Z.; DING, M.; THIELE, C.J.; LUO, J. Ethanol inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated intracellular signaling and activator protein-1 activation in cerebellar granule neurons. **Neuroscience**, v. 126, p. 149-162, 2004.

LITTLE, K.Y.; PATEL, U.N.; CLARK, T.B.; BUTTS, J.D. Alteration of brain dopamine and serotonin levels in cocaine users: a preliminary report. **Am. J. Psychiatry**, v. 153, p. 1216-1218, 1996.

LONG, J.C.; KNOWLER, W.C.; HANSON, R.L.; ROBIN, R.W.; URBANEK, M.; MOORE, E.; BENNETT, P.H.; GOLDMAN, D. Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome-wide scan in an American Indian population. **Am. J. Med. Genet.**, v. 81, p. 216-221, 1998.

LOVICK, T.A. Involvement of GABA in medullary raphe-evoked modulation of neuronal activity in the periaqueductal grey matter in the rat. **Exp. Brain Res.**, v. 137, p. 214-218, 2001.

LOVINGER, D.M. Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 356, p. 267-282, 1997.

LYONS, D.M.; BANKS, E.M. Ultrasounds in neonatal rats: novel, predator and conspecific odor cues. **Dev. Psychobiol.**, v. 15, p. 455-460, 1982.

MAJOR, L.F.; HAWLEY, R.J.; LINNOILA, M. The role of the central noradrenergic nervous system in the mediation of the ethanol intoxication and ethanol withdrawal syndrome. **Psychopharmacol. Bull.**, v. 20, p. 487-493, 1984.

MANTYH, P.W. Forebrain projections to the periaqueductal gray in the monkey, with observations in the cat and rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 206, p. 146-158, 1982a.

MANTYH, P.W. The ascending input to the midbrain periaqueductal gray of the primate. **J. Comp. Neurol.**, v. 211, p. 50-64, 1982b.

MANTYH, P.W. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat, and monkey: a Nissl, Weil, and Golgi analysis. **J. Comp. Neurol.**, v. 204, p. 349-363, 1982c.

MARKOU, A.; KOSTEN, T.R.; KOOB, G.F. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. **Neuropsychopharmacol.**, v. 18, p. 135-174, 1998.

MARLATT, G.A.; BAER, J.S.; DONOVAN, D.M.; KIVLAHAN, D.R. Addictive behaviors: etiology and treatment. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 39, p. 223-252, 1988.

MARLATT, G.A.; SOMERS, J.M.; TAPERT, S.F. Harm reduction: application to alcohol abuse problems. Review. **NIDA Res. Monogr.**, v. 66, p. 137-147, 1993.

MARTIJENA, I.D.; CALVO, N.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V.A. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. **Brain Res.**, v. 752, p. 136-142, 1997.

MARTIJENA, I.D.; LACERRA, C.; BUSTOS, S.G.; MOLINA, V.A. Chronic benzodiazepine administration facilitates the subsequent development of ethanol dependence. **Brain Res.**, v. 891, p. 236-246, 2001.

MCKINZIE, D.L.; SAJDYK, T.J.; MCBRIDE, W.J.; MURPHY, J.M.; LUMENG, L.; LI, T.K.; SHEKHAR, A. Acoustic startle and fear-potentiated startle in alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) lines of rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, p. 691-696, 2000.

MONTGOMERY, K.C.; MONKMAN, J.A. The relation between fear and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 48, p. 132-136, 1955.

MORROW, A.L.; MONTPIED, P.; LINGFORD-HUGHES, A.; PAUL, S.M. Chronic ethanol and pentobarbital administration in the rat: effects on GABAA receptor function and expression in brain. **Alcohol**, v. 7, p. 237-244, 1990.

MURRAY, C.J.; LOPEZ, A.D. Global Health Statistics: Global Burden of Disease and Injury Series. **Geneve: World health organization**, 1996.

NASHOLD, B.S.; JR., WILSON, W.P.; SLAUGHTER, D.G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **J. Neurosurg.**, v. 30, p. 14-24, 1969.

NOBRE, M.J.; BORELLI, K.G.; BRANDÃO, M.L. Fast-acting excitatory amino acids are involved in the enhancement of the aversiveness of the electrical stimulation of the inferior colliculus by systemic injections of muscimol. **Life Sci.**, v. 71, p. 2961-2972, 2002.

NOBRE, M.J.; BRANDÃO, M.L. Analysis of freezing behavior and ultrasonic vocalization in response to foot-shocks, ultrasound signals and GABAergic inhibition in the inferior colliculus: effects of muscimol and midazolam. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 14, p. 45-52, 2004.

NOBRE, M.J.; SANDNER, G.; BRANDÃO, M.L. Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. **Hear. Res.**, v. 184, p. 82-90, 2003.

NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. 5-HT mediation of the antiaversive effect of isamoltane injected into the dorsal periaqueductal grey. **Behav. Pharmacol.**, v. 2, p. 73-77, 1991.

NUNES MAMEDE ROSA, M.L.; NOBRE, M.J.; RIBEIRO, O.A.; BRANDÃO, M.L. Isolation-induced changes in ultrasonic vocalization, fear-potentiated startle and prepulse inhibition in rats. **Neuropsychobiol.**, 51, 248-255, 2005.

NUTT, D.; GLUE, P.; MOLYNEUX, S.; CLARK, E. Alpha-2-adrenoceptor function in alcohol withdrawal: a pilot study of the effects of iv. clonidine in alcoholics and normals. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 12, p. 14-18, 1988.

NUTT, D.J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacol. Ther.**, v. 47, p. 233-266, 1990.

O'NEILL, J.; CARDENAS, V.A.; MEYERHOFF, D.J. Effects of abstinence on the brain: quantitative magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopic imaging in chronic alcohol abuse. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 25, p. 1673-1682, 2001.

OLDS, J. Self-stimulation experiments. **Science**, 140, 218-220, 1963.

OLDS, M.E.; OLDS, J. Approach-escape interactions in rat brain. **Am. J. Physiol.**, v. 203, p. 803-810, 1962.

OLDS, M.E.; OLDS, J. Approach-avoidance analysis of rat diencephalon. **J. Comp. Neurol.**, v. 120, p. 259-295, 1963.

OLIVEIRA, L.C.; NOBRE, M.J.; BRANDÃO, M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the Periaqueductal gray. **Neuroreport.**, v. 15, p. 2281-2285, 2004.

OSWALT, G.L.; MEIER, G.W. Olfactory, thermal, and tactual influences on infantile ultrasonic vocalization in rats. **Dev. Psychobiol.**, v. 8, p. 129-135, 1975.

OVERSTREET, D.H.; KNAPP, D.J.; BREESE, G.R. Accentuated decrease in social interaction in rats subjected to repeated ethanol withdrawals. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 26, p. 1259-1268, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 3<sup>rd</sup> edition. **New York: Academic Press**, 1997.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 525-529, 1986.

PINEL, J.P.J. **Biopsychology**. Boston: Allyn & Bacon, 1990.

PLAPPERT, C.F.; PILZ, P.K.; SCHNITZLER, H.U. Acoustic startle response and habituation in freezing and nonfreezing rats. **Behav. Neurosci.**, v. 107, p. 981-987, 1993.

PRESCOTT, C.A.; KENDLER, K.S. Genetic and environmental contributions to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of male twins. **Am. J. Psychiatry**, v. 156, p. 34-40, 1999.

RAMCHANDANI, V.A.; BOSRON, W.F.; LI, T.K. Research advances in ethanol metabolism. **Pathol. Biol. (Paris)**, v. 49, p. 676-682, 2001.

RASMUSSEN, D.D.; MITTON, D.R.; GREEN, J.; PUCHALSKI, S. Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 25, p. 999-1005, 2001.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, p. 444-445, 1969.

RIZVI, T.A.; ENNIS, M.; BEHBEHANI, M.M.; SHIPLEY, M.T. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **J. Comp. Neurol.**, v. 303, p. 121-131, 1991.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus maze: pharmacology, methodology and ethology. **Ethology and Psychopharmacology**, p. 9-44, 1994.

RODRIGUEZ MANZANARES, P.A.; ISOARDI, N.A.; CARRER, H.F.; MOLINA, V.A. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 8725-8734, 2005.

RORICK, L.M.; FINN, P.R.; STEINMETZ, J.E. High-alcohol-drinking rats exhibit persistent freezing responses to discrete cues following Pavlovian fear conditioning. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 76, p. 223-230, 2003.

ROSENZWEIG, M.R.; LEIMAN, A.L.; BREEDLOVE, S.M. *Biological Psychology*. 2<sup>nd</sup> edition. **Sunderland: Sinauer Associates**, 1999.

ROSSETTI, Z.L.; CARBONI, S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 283, p. 177-183, 1995.

ROSSETTI, Z.L.; HMAIDAN, Y.; GESSA, G.L. Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 221, p. 227-234, 1992a.

ROSSETTI, Z.L.; MELIS, F.; CARBONI, S.; DIANA, M.; GESSA, G.L. Alcohol withdrawal in rats is associated with a marked fall in extraneuronal dopamine. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 16, p. 529-532, 1992b.

SALES, G.; PYE, G. *Ultrasonic Communication by Animals*. **London: Chapman & Hall**, 1974.

SANTOS, J.M.; GARGARO, A.C.; OLIVEIRA, A.R.; MASSON, S.; BRANDÃO, M.L. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by



freezing behavior and fear-potentiated startle. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 15, p. 239-246, 2005.

SATEL, S.L.; KRYSTAL, J.H.; DELGADO, P.L.; KOSTEN, T.R.; CHRANEY, D.S. Tryptophan depletion and attenuation of cue-induced craving for cocaine. **Am. J. Psychiatry**, v. 152, p. 778-783, 1995.

SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRE, E.C.; VARGAS, L.C. Modeling panic attacks. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, p. 647-659, 2001.

SCHENBERG, L.C.; GRAEFF, F.G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 9, p. 287-295, 1978.

SCHMIDT, L.; ROOM, R. Cross-cultural applicability in international classifications and research on alcohol dependence. **J. Stud. Alcohol**, v. 60, p. 448-462, 1999.

SCHMITT, P.; CARRIVE, P.; DI SCALA, G.; JENCK, F.; BRANDÃO, M.L.; BAGRI, A.; MOREAU, J.L.; SANDNER, G. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. **Behav. Brain Res.**, v. 22, p. 181-190, 1986.

SCHMITT, P.; KARLI, P. Escape induced by combined stimulation in medial hypothalamus and central gray. **Physiol. Behav.**, v. 24, p. 111-121, 1980.

SCHULTEIS, G.; MARKOU, A.; COLE, M.; KOOB, G.F. Decreased brain reward produced by ethanol withdrawal. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, p. 5880-5884, 1995.

SCHULTEIS, G.; YACKEY, M.; RISBROUGH, V.; KOOB, G.F. Anxiogenic-like effects of spontaneous and naloxone-precipitated opiate withdrawal in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 60, p. 727-731, 1998.

SPOONER, C.; MATTICK, R.P.; NOFFS, W. A study of the patterns and correlates of substance use among adolescents applying for drug treatment. **Aust. N. Z. J. Public Health**, v. 24, p. 492-502, 2000.

TABAKOFF, B. Current trends in biologic research on alcoholism. **Drug Alcohol Depend.**, v. 11, p. 33-37, 1983.

TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.; MOSES, F. Neurochemical correlates of ethanol withdrawal: alterations in serotonergic function. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 29, p. 471-476, 1977.

TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. Measures of physical dependence and involvement of serotonin in withdrawal symptomatology. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 85a, p. 547-557, 1977.

TAKAHASHI, L.K.; THOMAS, D.A.; BARFIELD, R.J. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by residents during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). **J. Comp. Psychol.**, v. 97, p. 207-212, 1983.

TOMAZINI, F.M.; REIMER, A.; BRECHET-SOUZA, L.; BRANDÃO, M.L. Opposite effects of short- and long-duration isolation on ultrasonic vocalization, startle and prepulse inhibition in rats. **J. Neurosci Methods**, v. 153, p. 114-120, 2006.

TONOUE, T.; ASHIDA, Y.; MAKINO, H.; HATA, H. Inhibition of shock-elicited ultrasonic vocalization by opioid peptides in the rat: a psychotropic effect. **Psychoneuroendocrinol.**, v. 11, p. 177-184, 1986.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, p. 463-469, 1993.

VIANNA, D.M.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Learn. Mem.**, v. 8, p. 164-169, 2001a.

VIANNA, D.M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, p. 711-719, 2001b.

VIVIAN, J.A.; FARRELL, W.J.; SAPPERSTEIN, S.B.; MICZEK, K.A. Diazepam withdrawal: effects of diazepam and gepirone on acoustic startle-induced 22 kHz ultrasonic vocalizations. **Psychopharmacol. (Berl)**, v. 114, p. 101-108, 1994.

WALKER, D.L.; DAVIS, M. Anxiogenic effects of high illumination levels assessed with the acoustic startle response in rats. **Biol. Psychiatry**, v. 42, p. 461-471, 1997.

WHO. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. **Geneve: World Health organization**, 1992.

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

WISE, R.A. Drug-activation of brain reward pathways. **Drug Alcohol Depend.**, v. 51, p. 13-22, 1998.

WOHR, M.; BORTA, A.; SCHWARTING, R.K. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 84, p. 228-240, 2005.

WOODS, J.W. Behavior of chronic decerebrate rats. **J. Neurophysiol.**, v. 27, p. 635-644, 1964.

ZURITA, A.; MARTIJENA, I.; CUADRA, G.; BRANDÃO, M.L.; MOLINA, V. Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. **Behav. Brain Res.**, v. 117, p. 163-171, 2000.

---

**ANEXO**



## Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG

A. Cabral, N. Isoardi, C. Salum, C.E. Macedo, M.J. Nobre, V.A. Molina, M.L. Brandão\*

*Laboratório de Psicobiologia, Departamento de Psicologia, FFCLRP, Campus USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil*  
*Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina*

Received 2 January 2006; revised 1 February 2006; accepted 6 February 2006

Available online 19 April 2006

### Abstract

The neural substrate underlying the aversive effects induced by ethanol abstinence is still unclear. One candidate for such effects is the dorsal periaqueductal gray (dPAG), a core structure of the brain aversion system. The main aim of this study is to examine the role of the dPAG as a possible locus of the aversive effects following abrupt alcohol withdrawal. To this end, rats were subjected to an oral ethanol self-administration procedure, in which animals were offered 6–8% (v/v) ethanol solution for a period of 21 days followed by an abrupt discontinuation of the treatment on the two subsequent days. Control animals received control dietary fluid for similar periods of time. The effects of ethanol withdrawal were examined in the elevated plus-maze (EPM) (Exp. I), on the prepulse inhibition of startle to loud sounds (Exp. II) and on the freezing and escape responses induced by electrical stimulation of the dPAG (Exp. III). In Experiment III, rats were implanted with an electrode aimed at the dPAG and the number and duration of ultrasonic vocalizations (USVs) were also recorded in the rats that received dPAG stimulation at freezing and escape thresholds. Data obtained showed that ethanol withdrawal elicited significant “anxiety-like” behaviors, as revealed by the decrease in the number of entries into and time spent onto the open arms of the EPM. Startle reflex and prepulse inhibition remained unchanged in withdrawn animals. In addition, discontinuation from the chronic ethanol regimen caused a reduction in the stimulation thresholds for freezing and escape and in the number and duration of USVs. Together, these effects have been interpreted in the frame of a high fear state elicited by activation of the dPAG. These findings are indicative that ethanol withdrawal sensitizes the substrates of fear at the level of this midbrain structure.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Ethanol withdrawal; Freezing; Escape; Ultrasonic vocalizations; Startle, dorsal periaqueductal gray

### Introduction

It is well established that chronic ethanol administration leads to tolerance and dependence (Koob and Bloom, 1988; Rossetti et al., 1992). Similar to other drugs of abuse, dependence to ethanol has been mainly demonstrated through the expression of a withdrawal syndrome (Schulteis et al., 1995). Abrupt cessation from chronic ethanol administration induces a withdrawal syndrome characterized, among other symptoms, by tremors, agitation, general rigidity, spontaneous seizures, increased sensitivity to audiogenic as well as handling-

induced seizures and weight loss (Pohorechy and Brick, 1990). In addition to the peculiar somatic signs of withdrawal, the interruption from persistent intake with most drugs of abuse, including ethanol, can promote disturbances in affective states and emotionality, in particular, high levels of “anxiety” (Markou et al., 1998; Koob and Le Moal, 2006). For instance, an elevation of intracranial self-stimulation threshold – an index of negative emotional state – has been reported following withdrawal from ethanol, nicotine and opiates and psychostimulants such as cocaine and amphetamine (Epping-Jordan et al., 1998; Tyrer, 1988; Pontieri et al., 1995). Moreover, exaggerated emotional reactions have also been observed in abstinent ethanol animals when exposed to a mild stress that did not induce behavioral disturbances in control animals (Valdez et al., 2003). In addition, alcohol-preferring animals are more responsive to both startle-alone and

\* Corresponding author. Laboratório de Psicobiologia, Departamento de Psicologia, FFCLRP, Campus USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Fax: +55 16 3602 4830.

E-mail address: [mbrandao@usp.br](mailto:mbrandao@usp.br) (M.L. Brandão).

potentiated startle stimuli following fear conditioning (McKinzie et al., 2000) and high-alcohol-drinking rats exhibited an excessive fear reaction in standard fear conditioning tasks (Rorick et al., 2003). Finally, exposure to multiple withdrawals from moderate amounts of ethanol induces sensitization of anxiety-like behavior (Overstreet et al., 2002). All these findings support the contention that prior experience with ethanol withdrawal facilitates the occurrence of exaggerated negative emotional responses, mainly fear and “anxiety”, to environmental challenges.

A growing amount of evidence has demonstrated that the activation of some mesencephalic structures, particularly the dorsal periaqueductal gray (dPAG), a central structure of the so-called brain aversion system, produces several behavioral and somatic responses characteristic of high fear states that resemble panic attacks (Brandão et al., 1999; Vianna et al., 2001), similar to those observed in animals confronted by predators or by dangerous environmental cues (Graeff, 1990, 2004; Brandão et al., 1999). Similar behavioral and somatic changes have also been reported during alcohol withdrawal (Johnston et al., 1991; Thevos et al., 1991). In this context, drugs that alleviate anxiety in clinical patients or laboratory animals submitted to stress also reduce the anxiety induced by ethanol withdrawal (Saitz and O'Malley, 1997). However, in spite of several studies that report, among other clinical disturbances, high anxiety in ethanol-withdrawn patients as one of the main causes of relapse, relative few studies have examined the neural substrates of the defensive behavior related to the fear/anxiety symptoms following abstinence from chronic ethanol intake.

Freezing, escape, autonomic responses and reduction in the emissions of ultrasonic vocalizations (USVs) are part of the defensive repertoire expressed by animals electrically stimulated at the dPAG. Changes in the sensory gating have also been reported following this stimulation (see Brandão et al., 2005 for a review). The aversive state generated and elaborated in the dPAG is a multifaceted process with sensory, behavioral and autonomic components, and the electrical stimulation of this structure has been used as a model of panic attack (Graeff, 1990, 2004; Brandão et al., 1999, 2005). While the effects of ethanol withdrawal in anxiety have been well investigated (see Kliethermes, 2005 for a review), no study has been conducted on the possibility of activation of the sensory gating of the neural substrates of the defense reaction of the dPAG during this condition. Based on this evidence, the present study was designed to evaluate whether the dPAG could be implicated in the fear state induced by withdrawal from chronic ethanol intake. Thus, in the first part of the present study, general levels of anxiety and sensory processing activity in ethanol-withdrawn animals were assessed by the elevated plus-maze test (EPM) and prepulse inhibition procedure, respectively. In the second part of the study, other groups of rats abstinent from chronic ethanol were evaluated in their reactivity to electrical stimulation of the dPAG at the freezing and escape thresholds and their ability to emit USVs contingent to this dPAG electrical stimulation procedure.

## Materials and methods

### *Animals*

Male Wistar rats, weighing 180 g in the average, from the animal house of the Campus of Ribeirão Preto of the University of São Paulo were used. After arrival in the sectorial animal house of the laboratory, these animals were housed in plastic cages under 12:12 dark/light cycle (lights on at 07:00 h) at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  and given free access to water throughout the experiment. The experiments reported in this article were performed in compliance with the recommendations of SBNeC (Brazilian Society of Neuroscience and Behavior), which are based on the US National Institutes of Health *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

### *Chronic ethanol intake*

The treatment selected to promote chronic ethanol intake was a forced procedure of fluid dietary intake via drinking an alcohol containing liquid diet. The animals were housed in groups of four by cages ( $40 \times 33 \times 18$  cm) throughout the experiment. While water was daily available to the animals during the whole period of the experiment, they had free access to food only during the 3 days before the beginning of the treatment. After that, in the two subsequent days, two bottles (120 ml each) containing only a dietary base composed by Sustagen M (chocolate flavor, Mead Johnson) were available to the animals. Sustagen is a ready-to-feed liquid formula providing protein, carbohydrate and fat plus vitamins and mineral salts corresponding to an amount of 1.1 kcal/ml (17.11 g of Sustagen M/60 ml of water by rat/day) and was the only source of food daily available to the animals (Bond and Di Giusto, 1976; Stegink et al., 1983). From this point on, the animals were randomly assigned to two experimental groups: (1) control and (2) ethanol withdrawal. For the control group, the dietary base without alcohol (control regimen) was available for the whole period of the test while the animals of the ethanol withdrawal group were subjected to the ethanol intake procedure for a period of 21 days followed by an abrupt discontinuation of the treatment on the two subsequent days. Then, for this experimental group, the diet was added with different concentrations of ethanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ). In the first 2 days of treatment, ethanol concentration was 6% (v/v). After that period until the end of the treatment (3rd to 21st day), the ethanol concentration (v/v) was increased to 8%. On days 22 and 23, both groups (control and ethanol withdrawal groups) received the same dietary base without ethanol. The interruption of this chronic schedule of drug intake has been reported to induce clear signs of ethanol withdrawal (Martijena et al., 2001). Control animals received the same dietary base without ethanol. Regardless of the experimental group, the animals consumed the whole diet available every day. Water was available to both experimental groups throughout the experiment. The body weights of the control and ethanol withdrawal groups on the day 21 of the regimen were  $246.58 \pm 3.12$  and  $244.33 \pm 5.46$ , respectively. The choice of



the 48 h interval was based on pilot experiments conducted at this laboratory.

### *Experiment I*

#### *Ethanol withdrawal in rats submitted to the elevated plus-maze test*

**Experimental apparatus.** The elevated plus-maze was made of wood and had two open arms (50 × 10 cm), perpendicular to two enclosed arms of the same size, with 50-cm-high walls. The apparatus was elevated 50 cm from the floor (Pellow et al., 1985; Pellow and File, 1986). To avoid falls, a 3-mm wooden rim surrounded the open arms. The apparatus was located inside of a room with a constant noise (50 dB). The behavior of the animals was recorded by a video camera (Everfocus, USA) positioned above the maze allowing the discrimination of all behaviors, with the signal relayed to a monitor in another room via a closed-circuit TV camera. Luminosity at the level of the open arms of the plus-maze was 20 lx. The maze was cleaned thoroughly after each test using damp and dry cloths.

**Experimental procedure.** Animals were randomly assigned to control or ethanol withdrawal groups ( $n = 12$  for each group). Experimental sessions were conducted between 12:00 and 18:00 h, 48 h after the period of deprivation of ethanol intake. Rats were placed individually in the center of the plus-maze facing an enclosed arm and allowed 5 min of free exploration of the maze. An observer trained in measuring ethological plus-maze parameters subsequently scored the videotapes. The behavioral categories were scored using ethological analysis software (Observer) developed by Noldus (Netherlands). This software allowed measurement of the number of entries in both arms and the time spent in different parts of the maze. Using separate location and behavioral keys, this software allows the real-time scoring of videotapes by direct keyboard entry to a PC. This software only records the next behavior after a “stop” key is pressed, thus allowing for the recording of duration and frequency of any behavior. An arm entry or exit being defined as all four paws into or out of an arm, respectively. These data were used to calculate percentage of open arm entries and percentage of time spent in open arms. A thorough description of the use of the EPM test in this laboratory is found elsewhere (Anseloni and Brandão, 1997; Anseloni et al., 1995).

**Statistical analysis.** The data obtained in the EPM test performed on day 23 (48 h after the ethanol withdrawal) were analyzed using two-tailed Student's *t* test, for each variable in study. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

### *Experiment II*

#### *Ethanol withdrawal on startle response and prepulse inhibition*

**Startle apparatus.** Two separate stabilimeter devices were used simultaneously to record the amplitude of the startle response (ASR) and prepulse inhibition of the control ( $n = 16$

or the ethanol withdrawal group ( $n = 15$ ). Animals were placed in a stabilimeter, which consisted of a wire-mesh cage (16.5 × 5.1 × 7.6 cm) suspended within a PVC frame (25 × 9 × 9 cm), which was attached to the response platform with 4 thumbnail screws. The stabilimeter and platform were located inside a ventilated plywood sound-attenuating chamber (64 × 60 × 40 cm). The floor of the stabilimeter consisted of six stainless steel bars 3.0 mm in diameter spaced 1.5 mm apart. The startle reaction of the rats generated a pressure on the response platform, and analog signals were amplified, digitized and analyzed by a software (Startle reflex, version 4.10, Med Associates Inc., St. Albans, VT, USA), which also controlled all parameters of the session (intensity of the acoustic stimulus, inter-stimulus interval [ISI], etc.). The startle amplitude was recorded within a time window of 100 ms after the onset of the startle stimulus. A loudspeaker located 10 cm behind the wire-mesh cage was used to deliver both the acoustic startle stimuli and a continuous background noise (white noise, 55 dB). Calibration procedures were conducted before the experiments to ensure equivalent sensitivities of the response platforms over the test period. Animal behavior was recorded by a video camera (Everfocus, San Marino, CA, USA) located behind the stabilimeter, allowing the discrimination of all possible behaviors, with the signal being relayed to a monitor in another room via a closed circuit. A red light bulb (6.0 W) was located on the floor of the isolation chamber to provide illumination for the camera.

**Procedure.** Most of the experimental conditions of this study were described previously (Silva et al., 2004). The acoustic startle test session for measuring the startle and the prepulse inhibition (PPI) consisted of three parts. The first was a 5-min period of acclimatization to the startle test chamber. No acoustic startle stimuli were presented during this period. The second part consisted of ten presentations of an acoustic startle stimulus (100 dB, 50 ms bursts of white noise having a rise–decay time of 5 ms) with an inter-stimulus interval of 30 s. The purpose was to determine the baseline startle response and to allow within-session habituation to the startle stimulus. The third part tested the PPI modulation of the acoustic startle. It consisted of 60 trials divided into three different categories (20 trials each), i.e., pulse alone (startle stimulus, 100 dB of white noise, 50 ms), prepulse alone (80 dB of pure tone, 3.000 Hz frequency, 20 ms) and prepulse + pulse (with a 30-ms interval between them), presented in random order with an inter-stimulus interval of 30 s. The testing session lasted 50 min. The startle response amplitudes obtained from this experiment were stored on a hard disk and subsequently transferred to tables in a spreadsheet program for the off-line analysis.

**Statistical analysis.** The results from startle and PPI tests are all reported as mean + SEM. Startle response amplitudes were averaged for each animal across the entire session and used as the data for statistical analysis. A two-way ANOVA with repeated measures was conducted on the startle responses to the pulse (loud noise) and to the prepulse (weak sound) + pulse. The factor treatment refers to the alcohol and control regimens, and



the factor condition refers to pulse alone and prepulse + pulse. This analysis was followed by the Newman–Keuls test.

The results of the prepulse inhibition are reported as %PPI ( $100 \times$  mean startle magnitude on “prepulse + pulse” stimulus divided by the mean startle magnitude on “pulse” alone) and significant group differences assessed by the *t* test of Student. A probability level of  $P < 0.05$  was considered to be significant.

### Experiment III

#### *Ethanol withdrawal on the reactivity of the dPAG stimulation and USVs*

**Surgery.** After the arrival, animals were randomly assigned to two groups, named control or ethanol withdrawal ( $n = 10$  in each group). After 3 days of habituation, the animals were adapted, on two subsequent days, to the dietary scheme. After that, ethanol and control regimens started. Surgeries were performed on day 16 5 days before the end of treatment. Longer post-surgery periods use to cause problems such as loose prothesis, infections, etc. The animals were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, ip) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf, USA). A bipolar electrode was implanted in the dPAG. The upper incisor bar was set at 2.5 mm below the interaural line in such a way that the skull was horizontal between bregma and lambda. The electrode was introduced vertically using the following coordinates (Paxinos and Watson, 1997) with the bregma serving as the reference for each plane: postero-anterior,  $-7.5$  mm; medio-lateral, 0.6 mm; and dorso-ventral, 5.0 mm. The electrode was fixed to the skull by means of acrylic resin and three stainless steel screws.

#### *Apparatus*

**Brain stimulation.** The experimental setting where brain stimulation was delivered consisted of a box  $25 \times 20 \times 20$  cm, with walls made of Plexiglas. The floor was made of stainless steel bars with 5 mm diameter 1.5 cm far from each other. This box was placed inside a sound attenuation chamber made of plywood, illuminated from within by an ordinary 5 W lamp, and with a 78 dB permanent background noise, delivered by a fan. The behavior of the animals was recorded by a video camera positioned next to the experimental box and monitored via a closed circuit TV camera. The box was cleaned with a 5% ammonium solution immediately before each animal was placed inside it. The brain was stimulated electrically by means of a sine wave stimulator (Del Velchio, Brazil). The stimulation current was monitored by measuring the voltage drop across a 1 K resistor with an oscilloscope (Philips, USA).

**Procedure.** Independent groups of animals were used for evaluating the effects of ethanol withdrawal on freezing and escape thresholds. The animals were assigned to two groups ( $n = 10$  in each group): (a) control; (b) ethanol. The animals were handled for 5 min and then placed in the experimental box, where they were left undisturbed for a 5-min period of habituation. After that, the brain electrical stimulation procedure

started. Brain stimuli (AC, 60 Hz, 15 s) were presented at random intervals (30 to 120 s) with the current intensity increasing by steps of 5  $\mu$ A for measurements of the current thresholds for freezing and escape behaviors. Freezing threshold was defined as the lowest intensity producing a complete immobility except the movements for respiration. The escape threshold was defined as the lowest current intensity that produced running or jumping in two successive ascending series of electrical stimulation. Immediately after the determination of the freezing or escape thresholds, the ultrasonic vocalization was registered during 5 min. Animals with an escape threshold above 200  $\mu$ A (peak-to peak) were discarded from the experiment.

**Ultrasonic vocalizations.** For recording and analysis of ultrasound vocalizations (USV), four ultrasonic microphones (Ultrasound Advice, UK, 20–160 kHz) were mounted in the chamber (one in each lateral and two in the rear walls) and connected to bat detectors (Noldus Instruments, Netherlands). Signals from the broadband output of the bat detectors were plugged to audio filters (0.1–20 kHz) and then fed into a computer. Response frequencies and duration in seconds were analyzed by a sonograph (Ultravox signal analysis work station, Noldus Instruments, Netherlands). In addition to the ultrasound monitoring system, all experiments were monitored live by a trained investigator through the closed circuit TV camera described above in the section Apparatus.

**Histology.** Upon completion of the experiments, the animals were deeply anesthetized with urethane and perfused intracardially with saline 0.9% followed by formalin solution (10%) and, 3 h later, immersed in a sucrose solution (30%). Seven days later, the brains were frozen. Serial 60- $\mu$ m brain sections were cut using a microtome in order to localize the positions of the electrode tips according to the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1997).

**Statistical analysis.** Data are reported as mean  $\pm$  SEM. The freezing and escape behaviors scored following treatments were subjected independently to Student's *t* test. USVs were analyzed by two-way ANOVA with repeated measures. The factor group refers to alcohol and control regimens, and the factor condition refers to the recorded USV frequencies. Student Newman–Keuls post hoc comparisons were carried out whenever significant overall *F* values were obtained. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

### *Experiment I*

The first experiment was delineated to evaluate the influence of ethanol withdrawal on the “anxiety” level of rats tested in the EPM. Our results showed that the discontinuation of a chronic ethanol intake leads to increased open arm avoidance in this animal model of anxiety. Fig. 1 shows that these animals showed a significant reduction in both the frequency of entries ( $t_{22} = 2.45$ ;  $P < 0.05$ ) and in the percentage of time ( $t_{22} = 2.24$ ;

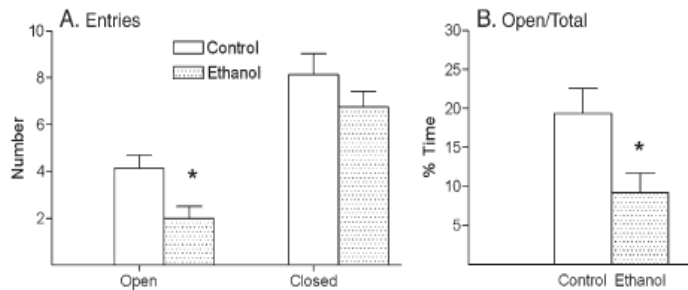


Fig. 1. Mean ( $\pm$ SEM) of the number of entries into the open and closed arms (left) and percentage of time spent onto the open arms in relation to the total time of test in control and in rats under 48 h of alcohol withdrawal (right). \* $P < 0.05$  in relation to control group, Student's  $t$  test.

$P < 0.05$ ) spent on open arms. Student's  $t$  test also showed no significant difference in the number of entries in the closed arms between control and abstinent animals ( $t_{22} = 0.98$ ;  $P > 0.05$ ).

#### Experiment II

The magnitude of the startle reflex in the two groups of rats is depicted in Fig. 2. Two-way ANOVA with repeated measures revealed that there were no significant effects of treatments ( $F_{1,29} = 0.23$ ,  $P > 0.05$ ) but there were significant effects of condition ( $F_{1,29} = 35.51$ ,  $P < 0.05$ ). There was no interaction between treatments and condition ( $F_{1,29} = 0.48$ ,  $P > 0.05$ ). Post hoc comparisons indicated a significant decrease in the startle reflex in the prepulse  $\pm$  pulse condition in both groups of animals. Student's  $t$  test showed no statistical difference between groups in the %PPI ( $t_{29} = -1.61$ ;  $P > 0.05$ ).

#### Experiment III

##### Aversive thresholds

A representative site of dPAG stimulations as well as the location of the tips of the electrodes inside the dorsal part of the PAG is shown in Fig. 3. Five animals were discarded because of problems with the electrode. In the control group, as the intensity of the current applied to the dPAG was increased, the animals suddenly stopped, became immobile and often urinated and defecated. With higher intensities, freezing behavior was followed by vigorous running and jumping. As shown in Fig. 4, animals submitted to ethanol withdrawal showed a decrease in

the stimulation current for producing freezing and escape compared to the group under continuous intake of control dietary solution during the experiment. Student's  $t$  test performed on these data showed a statistical decrease in freezing ( $t_{18} = 3.79$ ;  $P < 0.05$ ) and escape ( $t_{18} = 3.70$ ;  $P < 0.05$ ) thresholds in the ethanol withdrawal group as compared to control rats.

##### Ultrasound vocalization

Figs. 5A and B show the mean number and duration of USVs emitted at the frequencies of 18, 20, 22 and 24 kHz soon after dPAG electrical stimulation at the freezing threshold following discontinuation of chronic ethanol intake. The number and duration of USVs at 18 to 24 kHz recorded after dPAG stimulation at the freezing threshold were subjected to a two-way analysis of variance (treatments vs. frequencies) with repeated measures (frequencies). This analysis showed significant effects of treatments on the emission ( $F_{1,54} = 22.05$  and 10.29, for number and duration, respectively;  $P < 0.05$  in both cases) and frequencies ( $F_{3,54} = 6.80$  and 8.06, for number and duration, respectively;  $P < 0.05$ ) of USVs elicited during freezing. There was significant interaction between treatments vs. frequencies ( $F_{3,54} = 3.18$  and 4.34, for number and duration, respectively;  $P < 0.05$  in both cases). Post hoc comparisons revealed that ethanol withdrawal decreased the number and duration of USVs at the frequencies of 20 and 22 kHz.

Figs. 5C and D show the mean number and duration of USVs emitted at the frequencies of 18, 20, 22 and 24 kHz soon after dPAG electrical stimulation at the escape threshold following

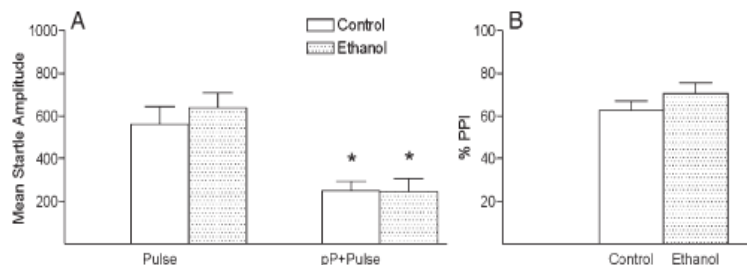


Fig. 2. Effects of the abrupt discontinuation of ethanol intake on the startle reflex to loud noise (A) and prepulse inhibition of the startle (B). The tests were performed 48 h after the withdrawal of the ethanol intake for 21 days. Values represent mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. pP = prepulse.



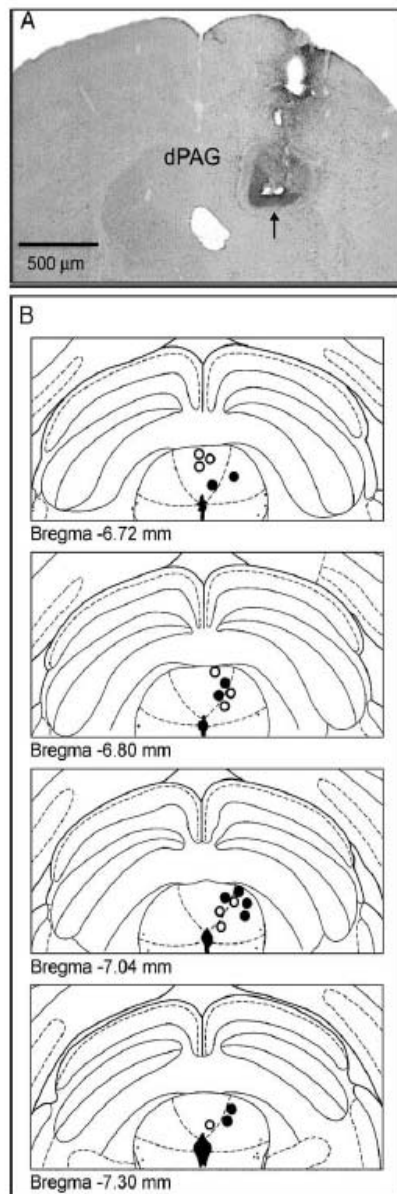


Fig. 3. (A) Representative photomicrograph of a site of dPAG stimulation. Scale bar represents 500  $\mu\text{m}$ . (B) Location of the tips of the electrodes implanted into the dPAG. The figures in millimeters above the diagrams indicate the coordinates of the Paxinos and Watson (1997) atlas.

discontinuation of chronic ethanol intake. The number and duration of USVs at 18 to 24 kHz recorded after dPAG stimulation at the escape threshold were subjected to a similar statistical analysis. There were significant effects of treatments on the emission ( $F_{1,54} = 10.59$  and  $10.54$ , for number and duration, respectively;  $P < 0.05$  in both cases) and frequencies ( $F_{3,54} = 12.38$  and  $15.34$ , for number and duration, respectively;  $P < 0.05$ ) of USVs elicited during escape. There was significant interaction between treatments vs. frequencies ( $F_{3,54} = 4.81$  and  $5.04$ , for number and duration, respectively;  $P < 0.05$  in both cases). Post hoc comparisons revealed that ethanol withdrawal

decreased the number and duration of USVs at the frequencies of 20 and 22 kHz.

## Discussion

The EPM was first validated as a test of anxiety-related behaviors for rats, and it is frequently considered as a “primer” test for measuring these types of behavior (Pellow and File, 1986; Anseloni and Brandão, 1997; Anseloni et al., 1995). The use of the EPM test for evaluating the aversive state of the animals is based on the fact that anxiety is considered to be one of the main symptoms of the ethanol withdrawal syndrome (Devaud et al., 1999; Wilson et al., 1998). In this work, rats submitted to a period of deprivation of chronic ethanol intake display anxiety-like behaviors when tested in the EPM. In fact, animals under ethanol deprivation stayed more time inside the close arms and entered fewer times in the open arms of the EPM, when compared to controls, displaying a typical “anxiogenic-like” profile for this test. In this way, ethanol withdrawal induces an “anxiety state” in the EPM determined 48 h after the cessation of ethanol intake. The decrease in the time spent in the open arms cannot be attributed to unspecific changes in motor activity induced by this condition since the frequency of entries into the closed arms was not statistically different in control and ethanol-deprived animals. The present results confirm previous reports on chronic ethanol treatment showing increased anxiety-like behaviors after the abrupt interruption from chronic ethanol administration (File, 1994; Rasmussen et al., 2001). In general, ethanol withdrawal decreases most or all of the individual behaviors recorded in this task, indicating the occurrence of an anxiogenic-like effect of withdrawal in rodents (see Kliethermes, 2005 for a review). This effect is opposite to the anxiolytic-like effects of the ethanol (Martijena et al., 2001). The proaversive effects produced by ethanol withdrawal as evaluated by the EPM test are a non-reinforced, unconditioned response and could well be due to the stimulation of the dPAG, as will be discussed below.

As to the attention mechanisms of the animals under ethanol withdrawal, there was no attentional deficit as the prepulse inhibition is not altered in animals deprived of ethanol when compared with controls. Thus, taken together, it seems that rats

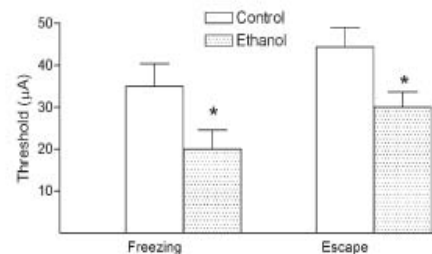


Fig. 4. Effects of the abrupt discontinuation of ethanol intake on the aversive thresholds (freezing and escape) determined by the procedure of the electrical stimulation of the dPAG. The tests were performed 48 h after the discontinuation of the ethanol intake during a period of 21 days. Values represent mean + SEM. \* $P < 0.05$  in relation to control group, Student's  $t$  test.

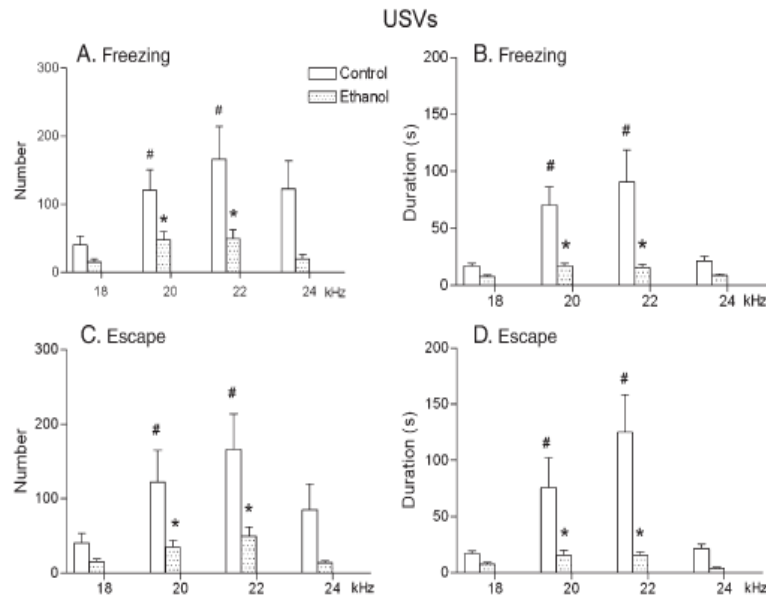


Fig. 5. Mean (+SEM) of the number and duration of vocalizations emitted at the frequencies of 18 to 24 kHz during the first 5 min after electrical stimulation of the dPAG at the freezing and escape thresholds. The electrical stimulation of the dPAG was applied 48 h after the discontinuation of the ethanol intake. \* $P < 0.05$  in relation to the corresponding value in the control group in the same frequency. # $P < 0.05$  in relation to the control frequency (18 kHz). Two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test.

abstinent of ethanol display normal behavioral response to loud sounds and prepulse inhibition stimulus.

As expected and in accordance with several studies (Brandão et al., 1994, 1999), the present results show that freezing and escape behaviors are obtained with gradual increases in the intensity of electrical stimulation of the dPAG. The fear nature of this stimulation has been previously demonstrated in this laboratory since rats submitted to avoidance paradigms avoid and quickly learn to switch-off such stimulation (Brandão et al., 1982). Moreover, systemic or local injections of GABA agonists or benzodiazepines into dPAG promptly reduce the aversive consequences of its electrical stimulation (Brandão et al., 1982, 1994, 2005). These defensive behaviors cannot be attributed to stimulation of neighboring structures of the dPAG because no turning behavior characteristic of the activation of the superior colliculus was observed in the present study (see Brandão et al., 1994, 1999 for reviews).

The present study showed a decrease in the stimulation thresholds for freezing and escape determined by the dPAG procedure in animals tested 48 h following interruption from chronic ethanol administration. As the animals submitted to the dPAG stimulation procedure were submitted to the ethanol intake procedure as those exposed to the EPM test, we infer that they were more anxious than the control animals. Thus, 48 h after the interruption of ethanol intake, the intensity of the electric current to elicit freezing and escape responses is lower than in control animals. These results are related to the aversive effects caused by the ethanol withdrawal, as assessed by the EPM test.

The results obtained in the present work showing a reduction in the emission of USVs following electrical stimulation of the

dPAG give further support of the hypothesis that high levels of aversion trigger behavioral mechanisms different from those triggered by lower levels of fear (Nobre and Brandão, 2004; Mamede-Rosa et al., 2005). It is widely known that moderate fear such as conditioned stimuli previously associated to footshocks applied at low intensity causes an increase in the emission of USVs (Brudzynski and Chiu, 1995; Nobre et al., 2003). In rats exposed for the first time to threatening situations, USV rates increase from moderate to rather substantial stimuli (Wohr et al., 2005). On the contrary, we have recently reported that a non-monotonic function may ensue when rats with past stressful experience are submitted to such threatening conditions (Mamede-Rosa et al., 2005; Tomazini et al., in press). We have suggested that repeated stressful experiences may lead to activation of neural substrates of aversion in the dPAG level. As intense fear conditions such as imminent attack by predators or electrical stimulation of the dorsal midbrain also lead to freezing and reduction of USVs at 22 kHz, it has been suggested that this pattern of responses may be the result of the activation of the neural substrates of fear at this mesencephalic level (Nobre and Brandão, 2004; Brandão et al., 2005). Thus, it appears that the defensive responses to aversive stimuli follow a non-monotonic function depending on the type or intensity of the state of “anxiety” generated by stress.

The present findings can be considered in the theory stated elsewhere that defensive behaviors are hierarchically organized and different behaviors within this class are provoked by aversive stimuli of different intensities (Blanchard and Blanchard, 1969, 1972). For example, arousal is the result of mild or distant threatening stimuli whereas freezing behavior is the



outcome of stronger or nearer stimuli. While conditioned stimuli are supposed to activate prosencephalic structures such as the hippocampus and amygdala, exposure to an uncontrollable stressor such as an imminent predator attack appears to activate midbrain structures such as the dPAG (Graeff, 2004; Brandão et al., 2005). The latter condition seems to fit with the results obtained in the present experiment. Indeed, low magnitude in USVs and increased reactivity to dPAG stimulation were the main features of the behavioral effects derived from ethanol discontinuation.

Besides inducing exaggerated emotional reactivity, withdrawal to most drugs of abuse facilitated the onset of escape deficit (Lacerra et al., 1999). In addition, inescapable aversive experiences resulted later in exaggerated emotional responses, principally fear and “anxiety” (Martijena et al., 1997; Zurita et al., 2000; Rodriguez Manzanera et al., 2005). Animals with past stressful experiences and resubmitted to threatening conditions are supposed to activate the neural circuits of aversion in the dPAG (Santos et al., 2005). Therefore, such similarities could lead to speculate as a hypothesis that the abrupt interruption in the access to reinforcing stimuli – such as ethanol and other drugs of abuse – induces behavioral effects and defensive responses similar to those observed following stimulation of the dPAG.

Chronic ethanol intake causes damage to the microstructural integrity of several brain areas, ranging from aberration in neuronal differentiation to cell loss, and inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated intracellular signaling (O’Neil et al., 2001; Li et al., 2004). However, the present results cannot be attributed to lesions of the dPAG which have been shown to increase the aversive thresholds and not to decrease them as occurred in the present study (Brandão et al., 1999).

In summary, the present results demonstrated that ethanol withdrawal courses with high levels of “anxiety”, suggesting that this aversive state could function as unconditioned stressor following discontinuation of chronic ethanol intake. However, there is no alteration in the startle response or prepulse inhibition in these rats, indicating a selective change in the reactivity of these animals to the aversive stimuli of the EPM without motor or attentional disturbances. On the other hand, rats under ethanol withdrawal and submitted to the electrical stimulation of the dPAG procedure showed an increase in its reactivity to the electrical stimulation along with a reduction in the USVs elicited during freezing or escape responses. These findings are indicative that ethanol withdrawal sensitizes the substrates of fear at the level of the dPAG. This reduction in USVs is usually observed during intense uncontrollable stressor such as high fear levels or the imminent attack by the predator. The fact that the abnormal reactivity of the dPAG appears to underlie both high fear states and ethanol withdrawal suggests that both conditions are part of the same neurobiological process generated by activation of the neural substrates of fear at the dPAG level.

#### Acknowledgment

Research supported by FAPESP (No 02/03705-0).

#### References

- Anseloni, V.Z., Brandão, M.L., 1997. An ethopharmacological analysis of the behavior of rats exposed to an elevated plus maze with some variations. *Behav. Pharmacol.* 8, 533–540.
- Anseloni, V.Z., Motta, V.M., Brandão, M.L., 1995. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze with clear walls. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28, 597–601.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1969. Crouching as an index of fear. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 67, 370–375.
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 1972. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81, 281–290.
- Bond, N.W., Di Giusto, E.L., 1976. Effects of prenatal alcohol consumption on open-field behaviour and alcohol preference in rats. *Psychopharmacologia* 46, 163–165.
- Brandão, M.L., De Aguiar, J.C., Graeff, F.G., 1982. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16, 397–402.
- Brandão, M.L., Cardoso, S.H., Melo, L.L., Motta, V., Coimbra, N.C., 1994. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18, 339–346.
- Brandão, M.L., Anseloni, V.Z., Pandóssio, J.E., De Araújo, J.E., Castilho, V.M., 1999. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 863–875.
- Brandão, M.L., Borelli, K.G., Nobre, M.J., Santos, J.M., Albrechet-Souza, L., Oliveira, A.R., Martinez, R.C., 2005. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1299–1311.
- Budzynski, S.M., Chiu, E.M., 1995. Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. *Physiol. Behav.* 57, 1039–1044.
- Devaud, L.L., Matthews, D.B., Morrow, A.L., 1999. Gender impacts behavioral and neurochemical adaptations in ethanol-dependent rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 841–849.
- Epping-Jordan, M.P., Watkins, S.S., Koob, G.F., Markou, A., 1998. Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature* 393, 76–79.
- File, S.E., 1994. Chronic exposure to noise modifies the anxiogenic response, but not the hypoactivity, detected on withdrawal from chronic ethanol treatment. *Psychopharmacology (Berlin)* 116, 369–372.
- Graeff, F.G., 1990. Brain defense systems and anxiety. In: Roth, M., Burrow, G.D., Noyes, R. (Eds.), *Handbook of Anxiety*. Elsevier, Amsterdam, pp. 307–354.
- Graeff, F.G., 2004. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 239–259.
- Johnston, A.L., Thevos, A.K., Randall, C.L., Anton, R.F., 1991. Increased severity of alcohol withdrawal in-patient alcoholics with a co-existing anxiety diagnosis. *Br. J. Addict.* 86, 719–725.
- Kliethermes, C.L., 2005. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 837–850.
- Koob, G.F., Bloom, F.E., 1988. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242, 715–723.
- Koob, G.F., Le Moal, M., 2006. What is addiction. In: Koob, G.F., Le Moal, M. (Eds.), *Neurobiology of Addiction*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–22.
- Lacerra, C., Maritjena, I.D., Bustos, S.G., Molina, V.A., 1999. Benzodiazepine withdrawal facilitates the subsequent onset of escape failures and anhedonia: influence of different antidepressant drugs. *Brain Res.* 819, 40–47.
- Li, Z., Ding, M., Thiele, C.J., Luo, J., 2004. Ethanol inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated intracellular signaling and activator protein-1 activation in cerebellar granule neurons. *Neuroscience* 126, 149–162.
- Mamede-Rosa, M.L.N., Nobre, M.J., Ribeiro, A.O., Brandão, M.L., 2005. Isolation-induced changes in ultrasonic vocalization, fear-potentiated startle and prepulse inhibition in rats. *Neuropsychobiology* 51, 248–255.
- Markou, A., Kosten, T.R., Koob, G.F., 1998. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18, 135–174.
- Martijena, I.D., Calvo, N., Volosin, M., Molina, V.A., 1997. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a

- conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. *Brain Res.* 752, 136–142.
- Martijena, I.D., Lacerda, C., Bustos, S.G., Molina, V.A., 2001. Chronic benzodiazepine administration facilitates the subsequent development of ethanol dependence. *Brain Res.* 891, 236–246.
- McKinzie, D.L., Sajdyk, T.J., Mebride, W.J., Murphy, J.M., Lumeng, L., Li, T.K., Shelkar, A., 2000. Acoustic startle and fear-potentiated startle in alcohol-preferring (P) and -non-preferring (NP) lines of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65, 691–696.
- Nobre, M.J., Brandão, M.L., 2004. Analysis of freezing behavior and ultrasonic vocalization in response to foot-shocks, ultrasound signals and GABAergic inhibition in the inferior colliculus: effects of muscimol and midazolam. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 14, 45–52.
- Nobre, M.J., Sandner, G., Brandão, M.L., 2003. Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. *Hear. Res.* 184, 82–90.
- O'Neil, J., Cardenas, V.A., Meyerhoff, D.J., 2001. Effects of abstinence on the brain: quantitative magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopic imaging in chronic alcohol abuse. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25, 1673–1682.
- Overstreet, D.H., Knapp, D.J., Breese, G.R., 2002. Accentuated decrease in social interaction in rats subjected to repeated ethanol withdrawals. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26, 1259–1268.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Pellow, S., File, S.E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 525–529.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Biley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Pontieri, F.E., Tanda, G., Di Chiara, G., 1995. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 12304–12308.
- Pohorechy, L., Brick, J., 1990. *Pharmacology of ethanol*. In: Balfour, D.J. (Ed.), *Psychotropic Drugs of Abuse*. Pergamon Press, New York, pp. 189–281.
- Rasmussen, D.D., Mitton, D.R., Green, J., Puchalski, S., 2001. Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. *Alcohol, Clin. Exp. Res.* 25, 999–1005.
- Rodríguez Manzanares, P., Isoardi, N., Carrer, H., Molina, V.A., 2005. Prior stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 25, 8725–8734.
- Rorick, L.M., Finn, P.R., Steinmetz, J.E., 2003. High-alcohol-drinking rats exhibit persistent freezing responses to discrete cues following Pavlovian fear conditioning. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 76, 223–230.
- Rossetti, Z.L., Hmaidan, Y., Gessa, G.L., 1992. Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 221, 227–234.
- Saitz, R., O'Malley, S.S., 1997. *Pharmacotherapies for alcohol abuse. Withdrawal and treatment*. *Med. Clin. North Am.* 81, 881–907.
- Santos, J.M., Gargaro, A.C., Oliveira, A.R., Masson, S., Brandão, M.L., 2005. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 15, 239–246.
- Schulteis, G., Markou, A., Cole, M., Koob, G.F., 1995. Decreased brain reward produced by ethanol withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5880–5884.
- Silva, R.C., Gárgaro, A.C., Brandão, M.L., 2004. Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. *Behav. Brain Res.* 151, 93–101.
- Stegink, L.D., Filter Jr., L.J., Baker, G.L., 1983. Effect of carbohydrate on plasma and erythrocyte glutamate levels in humans ingesting large doses of monosodium L-glutamate in water. *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 961–968.
- Thevos, A.K., Johnston, A.L., Latham, P.K., Randall, C.L., Adinoff, B., Malcolm, R., 1991. Symptoms of anxiety in inpatient alcoholics with and without DSM-III-R anxiety diagnoses. *Alcohol, Clin. Exp. Res.* 15, 102–105.
- Tomazini, F.M., Reimer, A., Albrechet-Souza, L., Brandão, M.L., in press. Opposite effects of short- and long-duration isolation on ultrasonic vocalization, startle and prepulse inhibition in rats. *J. Neurosci. Methods*.
- Tyrer, P., 1988. Dependence as a limiting factor in the clinical use of minor tranquilizers. *Pharmacol. Ther.* 36, 173–188.
- Valdez, G.R., Zorrilla, E.P., Roberts, A.J., Koob, G.F., 2003. Antagonism of corticotropin releasing factor attenuates the enhanced responsiveness to stress observed during protracted ethanol abstinence. *Alcohol* 29, 55–60.
- Vianna, D.M.L., Landeim-Fernandez, J., Brandão, M.L., 2001. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 711–719.
- Wilson, J., Watson, W.P., Little, H.J., 1998. CCK(B) antagonists protect against anxiety-related behaviour produced by ethanol withdrawal, measured using the elevated plus maze. *Psychopharmacology (Berlin)* 137, 120–131.
- Wohr, M., Borta, A., Schwarting, R.K., 2005. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 84, 228–240.
- Zurita, A., Martijena, I., Cuadra, G., Brandão, M.L., Molina, V.A., 2000. Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. *Behav. Brain Res.* 117, 163–171.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)