

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Estudo do efeito antiaditivo de extrato padronizado de *Passiflora incarnata* L. em um modelo de dependência de álcool em ratos.**

REBECA VARGAS ANTUNES SCHUNCK

PORTO ALEGRE

2014

REBECA VARGAS ANTUNES SCHUNCK

**Estudo do efeito antiaditivo de extrato padronizado de *Passiflora incarnata* L. em um modelo de dependência de álcool em ratos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Mirna Bainy Leal

PORTO ALEGRE

2014

**Às pessoas mais importantes da minha vida:**

**Deus, Nei, meu pai, Mara, minha mãe, e Vitor, meu querido esposo.**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo a Deus pela oportunidade concedida de aprender um pouquinho mais sobre o sistema nervoso, complexo e intrigante. Também estendo minha gratidão à professora Mirna, quem me aceitou em seu grupo de pesquisa e aceitou orientar-me neste caminho da neurociência. Tem sido desafiante e motivador para mim a tua orientação, professora.

Agradeço à minha família, que compreendeu o meu sonho e me motivou a segui-lo. É muito bom contar com uma família assim, que desde cedo me proporcionou acesso ao estudo. Desde os meus pais, Mara e Nei, até meu esposo, Vitor, todos sempre me impulsionaram para seguir este caminho e me proporcionaram as condições necessárias. Minha família por parte de mãe, de pai e de esposo também sempre torceram, compreenderam e apoiaram a minha decisão. Agradeço aos meus avós queridos Benjamin e Guiomar, meus segundos pais, com quem morei durante muitos anos e os quais sempre me receberam com muito amor e cuidado em sua casa. Agradeço à minha avó Anna, quem sempre se preocupava pela minha saúde e pelas minhas longas jornadas de estudos. Agradeço aos meus sogros Cecílio e Clara, os quais me receberam como filha, e também aceitaram e adotaram meu sonho de estudar, ajudando e contribuindo para isso.

Agradeço a ajuda das minhas colegas de laboratório que ombrearam comigo este trabalho: Janaína e Marina, e também àquelas que já não estão no grupo, mas também ajudaram no início: Érica e Gabriela. Sem estas colegas definitivamente não conseguiria realizar esta pesquisa. Agradeço à professora Eliane, quem sempre ajudou quando precisávamos, tanto nas dúvidas quanto nos trabalhos experimentais. Agradeço à professora Iraci e seus alunos, os quais me abraçaram como colega e me ajudaram a seguir num

momento crítico da pesquisa. Sua ajuda contribuiu muito para que pudéssemos chegar à conclusão deste trabalho. Em especial quero agradecer à profa. Iraci, Gabriela, Isabel, Andressa, Sônia, Jonsin e Ellen.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à PROPESQ/UFRGS pelo apoio financeiro.

E, por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## APRESENTAÇÃO

Os resultados desta dissertação de mestrado estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos a serem submetidos aos periódicos: *Pharmacology Biochemistry and Behavior* e *Journal of Ethnopharmacology*. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se nos próprios artigos.

Os itens Introdução e Discussão desta dissertação apresentam bases teóricas e comentários sobre os resultados contidos nos artigos científicos. O item Referências Bibliográficas se refere apenas às referências usadas nos tópicos Introdução e Discussão.

## SUMÁRIO

<b>PARTE I.....</b>	<b>8</b>
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Dependência e abuso de álcool: aspectos epidemiológicos.....	14
1.2. Neurobiologia da dependência e abuso de álcool.....	15
1.2.1. Aspectos farmacológicos.....	15
1.2.2. Dependência e abuso de álcool e dor.....	22
1.3. Tratamento da dependência ao álcool.....	27
1.4. Uso potencial de plantas no tratamento da dependência: a <i>Passiflora incarnata</i> L.....	29
2. OBJETIVOS.....	32
<b>PARTE II.....</b>	<b>33</b>
CAPITULO I.....	34
“Alcohol withdrawal induces analgesia in rats: possible relationship with BDNF and Interleukin-10”	
CAPÍTULO II.....	60
“Analgesia induced by alcohol withdrawal is reverted by <i>Passiflora incarnata</i> L. extract in rats”	
<b>PARTE III.....</b>	<b>85</b>
3. DISCUSSÃO.....	86
4. CONCLUSÕES.....	91
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

# **PARTE I**



## **Lista de Abreviaturas**

**ADH** – álcool desidrogenase

**ADN** – ácido desoxirribonucleico

**ALDH** – aldeído desidrogenase

**AMPA** – ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

**AMPc** – monofosfato de adenosina cíclico

**ANOVA** – Analysis of variance

**ATV** – área tegmentar ventral

**AW** – grupo “abstinente ao álcool”

**BDNF** – fator neurotrófico derivado do encéfalo

**CISA** – Centro de Informações sobre Saúde e Álcool

**CNS** – central nervous system

**CREB** – proteína ligante de elemento responsivo ao AMPc

**CREs** – elementos responsivos ao AMPc

**CRF** – fator liberador de corticotrofina

**DSM-V** – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª Edição

**ELISA** – Enzyme-linked Immunosorbent

**GABA** – ácido gama-aminobutírico

**HPT** – Teste da placa quente (Hot plate test)

**IASP** – Associação Internacional para o Estudo da Dor

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IL** – Interleucina

**IFN- $\gamma$**  – Interferon-gama

**INPAD** – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas.

**LENAD** – Levantamento Nacional de Álcool e Drogas

**MCP** – monocyte chemotactic protein

**MHC** – major histocompatibility complex

**mRNA** – Messenger ribonucleic acid

**NAcc** – núcleo acumbens

**NIDA** – National Institute on Drug Abuse

**NIH/NIAAA** – National Institutes of Health/National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism

**NMDA** – N-metil-D-aspartato

**NPY** – neuropeptídeo Y

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PASSI** – grupo “*Passiflora incarnata*”

**PAWA** – grupo “*Passiflora incarnata* em abstinentes ao álcool”

**SCP** – substância cinzenta periaquedutal

**SEM** – standard error of mean

**SNC** – sistema nervoso central

**SNK** – Student-Newman-Keuls *post hoc* test

**SPSS** – Statistical Package for Social Sciences Software

**TFL** – Teste de *Tail-flick* (Tail-flick test)

**Th1** – T Helper 1

**TNF $\alpha$**  – fator de necrose tumoral-alfa

**WATER** – grupo “água”

**WHO** – World Health Organization

## Resumo

O uso abusivo e a dependência de álcool têm sido definidos e redefinidos por várias organizações. O que se pode observar é que a compulsão por ingerir álcool, com diminuição do controle para limitar a ingestão, são características comuns à maioria das definições de dependência e adição de álcool. Este comportamento é o resultado da associação entre propriedades reforçadoras positivas e negativas obtidas com o uso crônico de uma dada substância. Nesse contexto, as intersecções entre dependência química e dor são frequentes, e dessa co-morbidade surgem novas complexidades, até então inexistentes nas apresentações isoladas de dor e adição. Entre os pacientes com dor crônica, o álcool aparece como a substância mais comumente abusada. Podemos verificar também que diversos fatores modulam tanto a resposta nociceptiva quanto os aspectos relacionados ao alcoolismo, entre esses fatores podemos citar BDNF e IL-10. BDNF é uma neurotrofina envolvida na sobrevivência e na recuperação neuronal, já a IL-10 é uma interleucina que exerce um importante papel na recuperação e reparo de processo inflamatório, sendo, portanto, anti-inflamatória. Para tratar o alcoolismo e prevenir recaídas, faz-se necessário o uso de tratamentos que possam englobar o máximo de sintomas relacionados à abstinência e, nesse contexto, a *Passiflora incarnata* L. é uma planta que possui atividade terapêutica em potencial visto que apresenta vários usos tradicionais, muitos deles coincidentes. Nossos resultados demonstraram que a retirada de álcool aumenta o limiar nociceptivo e decresce a resposta nociceptiva, levando a analgesia. Este efeito pode estar relacionado ao aumento nos níveis centrais de BDNF e IL-10. O tratamento com extrato de *Passiflora incarnata* pode reverter a analgesia observada após a retirada de álcool, mas este efeito não tem correlação com níveis de BDNF e IL-10.

## Abstract

The alcohol abuse and addiction have been defined and redefined by various organizations. The compulsion to drink alcohol with a decreased control to limit the intake, are common characteristics observed to most definitions of alcohol dependence and adding. This behavior is the result of the association between positive and negative reinforcing properties obtained with the chronic use of a substance. In this context, the intersections between addiction and pain are frequent, and from this comorbidity new complexities arise that did not exist in isolated presentations of pain and addiction. Among patients with chronic pain, alcohol appears as the most commonly abused substance. We also found that several factors modulate both the nociceptive response and the matters related to alcoholism among these factors we can mention BDNF and IL-10. BDNF is a neurotrophin involved in neuronal survival and recovery, while IL- 10 is an interleukin that plays an important role in the recovery and repair of an inflammatory process, thus being anti-inflammatory. To treat alcoholism and prevent relapses, it is necessary to use treatments that may encompass as much related to withdrawal symptoms as possible and, in this context, *Passiflora incarnata* L. is a plant that has potential therapeutic activity since it present several traditional uses, many of them coincident. Our results showed that the removal of the alcohol increases nociceptive threshold and decreases the nociceptive response, leading to analgesia. This effect may be related with increased central levels of BDNF and IL-10. Treatment with *Passiflora incarnata* extract can reverse the analgesia observed after alcohol withdrawal, however this effect does not correlate with levels of BDNF and IL-10.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Dependência e abuso de álcool: aspectos epidemiológicos.**

O uso de drogas psicoativas é quase tão antigo quanto à própria humanidade. Ao longo da história, tem-se registro de que uma grande parte das sociedades fazia uso de alguma substância com a finalidade de alterar o humor, o pensamento e os sentimentos (MEYER & QUENZER, 2005). O abuso de drogas acentuou-se desde o final dos anos sessenta, e a realidade atual é a existência de um número muito grande de dependentes de drogas com distúrbios importantes. A dependência de drogas está associada com inúmeros transtornos psiquiátricos (depressão, esquizofrenia, transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, ansiedade, etc.), outras doenças como o câncer (BOUZYK-SZUTKIEWICZ *et al.*, 2012; PELUCCHI, 2011) e problemas pessoais e sociais (alto índice de acidentes, violência e problemas familiares) (JONES, 2011). As drogas de abuso também geram altos gastos para a sociedade com programas de prevenção, tratamento e reabilitação, e ainda grande fardo ao sistema judicial criminal, incluindo prisões e julgamentos (GOODMAN, 2008).

As estatísticas disponíveis sobre o consumo de drogas revelam que, entre todas as substâncias de abuso, o álcool é a que tem merecido maior atenção nas investigações epidemiológicas. Nos dados obtidos pelo II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas observou-se um aumento de 20% na proporção de bebedores frequentes (que bebem uma vez por semana ou mais), que subiu de 45% para 54%. Destaca-se um aumento mais significativo entre as mulheres, que foi de 29% em 2006 para 39% em 2012 (LENAD, 2014).

Os estudantes são uma população muito pesquisada e, nesse contexto, dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) na Pesquisa Nacional da Saúde do

Escolar demonstraram que 66,6% dos escolares já haviam ingerido bebida alcoólica, sendo esse indicador maior nas Regiões Sul (76,9%) e Centro-Oeste (69,8%) e menor nas Regiões Norte (58,5%) e Nordeste (59,6%) (IBGE, 2012). Dentre as substâncias lícitas de abuso, o álcool é a mais consumida pelos adolescentes. Dos dados obtidos pelo I Levantamento Nacional sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira é importante salientar que 35% dos adolescentes relataram consumir bebidas alcoólicas ao menos uma vez ao ano. Desse total, 24% declararam beber ao menos uma vez ao mês, os homens consumiram maiores quantidades, sendo que um terço deles relatou ter consumido 5 doses ou mais (CISA, 2014).

O etanol é um dos agentes psicotrópicos mais comuns na sociedade ocidental. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) sugerem que cerca de dois bilhões de pessoas consomem álcool no mundo. O consumo excessivo de álcool pode resultar na dependência de álcool, que é uma das doenças neuropsiquiátricas mais comuns atualmente (ROCCHITTA *et al.*, 2012; SPANAGEL *et al.*, 2013).

## **1.2. Neurobiologia da dependência e abuso de álcool**

### **1.2.1. Aspectos farmacológicos**

Os efeitos causados pelo álcool no organismo variam dependendo da concentração de álcool no sangue. Em baixas concentrações, causa euforia e redução da inibição, passando a um aumento da desorientação e perda do controle muscular voluntário assim que a concentração de etanol na circulação se torna maior. Esse quadro pode levar ao coma e à morte, se a ingestão não diminuir. O grau de disfunção do sistema nervoso central (SNC),

com concentrações semelhantes de álcool no sangue, varia de indivíduo para indivíduo. Além disso, as ações do etanol no SNC são mais pronunciadas quando a concentração do etanol está aumentando (fase de absorção) do que quando está diminuindo (fase de eliminação), devido, parcialmente, ao fenômeno de tolerância aguda. Além disso, a ingestão crônica de álcool leva a uma forma mais acentuada de tolerância. Sabe-se também que quando o álcool é consumido juntamente com outros fármacos depressores do SNC, o etanol potencializa a ação depressora, podendo até levar ao óbito, dependendo da concentração do álcool e do fármaco no sangue (BURTIS *et al.*, 2008). O álcool é metabolizado principalmente pela enzima álcool desidrogenase do fígado (ADH) em acetaldeído, que subsequentemente é oxidado em acetato pela aldeído desidrogenase (ALDH). O álcool e seus metabólitos são comprovadamente teratogênicos durante a gravidez. Os efeitos que podem causar no bebê são: incapacidades físicas, mentais, comportamentais e/ou de aprendizagem com possíveis implicações para toda a vida. Nesse contexto, não se tem uma medida de consumo de álcool durante a gravidez que seja segura (BURTIS *et al.*, 2008).

O uso abusivo e a dependência de drogas têm sido definidos e redefinidos por várias organizações. Conforme definição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) “o aspecto essencial da dependência é um agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que indicam que o indivíduo continua utilizando a substância apesar dos problemas significativos relacionados a esta” (DSM-V, 2013). O que se pode observar é que a compulsão por ingerir álcool, com diminuição do controle para limitar a ingestão, são características comuns à maioria das definições de dependência e adição. Este comportamento é o resultado da associação entre propriedades reforçadoras positivas e negativas obtidas com o uso crônico de uma dada substância. As propriedades reforçadoras das substâncias estão associadas à sua capacidade de aumentar os níveis de alguns



neurotransmissores em áreas críticas do encéfalo (MEYER & QUENZER, 2005; GOODMAN, 2008).

Embora o álcool tenha estrutura química e sítios de ação no encéfalo diferente de outras substâncias psicotrópicas, os modelos patológicos da ingestão destas substâncias têm características comportamentais semelhantes (NESTLER, 2005). Substâncias capazes de causar dependência exercem sua ação em circuitos encefálicos que motivam o comportamento de busca da droga ao aumentar a ação ou a liberação da dopamina em determinadas regiões encefálicas (BEAR *et al.*, 2008). Nesse contexto, dois estados emocionais estão envolvidos no desenvolvimento da dependência ao álcool: um estado positivo e outro negativo. O estado positivo é caracterizado pelo efeito eufórico que leva ao aumento do consumo do álcool. Neste estado está envolvida a via mesolímbica dopaminérgica, que é responsável pelos efeitos de reforço e recompensa associados ao consumo do álcool e consiste de projeções dopaminérgicas que se estendem da área tegmentar ventral (ATV) do mesencéfalo a várias regiões do prosencéfalo, principalmente para o núcleo acumbens (NAcc) e córtex pré-frontal (GONZALES *et al.* 2004, BEAR *et al.*, 2008). O estado afetivo negativo do abuso do álcool é responsável pelo desenvolvimento da ansiedade, da depressão e de outras sequelas neurológicas disfóricas que podem ser causadas pela interrupção abrupta do consumo de álcool. Estes sintomas negativos que surgem após a retirada do álcool são responsáveis pela manutenção do consumo e o eventual desenvolvimento da adição ao álcool. Regiões da amígdala, especialmente os núcleos central e medial, parecem estar envolvidas com os efeitos disfóricos da retirada do etanol, particularmente com os sintomas relacionados à ansiedade (PANDEY, 2004).

De um modo geral, a intoxicação aguda com etanol potencia a neurotransmissão GABAérgica e inibe a neurotransmissão glutamatérgica via ação direta em receptores desses

neurotransmissores e via cascatas de sinalização intracelular (RON & MESSING, 2012; LOVINGER & ROBERTO, 2012). Após esse primeiro acontecimento, uma segunda onda de efeitos indiretos do etanol em vários sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores é iniciada, principalmente envolvendo monoaminas tais como dopamina, serotonina e noradrenalina, bem como opioides e outros neuropeptídeos (VENGELIENE *et al.*, 2008). Esses efeitos são cruciais para o desenvolvimento do estado emocional positivo (recompensa) mencionado anteriormente. O efeito final da intoxicação aguda é a redução da excitabilidade neuronal em determinadas regiões do encéfalo, associada à diminuição da plasticidade sináptica e à redução da formação da memória da droga, o que pode explicar porque o álcool tem um baixo potencial aditivo se comparado a outras drogas (SOMMER, 2012). Por outro lado, a exposição crônica ao álcool leva à tolerância aos efeitos GABAérgicos e também ao aumento da função dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Conforme o tempo e a intensidade da exposição, neuroadaptações em ambos os níveis celular e sináptico resultarão em desenvolvimento de dependência que poderão causar o surgimento de sintomas relacionados à abstinência na retirada abrupta de álcool. Na fase da abstinência, como aumentam os níveis de glutamato extracelular, aumenta a ativação dos receptores NMDA. O grau de aumento na sinalização glutamatérgica é responsável pela intensidade dos sintomas da abstinência (GASS & OLIVE, 2008).

Interessantemente, estudos têm mostrado que os estados emocionais positivos e negativos envolvidos na adição ao etanol têm efeito em um substrato celular comum: a proteína ligante de elemento responsivo ao AMPc (CREB) (PANDEY, 2004; SPANAGEL, 2009). Esta proteína se liga a segmentos específicos do ácido desoxirribonucleico (ADN), chamados elementos responsivos ao AMPc (CREs), e regula a expressão de genes nas vizinhanças (BEAR *et al.*, 2008). O CREB desempenha um papel central no processo de

adição ao etanol (PANDEY, 2004; SPANAGEL, 2009). Nesse contexto, sabe-se que CREB está envolvido no desenvolvimento da tolerância ao álcool (WANG *et al.*, 2009), nas mudanças no desenvolvimento neuronal e na morte celular (ZOU & CREWS, 2006), na suscetibilidade à adição do etanol (ACQUAAH-MENSAH *et al.*, 2006). Estudos mostram que déficits nesta proteína ou a diminuição dela após a retirada da exposição ao álcool podem promover o consumo de etanol e a correção do déficit de CREB pode diminuir o consumo e prevenir a adição ao álcool. Assim, o decréscimo da função de CREB pode mediar o desenvolvimento de adição ao álcool via estados emocionais positivos e negativos ao álcool (MOONAT *et al.*, 2010).

O CREB regula a transcrição de genes envolvidos na formação do neuropeptídeo Y (NPY), do fator liberador de corticotrofina (CRF), do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), entre outros, que também contribuem para o desenvolvimento de adição ao álcool (THORSELL, 2008; HEILIG & KOOB, 2007; DAVIS, 2008). Nesse sentido, BDNF é uma neurotrofina envolvida em muitos processos neurológicos tais como: regulação do neurodesenvolvimento, facilitação da plasticidade sináptica, terapia em potencial para doenças neurodegenerativas, mediação da adição, entre outros (KLEIN, 1994; PANG & LU, 2004; PEZET & MALCANGIO, 2004; BOLANOS & NESTLER, 2004; DAVIS, 2008). BDNF pode ser produzido por astrócitos, microglia, plaquetas, linfócitos e endotélio vascular sobre condições patológicas (JURIC *et al.*, 2006; FERRINI & DE KONINCK, 2013; KAREGE *et al.*, 2002; KRUSE *et al.*, 2006; KERMANI & HEMPSTEAD, 2007).

Devido ao seu papel na plasticidade sináptica, o BDNF parece contribuir para as mudanças neuroadaptativas que ocorrem no encéfalo de quem abusa do álcool. Vários estudos tem demonstrado que BDNF exerce um papel muito importante nos efeitos de recompensa de substâncias psicoestimulantes e opioides, e em relação ao álcool, estudos tem demonstrado

que esta neurotrofina é alterada pela presença e pela retirada de etanol (GHITZA *et al.*, 2010; RAIVIO *et al.*, 2012; ALELE & DEVAUD, 2013). O BDNF também parece estar envolvido na sobrevivência e manutenção de neurônios em regiões do encéfalo mais suscetíveis a neurodegeneração, tal como hipocampo (LU, 2003). Esta neurotrofina pode, então, estar envolvida no processo de reparo e restauração de neurônios afetados pelo uso excessivo de álcool, durante a abstinência (DAVIS, 2008).

Outro processo importante que ocorre na presença massiva de álcool no encéfalo é o estresse oxidativo e a neuroinflamação que podem levar à apoptose e, em um estágio mais avançado, à neurodegeneração. Acredita-se que a neurodegeneração é um passo crítico para o desenvolvimento de desordens pelo uso do álcool (CREWS *et al.*, 2011). A neuroinflamação, que está diretamente envolvida no desenvolvimento da neurodegeneração e das desordens pelo uso do álcool, está relacionada ao aumento de uma variedade de genes e citocinas pró-inflamatórias derivadas do sistema imune inato (CREWS *et al.*, 2011). A indução da imunidade inata em certas regiões encefálicas como o córtex pré-frontal, por exemplo, pode levar a prejuízos na tomada de decisão, que é característico da adição ao álcool (CREWS *et al.*, 2006; QIN *et al.*, 2008; BLEDOV *et al.*, 2012; MARSHALL *et al.*, 2013).

Um dos eventos mais estressantes para pacientes dependentes de álcool é a síndrome de abstinência, cuja intensidade aumenta com repetidas tentativas de retirada e recaídas (WITTE *et al.*, 2003). Sinais da abstinência surgem dentro de horas depois de cessada a ingestão crônica de álcool. Num primeiro momento observa-se uma hiperatividade simpatomimética, com quadros de taquicardia, sudorese intensa, tremor, hipertensão, ansiedade e agitação, efeitos que são sentidos nas primeiras 24h após a retirada do álcool. A seguir (24-48h depois de cessar o consumo de etanol) podem ocorrer crises convulsivas e até delírios, sendo que este quadro pode ser observado de 3 a 7 dias depois da retirada. O terceiro conjunto de sintomas

que sobrevém da cessação do consumo de álcool caracteriza-se por alucinações visuais e auditivas, confusões, desorientações e pronunciada hiperatividade autonômica. Nesses três conjuntos de sintomas existem vias neurais e neurotransmissores específicos que juntos são responsáveis pelos efeitos que caracterizam a síndrome de abstinência (WITTE *et al.*, 2003; HUGHES, 2009).

Entre os processos já comentados que são desencadeados pela retirada do álcool, após consumo excessivo, podemos acrescentar um sintoma que recentemente tem sido sugerido como sinal da síndrome de abstinência: a hiperalgesia. Apesar da hiperalgesia produzida pela retirada de opioides ter sido extensivamente caracterizada, a hiperalgesia provocada pela retirada do álcool e outros compostos tem sido somente mais recentemente estudada (EGLI *et al.*, 2012).

Modelos animais de alcoolismo são diversos e numerosos e cumprem um papel chave no entendimento de muitos fatores que ocorrem e que são base para o consumo abusivo e patológico do álcool (KNAPP & BREESE, 2012). Vários modelos animais tentam mimetizar os aspectos envolvidos no processo de sensibilização que ocorre em repetidas retiradas de álcool e recaídas (KNAPP & BREESE, 2012). As formas de administração utilizadas exercem um papel importante no desenvolvimento dos diversos modelos de álcool em animais. A forma de administração mais utilizada atualmente é a dieta líquida em garrafas para livre escolha. Outras formas de administração são por via intraperitoneal, via oral por gavagem e via inalatória por exposição a vapor de álcool (KNAPP & BREESE, 2012). A maioria dos estudos envolvendo álcool realiza administração contínua de álcool aos animais. Nesse contexto, Overstreet e colaboradores (2002) desenvolveram um modelo de administração intermitente de álcool, no qual a administração de álcool se dá em três períodos de 5 dias de tratamento com dois intervalos de dois dias entre eles. A administração se dá por via oral

através de dieta líquida em garrafas disponíveis para livre escolha dos animais (OVERSTREET *et al.*, 2002).

### **1.2.2. Dependência e abuso de álcool e dor**

As intersecções entre dependência química e dor são frequentes, e desta co-morbidade surgem novas complexidades, até então inexistentes nas apresentações isoladas de dor e dependência química. Há três situações predominantes na interface dor *versus* dependência química: 1) um indivíduo com transtorno por uso de substância sofre alguma condição com dor aguda, moderada ou grave; 2) um indivíduo com transtorno por uso de substância desenvolve dor crônica; 3) um indivíduo com dor crônica desenvolve algum transtorno por uso de substância (HENRIQUES *et al.*, 2009). Entre os pacientes com dor crônica, o álcool aparece como a substância mais comumente abusada (GATCHEL & DERSH, 2002). Especialmente em indivíduos com transtorno por uso de substância, alguns fatores modulam o limiar doloroso: ansiedade, depressão, insônia, desconforto físico, fadiga e isolamento diminuem o limiar, enquanto ambiente familiar estável, compreensivo e empático o aumentam (GUNDERSON & STIMMEL, 2004). A fissura e a sua ansiedade associada costumam diminuir o limiar de dor, assim como a abstinência, que pode potencializar a dor por meio da descarga simpática e da tensão muscular (especialmente na abstinência por sedativos). Medo e irritabilidade dificultam o alívio e a tolerância à dor. Esses fatores necessitam ser devidamente relacionados para serem apropriadamente manejados (HENRIQUES *et al.*, 2009).

A dor pode ser distinguida em componentes que são claramente inter-relacionados: o sensitivo-discriminativo e o afetivo-motivacional. O componente sensitivo-discriminativo está

relacionado à percepção da dor e à detecção do estímulo nocivo no que diz respeito à intensidade, localização, duração e qualidade, já o componente afetivo-motivacional refere-se às sensações e respostas emocionais (medo, mal-estar) provocadas pela sensação somática da dor. Esse componente está relacionado com a possibilidade de evocação da memória de fatos relacionados a estímulos nociceptivos (FONOFF, 2009; MENESCAL-DE-OLIVEIRA & DA SILVA, 2009). A dor é uma sensação evocada por estímulos nocivos nos receptores periféricos, os nociceptores, e codificada em padrões de potenciais de ação até centros de integração. Os nociceptores são terminações nervosas livres de neurônios aferentes primários responsáveis pela transdução de estímulos térmicos, mecânicos e químicos de alta intensidade (MENESCAL-DE-OLIVEIRA & DA SILVA, 2009). A informação sobre a dor é conduzida por meio de fibras A-delta e C até o corno dorsal da medula espinhal, onde fazem sinapse com neurônios de segunda ordem no corno posterior da medula espinhal. Nessa região, diversas substâncias estão envolvidas na transmissão central e na modulação da informação nociceptiva (BEAR *et al.*, 2008). O glutamato é considerado um dos principais mediadores envolvidos na transmissão da informação nociva no corno posterior da medula espinhal (MENESCAL-DE-OLIVEIRA & DA SILVA, 2009). Os axônios dos neurônios de segunda ordem decussam imediatamente e ascendem até alcançar o tálamo. A partir do tálamo, as informações projetam-se para várias áreas do córtex via projeções talamocorticais provenientes dos dois conjuntos de núcleos talâmicos que compõem os sistemas nociceptivos lateral e medial. O sistema lateral, relacionado principalmente com o aspecto sensitivo-discriminativo da dor, provê informações sobre a localização, modalidade e a intensidade do estímulo nocivo. Assim, as projeções talamocorticais do sistema lateral alcançam principalmente as áreas corticais somatossensitivas primária SI e secundária SII. Já o sistema talâmico medial está envolvido principalmente com o componente afetivo-motivacional da

dor, visto que as projeções dos núcleos intralaminares ou mediais espalham-se para várias estruturas corticais, incluindo as límbicas, como o córtex insular, o córtex do cíngulo anterior, o córtex pré-frontal, entre outros (MENESCAL-DE-OLIVEIRA & DA SILVA, 2009). Interessantemente, o córtex pré-frontal tem um papel importante nos comportamentos comumente observados em usuários de drogas, incluindo a propensão para sofrer relapsos (LASSETER *et al.*, 2010). O córtex pré-frontal encontra-se em um agregado de diversas regiões integradas, que incluem o pré-límbico, o infralímbico e o córtex cingulado anterior. Estas regiões recebem informações primárias do tálamo mediodorsal (UYLINGS & VAN EDEN, 1990) e são, coletivamente, envolvidas no comportamento de busca pela droga via conexões com outros elementos envolvidos na circuitaria de relapso à drogas (SHAHAM *et al.*, 2003). Em relação ao álcool, evidências experimentais sugerem que a atividade potencializada no cíngulo poderia contribuir para o comportamento de procura compulsiva observado em indivíduos dependentes (DAYAS *et al.*, 2007). Estudos recentes atribuem ao córtex pré-frontal funções relacionadas a alguns dos componentes afetivo-motivacionais da dor. Áreas do córtex pré-frontal são envolvidas principalmente na reflexão e no planejamento das implicações futuras de condições de dor persistente (MENESCAL-DE-OLIVEIRA & DA SILVA, 2009). Neste sentido, os componentes afetivos da dor em humanos são regulados pela via que inclui o córtex cingulado anterior (VOGT, 2005). Evidências corroboram essa associação, sugerindo que os substratos neurais relacionados com os aspectos emocionais negativos da retirada do álcool e dependência coincidem com os substratos dos aspectos emocionais do processamento nociceptivo em áreas como a amígdala (NEUGEBAUER *et al.*, 2004) e córtex pré-frontal (VOGT, 2005). Na interface com o alcoolismo, a ativação da amígdala induzida pela dor crônica é acompanhada por alterações na função do córtex pré-frontal e leva à produção de déficits cognitivos (SUN & NEUGEBAUER, 2011). Tais déficits



tem um papel importante na aberração que acontece na tomada de decisões que acompanha a transição do uso para a dependência de droga (GEORGE & KOOB, 2010), e, por este mecanismo, indivíduos que sofrem de dor crônica podem ser mais suscetíveis ao abuso de álcool (EGLI *et al.*, 2012).

A hiperalgesia, que é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo previamente doloroso, é observada em abstinentes ao álcool. A hiperalgesia é caracterizada pela acentuação da dor diante de estímulos mecânicos e ao calor e decorre de fenômenos relacionados à sensibilização periférica (FONOFF, 2009). Uma quantidade considerável de estudos tem examinado a hiperalgesia desenvolvida durante a retirada do álcool por meio de diferentes métodos. Dois métodos mais comumente utilizados para avaliar a nocicepção e hiperalgesia são: *tail-flick* e placa quente (GATCH, 2009). O *tail-flick* é um teste que avalia a resposta nociceptiva a estímulo térmico nocivo medido espinhalmente e é realizado conforme técnica descrita por D'AMOUR & SMITH (1941). O segundo teste, a placa quente, é uma medida da resposta nociceptiva a estímulo térmico nocivo medido supra-espinhalmente (WOOLFE & MACDONALD, 1944). A sensibilização que leva à hiperalgesia é uma característica de desenvolvimento de inflamação e quando há inflamação prolongada, lesão nervosa ou anormalidades teciduais, os nociceptores são sensibilizados e geram dor persistente. A sensibilização dos nociceptores pode traduzir-se como aumento de resposta diante de determinados estímulos ou da redução de seu limiar. Sabe-se que há mediadores que levam à instalação da inflamação e ao desenvolvimento da sensibilidade neuronal. Entre os fatores liberados no meio lesado podemos citar: a bradicinina, a histamina, a substância P, os leucotrienos, os mediadores pró-inflamatórios, as prostaglandinas, as interleucinas, as citocinas, entre outros (TEIXEIRA, 2009). Entre esses mediadores podemos destacar as

citocinas e as quimiocinas como os mais característicos da dor inflamatória, ou seja, sua presença é de extrema importância para a ocorrência do fenômeno de hiperalgesia inflamatória (FERREIRA *et al.*, 2009). A família das citocinas basicamente consiste em pequenas proteínas e glicoproteínas (de peso molecular entre 8 e 30 kDa) que permitem a comunicação intercelular. Esses mediadores, que a princípio pareciam ser importantes apenas no recrutamento de leucócitos (neutrófilos) para o foco inflamatório, foram reconhecidos posteriormente como relevantes na gênese da sensibilização nociceptiva. As citocinas mais importantes no que se refere à hiperalgesia são o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina (IL)-1 $\beta$  e a IL-8. Deve-se ressaltar, porém, que a liberação dos mediadores responsáveis pelo estabelecimento da hiperalgesia respeita uma hierarquia temporal de liberação e de ação, e que não ocorre de uma maneira desordenada, afastando a ideia inicial de que os sintomas inflamatórios resultam de uma “sopa de mediadores” (FERREIRA *et al.*, 2009). A importância das citocinas hiperalgênicas no desencadeamento da dor inflamatória levou à compreensão de que durante um processo inflamatório ocorre também a liberação de outras citocinas, que modulam negativamente o processo inflamatório e, conseqüentemente, a dor inflamatória, sendo consideradas, então, antinociceptivas. As principais citocinas antinociceptivas caracterizadas até o momento são a IL-4, a IL-10, a IL-13 e também o antagonista endógeno da IL-1 $\beta$ , a IL-1ra, capaz de formar um complexo estável com a citocina IL-1 $\beta$ , prevenindo a ativação de receptores celulares. O efeito modulador dessas citocinas sobre a dor inflamatória parece estar associado com a inibição da liberação dos mediadores hiperalgênicos e também parece estar relacionado à inibição da ação das citocinas pró-nociceptivas, como é o caso da IL-1ra, que inibe a ação da IL-1 $\beta$  por antagonizar seu receptor (FERREIRA *et al.*, 2009). Sabe-se que a IL-10 suprime a síntese de prostaglandinas e de algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) e limita a hiperalgesia

inflamatória (TEIXEIRA, 2009). Interessantemente, a inibição de uma (IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ ) ou de várias citocinas (pelo uso de drogas glicocorticoides) causa analgesia (FERREIRA *et al.*, 2009).

Várias regiões encefálicas estão envolvidas na modulação da dor. Estudos experimentais evidenciaram que áreas como o córtex pré-frontal e o giro do cíngulo têm a propriedade de modular a nocicepção (FONOFF, 2009). Outra região implicada na modulação da dor é a substância cinzenta periaquedutal (SCP). Estudos demonstram que a estimulação da SCP em animais deprime a atividade dos neurônios do corno posterior da medula espinhal e resulta em analgesia sem comprometer outras formas de sensibilidade. A SCP recebe, normalmente, aferências de várias estruturas do encéfalo incluindo aferências do córtex frontal e envia projeções para o bulbo ventromedial, entre outros. Essa projeção é excitatória e utiliza glutamato e aspartato como neurotransmissores. O glutamato está amplamente distribuído no SNC e, provavelmente, participa dos mecanismos moduladores da sensibilidade nociceptiva. Dentre as estruturas do bulbo ventromedial implicados no mecanismo de supressão da dor destaca-se o núcleo magno da rafe, onde há receptores GABA (GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>), provavelmente com atividade supressora. Na medula espinhal o GABA atua em receptores pós-sinápticos induzindo a hiperpolarização da membrana neuronal, inibindo a liberação de transmissores e prevenindo a difusão da atividade excitatória glutamatérgica (FONOFF, 2009).

### **1.3. Tratamento da dependência ao álcool**

A dependência ao álcool ou alcoolismo é hoje vista como uma condição crônica e comparada a outras doenças crônicas, tais como asma, diabetes e hipertensão (MOAL &

KOOB, 2007). Entretanto, apesar de muitos anos de pesquisas intensivas, a maioria dos tratamentos disponíveis para tratar dependência de drogas são notoriamente inefetivos (NIH/NIAAA, 2009).

As abordagens terapêuticas gerais estão principalmente dirigidas aos usuários compulsivos e fisicamente dependentes, e o planejamento das medidas terapêuticas é orientado pela intensidade do problema. Estas abordagens terapêuticas dividem-se em medidas de desintoxicação, controle do uso compulsivo e tratamento das complicações médicas (O'BRIEN, 2005). A desintoxicação é um processo rápido e de bons resultados no alcance de um estado de afastamento das drogas; usualmente envolve prescrição de fármacos para atenuar sintomas da síndrome de abstinência e aliviar outros problemas consequentes da ausência da droga (O'BRIEN, 2005). Porém, o tratamento da dependência exige meses ou anos para a reabilitação, pois o curso do tratamento ainda caracteriza-se por uma sucessão de fases de abstinência e de recaídas (MOAL & KOOB, 2007). Isto indica que todos os medicamentos que visam ajudar a evitar a recaída e a diminuir ou aliviar os sinais e sintomas da síndrome de abstinência revelaram, até o momento, benefícios no máximo modestos (WEINSHENKER, 2008). O êxito do tratamento é avaliado segundo a ocorrência de períodos de abstinência cada vez mais prolongados e recaídas menos frequentes, mais breves e menos intensas (WOLF, 1998).

Apesar das aparentes similaridades entre os sintomas psicológicos (dependência e compulsão) produzidos por várias, mas não por todas as substâncias de abuso, há tratamentos farmacológicos tradicionalmente usados para sistemas de receptores específicos, nos quais as substâncias de abuso estão provavelmente atuando (O'BRIEN, 2005; WEINSHENKER, 2008). A síndrome de abstinência de álcool é tradicionalmente tratada com benzodiazepínicos de longa ação, anticonvulsivantes e antidepressivos (JOHNSON, 2008). Porém, a fissura que

leva à recaída é mais difícil de tratar. Nesse sentido, várias classes diferentes de agentes farmacológicos são usadas terapeuticamente na tentativa de prevenir a recaída. Por exemplo, o acamprosato, que tem ação antagonista glutamatérgica, foi aprovado para o tratamento do alcoolismo (MASON & HEYSER, 2010). A naltrexona, que bloqueia receptores opioides, e topiramato, que tem mostrado recentemente ser efetivo no aumento da taxa de abstinência entre pacientes dependentes de álcool (GOODMAN, 2008; JOHNSON *et al.*, 2007; RAY *et al.*, 2010). O objetivo principal deste último tratamento parece ser aumentar a atividade nos receptores GABAérgicos e antagonizar os efeitos glutamatérgicos, atenuando, assim, os efeitos da exposição crônica ao álcool nesses dois sistemas na circuitaria mesocorticolímbica (JOHNSON, 2008). O dissulfiram, um agente aversivo, e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina também estão sendo utilizados no tratamento da dependência de álcool (BARTH & MALCOLM, 2010).

Tendo em vista as conseqüências adversas do uso de álcool do ponto de vista médico, social e econômico, não só para os indivíduos dependentes, mas também para a sociedade como um todo, e considerando ainda a baixa efetividade dos poucos tratamentos disponíveis para o alcoolismo, a busca por novos compostos antiaditivos é um investimento necessário. O desenvolvimento e teste de novos medicamentos para tratar dependência foi inclusive recomendado pelo “National Institute on Drug Abuse” (NIDA) como uma área alvo para investimentos futuros (NIDA Website, 2012).

#### **1.4. Uso potencial de plantas no tratamento da dependência: a *Passiflora incarnata* L.**

A investigação de espécies vegetais com alegado uso tradicional pode constituir um atalho valioso na obtenção de novos fármacos, uma vez que já se tem indicação da

biodisponibilidade e uma ideia preliminar da toxicidade das substâncias ativas presentes (ELISABETSKY *et al.*, 1995). A estratégia para a busca de novas moléculas farmacologicamente ativas baseando-se nas propriedades terapêuticas alegadas por usuários da medicina tradicional parece ser particularmente útil em doenças nas quais as bases fisiopatológicas não estão completamente esclarecidas, como no caso do alcoolismo, uma vez que o desenho racional de fármacos fica impossibilitado sem a definição do alvo a ser atingido. Exaustiva é a lista de fármacos utilizados hoje que possuem origem vegetal. Além disso, a maioria das classes de medicamentos possui como molécula protótipo uma substância de origem vegetal, demonstrando a importância e a utilidade em se estudar compostos naturais (ELISABETSKY *et al.*, 1995).

Nesse contexto, destaca-se a *Passiflora incarnata* L., a qual tem muitos usos tradicionais ao redor do mundo, muitos destes coincidentes. O gênero *Passiflora incarnata* L. pertence à família Passifloraceae e é formado por aproximadamente 520 espécies de plantas dicotiledôneas (WOHLMUTH *et al.*, 2010). A palavra *Passiflora* surgiu da palavra em latim “passio” porque em 1529 conquistadores espanhóis descreveram as flores desta planta como símbolo da “paixão de Cristo” (KINGHORN, 2001). Esta planta é encontrada principalmente na América Central e do Sul e algumas espécies ocorrem na América do Norte, Sudeste da Ásia e Austrália (ULMER *et al.*, 2004). É originária da América do Norte, mais especificamente do leste dos Estados Unidos, mas é cultivada em várias regiões da Europa, Ásia, África e Austrália como uma planta ornamental e pelos seus usos medicinais (DHAWAN *et al.*, 2004). O gênero *Passiflora incarnata* é utilizado na medicina tradicional principalmente para tratar transtornos de ansiedade e insônia, mas também tem uma série de outros usos, tais como: sedativo (América do Norte), analgésico, antiespasmódico, antiasmático, vermífida (Brasil), anticonvulsivante, tratamento da dismenorréia, da neuralgia

(Turquia) e, interessadamente, para tratamento da dependência de opiodes (Índia), entre outros usos (MIRODDI *et al.*, 2013). Em relação à fitoquímica da planta, muitos pesquisadores consideram que os seus constituintes ativos ainda não tenham sido completamente identificados, mas se considera que os flavonoides e, possivelmente, os alcaloides sejam importantes nesse aspecto (BARNES *et al.*, 2012). Os resultados da literatura demonstram que os vários constituintes ativos podem contribuir para os efeitos clínicos, ocorrendo um mecanismo de sinergia entre eles (MIRODDI *et al.*, 2013). Os alcaloides indólicos que incluem: harmano, harmol, harmina, harmalol e harmalina são os constituintes minoritários desta planta, muitas vezes nem sendo detectáveis em certas amostras, e podem atuar como inibidores da monoamino-oxidase (REHWALD *et al.*, 1995; SAMPATH *et al.*, 2011). Os flavonoides representam 2,5% dos compostos desta planta, geralmente expressos como percentagem em vitexina. Entre outros podemos citar: isovitexina, orientina, isoorientina, canferol, apigenina, crisina, vicenina, lucenina. Apesar do longo histórico de uso o mecanismo de ação desta planta ainda permanece pouco esclarecido. No Brasil existe uma apresentação comercial contendo um extrato padronizado desta planta, com indicação para o tratamento de insônia e desordens de ansiedade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais:

O objetivo desta dissertação foi avaliar o efeito antiaditivo da *Passiflora incarnata* L. em um modelo de dependência e abstinência de álcool em ratos.

### 2.2. Objetivos específicos:

2.2.1. Padronizar a metodologia de dependência e abstinência ao álcool através da administração de solução de álcool 20% (v/v), administrada por gavagem na dose de 4g/kg em três períodos de 5 (cinco) dias com dois intervalos de dois dias entre eles. Após um período de 10 dias sem a administração de álcool a medida da abstinência foi realizada através dos testes nociceptivos (*tail-flick* e placa quente);

2.2.2. Avaliar o conteúdo de BDNF e Interleucina-10 no córtex pré-frontal, tronco e hipocampo dos ratos abstinentes ao álcool (12 dias após a interrupção do tratamento com álcool);

2.2.3. Investigar o potencial antiaditivo de extrato padronizado de *Passiflora incarnata* (200 mg/kg) através da avaliação do efeito do extrato nos testes de *tail-flick* e placa quente realizados 10 e 11 dias, respectivamente, após a interrupção do tratamento com álcool;

2.2.4. Avaliar o conteúdo de BDNF e Interleucina-10 no córtex pré-frontal, tronco e hipocampo dos ratos abstinentes ao álcool e tratados com extrato de *Passiflora incarnata* (200 mg/kg).



## **PARTE II**

## **Capítulo I**

**Alcohol withdrawal induces analgesia in rats: possible relationship with BDNF and  
Interleukin-10**

**Manuscrito a ser submetido à**  
*Pharmacology Biochemistry and Behavior*

## **Alcohol withdrawal induces analgesia in rats: possible relationship with BDNF and Interleukin-10**

Rebeca Vargas Antunes Schunck<sup>a</sup>, Iraci L. S. Torres<sup>b\*</sup>, Andressa de Souza<sup>b</sup>, Isabel Cristina Macedo<sup>b</sup>, Gabriela Laste<sup>b</sup>, Marina Tuerlinckx Costa Valle<sup>a</sup>, Janaína Salomón<sup>c</sup>, Sonia Moreira<sup>b</sup>, Jonnsin Kuo<sup>b</sup>, Eliane Dallegrave<sup>d</sup>, Mirna Bairy Leal<sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500/107, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Modelos Animais. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500/204, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil. Tel.: +055-51 3308 3183.

<sup>c</sup> Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais - Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500/202, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

<sup>d</sup> Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170.

\* CORRESPONDING AUTHORS:

Prof. Dr. Mirna B. Leal

Prof. Dr. Iraci L. S. Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS

Rua Sarmento Leite, 500 sala 202

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: 0055-51 3308 3183; FAX: 0055-51 3308 3121

E-mail: [mirnablufgrs@gmail.com/iracitorres@gmail.com](mailto:mirnablufgrs@gmail.com/iracitorres@gmail.com)

## **ABSTRACT**

Alcohol is one of the most widespread psychotropic agents in western society. Acute and chronic alcohol actions and withdrawal effects contribute to excessive drinking and relapse, alcohol produces analgesia followed by hyperalgesia after withdrawal. Besides, it has been reported that exposure to ethanol alters the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in regions of the brain as hippocampus, cortex and striatum. Moreover, chronic alcohol intake is known to induce the selective neuronal damage associated with increase of inflammatory cascade resulting in neuronal apoptosis and neurodegeneration. In this present study, we investigated the nociceptive response through the tail-flick test and the hot plate test of rats submitted to a model of alcohol withdrawal syndrome in rats. In addition, it was evaluating the BDNF and interleukin-10 in the cerebral prefrontal cortex, brainstem and hippocampus these rats. Male adult Wistar rats were treated with water (group water), alcohol (group alcohol) and a non-treated group was included (control group). The administration was done by oral gavage and was performed in three periods of five days of treatment with two intervals of two days between them. Alcohol (20% w/v) was given at 4g/kg of body weight. There was a significant effect of treatment and time in the tail-flick and hot plate latencies, being the latencies increased in alcohol-treated rats. There was significant increased in the prefrontal cortex BDNF levels in the ethanol group in relation to water group. In addition, alcohol withdrawal induced a significant increase in the hippocampus, prefrontal cortex and brainstem IL-10 levels when compared with water group. Thus, the present study demonstrates that alcohol withdrawal increases nociceptive threshold, and decreased nociceptive response suggesting an analgesic effect, and these effect can be related to the increased central levels of BDNF and IL-10 observed.

**KEY WORDS: BDNF, INTERLEUKIN-10, ALCOHOL WITHDRAWAL AND PAIN**

## 1. INTRODUCTION

Alcohol is one of the most widespread psychotropic agents in western society. Data from the World Health Organization (WHO) suggest about 2 billion people drink alcohol in the world. The excessive alcohol intake can result in alcohol dependence, which is one of the most prevalent neuropsychiatric diseases currently (Rocchitta et al., 2012; Spanagel et al., 2013). The alcohol exposure can result in a wide range of adaptive responses of neurons, changes in brain function, and significant brain damage (Kril et al., 1997; Sutherland et al., 2014).

Long-term alcohol exposure in the adult causes neurodegeneration (atrophy of both grey and white matter), tremors, alcoholic psychosis, delirium tremens, withdrawal seizures and the emergence of a chronic negative affective state when access to alcohol is prevented (Harper and Matsumoto, 2005; Koob, 2012). In addition, it has been reported that exposure to alcohol alters the expression of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in regions of the brain as hippocampus, cortex and striatum (Hensler et al., 2003; McGough et al., 2004). This neurotrophin is involved in cell survival and differentiation in specific areas of the central nervous system (CNS) as well as in regulating neuronal connectivity (Nandi and Fitzgerald, 2005). It has been implicated in the development of alcohol addiction due to its role in the regulation of synaptic plasticity (Davis, 2008). It is suggested that BDNF also contributes to the mechanisms of descending pain facilitation (Ren and Dubner, 2007). At the spinal level, BDNF is distributed in primary sensory neurons in the dorsal root ganglion and it is involved in central sensitization in the spinal dorsal horn. In addition, BDNF is released with glutamate and substance P, which are considered to act as a fast neurotransmitter and a slow modulator of the first pain synapses, respectively (Mannion et al., 1999, Malcangio and Lessmann, 2003).

Acute and chronic alcohol actions and withdrawal effects contribute to excessive drinking and relapse, alcohol produces analgesia followed by hyperalgesia after withdrawal (Gatch, 2009). Egli et al. (2012) hypothesize that pain sensitivity alterations by alcohol as analgesia or and withdrawal-induced hyperalgesia contribute to alcohol misuse and alcohol addiction. Therefore alcohol is consumed in ever increasing amounts to alleviate negative motivational withdrawal symptoms contributing to abuse (Egli et al., 2012).

Moreover, chronic alcohol intake is known to induce the selective neuronal damage associated with increase oxidative–nitrosative stress and activation of inflammatory cascade finally resulting in neuronal apoptosis and neurodegeneration (White, 2003). Besides, ethanol intoxication has been shown to have immunomodulatory properties (Szabo and Mandrekar, 2009). Acute and chronic ethanol exposure can cause infection complications resultant from reduction of the immune status. Previous study showed that rats submitted to chronic alcohol intoxication inhibited immune reactions mainly mediated by T Helper 1 (Th1) Cells, increased corticosterone concentration, reduced T-lymphocyte acetylcholinesterase activity, reduced blood concentrations of Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), Interleukins (IL) IL-2, IL-4, IL-10, and increased IL-6 level (Zabrodskii et al., 2011). IL-10 is a cytokine with pleiotropic effects in immunoregulation and inflammation. IL-10 plays an important role of repair and normalization of tissue function after inflammation and it down regulates the expression of Th1 cytokines, major histocompatibility complex (MHC) class II antigens, and co-stimulatory molecules on macrophages. It also enhances B cell survival, proliferation, and antibody production (Ouyang et al., 2011; Tabas and Glass, 2013).

The aim of this study was to evaluate the nociceptive response of rats submitted to a model of alcohol withdrawal syndrome in rats. In addition, it was evaluating the BDNF and interleukin-10 in the cerebral prefrontal cortex, brainstem and hippocampus of these rats.



## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Chemicals**

Alcohol (Ethyl Alcohol, Casa da Química, Diadema, SP, Brazil) was diluted daily with distilled water for prepared solution of 20% w/v and administrated for gavage in a volume of 4 g/Kg of body weight. The BDNF levels were determined using a commercially available enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay kit (ChemiKine, Millipore, Billerica, MA, USA). IL-10 levels were evaluated using DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

### **2.2. Animals**

Male adult Wistar rats weighing 400-450g were housed in groups of five in 49x34x16-cm polypropylene home cages. All animals were maintained under a standard 12-hour light/dark cycle (lights on at 07:00 a.m. and off at 07:00 p.m.) in a temperature-controlled environment ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Animals had ad libitum access to water and chow. All experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (Application No. 23651 - Graduate Research Group at Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS), were compliant with Brazilian guidelines regulating the use of animals in research (Law No. 11,794), and adhered to the ethical and methodological standards of the Principles of Laboratory Animal Care (Laboratory guide for the care and use of animals, 8th ed., 2011). All possible measures were taken to minimize animal suffering and external sources of pain and discomfort. In addition, the minimum number of animals required to produce reliable scientific data were used.

### **2.3. Experimental Design and Alcohol Exposure**

Rats were habituated to the maintenance room for 1 week prior to the experiment. Subsequently, animals were randomly divided into three different groups, of 8-15 animals each. The model of administration was adapted from Overstreet et al. (2002). Animals were treated by oral gavage. Rats were divided into 3 groups: group water (oral gavage), group alcohol (oral gavage) and a control group without administration was added. The oral gavage administration was performed in three periods of five days of treatment with two intervals of two days between them (Fig. 1). Alcohol was diluted daily in distilled water to obtain a 20% w/v solution and administered for gavage in a volume of 4g/kg of body weight. The animals were administered in the same hours all days between 10.00 a.m. and 12.00 a.m.

### **2.4. Nociceptive analysis**

#### **2.4.1. The Tail-Flick test**

The tail-flick apparatus was described by D'amour and Smith (1941). Twenty-four hours before the experiment, the animals were exposed to the apparatus to familiarize them with the procedure, since the novelty can itself induce antinociception (Netto et al., 1987). Rats were wrapped in a towel and placed on the apparatus (Ugo Basile); the light source positioned below the tail was focused on a point 2.3 cm rostral to the tip of the tail. Deflection of the tail activated a photocell and automatically terminated the trial. A cut-off time of 10 s was used to prevent tissue damage. The test was performed 24 hours and 10 days after the last administration of initial treatment with water or alcohol (Fig. 1).

#### **2.4.2. The Hot Plate test**

The hot plate test was carried out to assess the effects of the study agent on the thermal nociceptive threshold (Woolfe and Macdonald, 1944). All rats were acclimated to the hot plate for five minutes, 24 hours prior to testing. The temperature of the plate was kept at 50°C (*Insight Equipments*). The animals were placed on glass funnels over the heated surface, and the time between placement of the animals on the hot plate and onset of paw licking or jumping, in seconds (s), was recorded as latency of response. The test was performed 24 hours and 11 days after the last administration of initial treatment with water or alcohol (Fig. 1).

#### **2.5. Sample collection**

On the day 31 after of the onset of administration, the animals were anesthetized using ketamine/xylazine (10 mg/kg and 50 mg/kg, respectively), and an experienced investigator killed the animals by decapitation. The prefrontal cortex, brainstem and hippocampus were separated on a cold surface and immediately frozen in liquid nitrogen and kept frozen at -80°C for subsequent analysis.

#### **2.6. Analysis of BDNF and IL-10 Immunocontent**

The prefrontal cortex, brainstem and hippocampus were weighed and homogenized with a handheld homogenizer in Tris-buffered saline. The resulting homogenates were centrifuged for 10 min at 4500 rpm. Before specific analyses, the total amount of proteins was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976). The BDNF levels were determined using a commercially available enzyme-linked immunosorbent (ELISA)

assay kit (ChemiKine, Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The results of BDNF were expressed in pg/ $\mu$ g of protein. IL-10 levels were evaluated using DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as a pg/mg tissue protein.

## **2.7. Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences software (SPSS) version 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). The interactions between factors (time and group) were analyzed using repeated-measures one-way Analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc test for multiple comparisons. Student's *t* test was performed for BDNF and IL-10 analysis. All results were expressed as means  $\pm$  standard error of mean (SEM). Significance was set at  $P < 0.05$ .

## **3. RESULTS**

### **3.1. Effects of alcohol withdrawal nociceptive threshold of rats.**

The tail-flick latency analyzed by repeated-measures ANOVA/SNK showed significant effect of treatment ( $F_{(2, 28)} = 7.416, P = 0.003$ ) and time ( $F_{(2, 28)} = 28.319, P < 0.0001$ ) (Fig. 2). The post hoc test (SNK test) showed that alcohol withdrawal group increases tail-flick latency ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2).

### **3.2. Effects of alcohol withdrawal nociceptive response of rats.**

The hot plate test analyzed by repeated-measures ANOVA/SNK showed significant effect of time ( $F_{(2, 32)} = 4.220, P < 0.05$ ), and treatment ( $F_{(2, 32)} = 3.223, P < 0.05$ ) (Fig 3). The post hoc test (SNK test) showed that alcohol withdrawal group increases hot plate latencies ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3).

### **3.3. Analysis of BDNF and IL-10 Immunocontent**

It was not observed significant difference in the BDNF and IL-10 levels between the control and water treatments (data not show). Thus, the BDNF and IL-10 levels were analyzed only in the water and alcohol withdrawal groups. There was significant increased in the prefrontal cortex BDNF levels in the ethanol treated rats in relation to the water group ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4). In addition, alcohol withdrawal induced a significant increase in the hippocampus ( $P < 0.05$ ), prefrontal cortex ( $P < 0.05$ ) and brainstem ( $P < 0.05$ ) IL-10 levels when compared to water treated animals (Fig. 5).

## **4. DISCUSSION**

This study showed that alcohol withdrawal increases the nociceptive threshold (tail-flick test evaluation) associated to decrease nociceptive response (hot plate test evaluation). It is an interesting result, since studies have shown hyperalgesia induced by ethanol withdrawal (Gatch and Lal, 1999, Becker, 2000). However, some studies assessed the nociceptive effects little hours or days after alcohol withdrawal. Although other authors have reported that ethanol withdrawal could cost hyperalgesia in the nociceptive tests (Gatch and Lal, 1999) in our protocol we observed the opposite. In addition it was observed an increase in BDNF levels in prefrontal cortex, corroborating data of another experimental study that showed BDNF central alteration after ethanol exposure (McGough et al., 2004). On the other hand,

clinical studies have provided evidence that BDNF may be one factor underlying to genetic vulnerability to alcohol dependence (Joe et al., 2007; Matsushita et al., 2004). Controversely, some studies showed a decrease and others an increase on its levels. Raivio et al. (2012) showed that ethanol decreased BDNF mRNA hippocampus expression in a dose-dependent manner after acute administration. The same has been shown in the frontal cortex, nucleus accumbens and amygdale after a higher ethanol dose (Raivio et al. 2012). Rats submitted to ethanol withdrawal (1 and 3 days) showed higher BDNF levels in hippocampus and cortex compared to control animals, varying between sex, brain region, and ethanol withdrawal time (Alele and Devaud, 2013).

An important aspect of the pain–alcohol link rests on neural substrates of alcohol reinforcement and dependence, which are also observed to influence critical pain transmission and perception functions (Egli et al., 2012). Converging evidence also suggests that neural substrates associated with motivationally relevant emotional aspects of alcohol withdrawal and dependence overlap with substrates of emotional aspects of nociceptive processing in areas such as the prefrontal cortex, where ascending pain pathways terminate for the processing of emotional components of pain (Neugebauer et al., 2004; Vogt, 2005; Egli et al., 2012). Thus, alcohol acts directly within this region of ascending nociceptive circuitry to possibly regulate neuronal plasticity related to the intersection of pain and negative affect (Egli et al., 2012). The prefrontal cortex sends extensive projections to subcortical structures. These glutamatergic synapses could be a substrate for addiction memories via formation of long-lasting changes in synaptic transmission after drug exposure (Egli et al., 2012). This plasticity may underlie the persistence of drug-seeking behaviour (Engblom et al., 2008). Deficits in function of prefrontal cortex are hypothesized to play a critical role in the aberrant decision-making that accompanies the transition from drug use to dependence (George and

Koob, 2010), and by this mechanism individuals suffering from chronic pain may be more susceptible to alcohol misuse and poor pain management (Egli et al., 2012). An additional factor in alcohol addiction contributing to imbalance in glutamate homeostasis and transmission is the pronounced glutamate release during each withdrawal reaction (Heilig et al, 2010; Hermann, 2012), which may induce either long-term plasticity, structural damage, or a combination of both. Indeed, alcohol withdrawal produces pronounced long-term changes in glutamatergic synapses in the prefrontal cortex which seem to play an even greater role for alcohol addiction and relapse behaviour than changes within the mesolimbic DA system (Abernathy et al., 2010). The combined data from cellular, animal, and neuroimaging experiments provide the basis for a glutamate hypothesis specific to alcohol addiction (Spanagel and Kiefer, 2008) that has offered a strong rationale for developing antiglutamatergic strategies for relapse prevention and alleviation of withdrawal symptoms (Spanagel, 2009).

As well as glutamatergic neurotransmission is implicated in the ethanol withdrawal (Witte et al., 2003), the inhibitory neurotransmitter  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transmission is involved in the ethanol use (Witte et al., 2003). Moreover, BDNF levels activate glutamatergic stimulatory and GABA inhibitory neurotransmissions (Lu, 2003).

The modulation of glutamatergic activity by BDNF involves both AMPA and NMDA receptor subtypes promoting neuronal survival and/or neurogenesis during recovery from ethanol withdrawal. Thus, BDNF may initiate neuronal cascades that induce alterations in GABA<sub>A</sub> and glutamate receptors, serving to reduce the neuronal hyperexcitability of ethanol withdrawal (Caldeira, et al., 2007; Alele and Devaud, 2013). Thus, we can suggest that this process can be related with the BDNF increased levels in the prefrontal cortex found in our study.

Moreover, further findings support the contrasting effects of BDNF that may either be beneficial or pathological, depending on the circumstances and the nervous system structure (Hu and Russek, 2008; Raivio et al., 2012; Davis, 2008). In addition, the role of BDNF is complex and region-specific within nociceptive pathways. The BDNF presented in C-fiber terminals may facilitate modulation of spinal glutamatergic NMDA-mediated nociceptive signaling via its TrkB receptor, similar to the action of substance P at this level (Eisch et al., 2000; Simonato, 1996; Gao et al., 2007).

Furthermore, it has been shown that alcohol increased immune activity in the central nervous system (CNS), which is believed contribute to impaired neurological function and neurodegeneration associated with excessive alcohol consumption (Kane et al., 2013). Neuroinflammation may lead to neurodegeneration, since microglia activates pro-inflammatory cytokines - IL-1b and tumor necrosis factor alfa (TNF $\alpha$ ) - which in turn stimulate microglia to produce more pro-inflammatory cytokines (Qin et al., 2007). Systemic cytokines particularly TNF $\alpha$  may enter the brain to initiate the inflammatory process (Qin et al., 2007) and lead to neuronal loss by increasing brain glutamate levels (Zou and Crews, 2005). More recently, a paradigm shift regarding the role of alcohol-induced CNS inflammation occurred when it was determined that pro-inflammatory molecules including cytokines and chemokines modulate alcohol consumption, suggesting that these molecules are important mediators of alcohol addiction (Crews et al., 2011; Cui et al., 2011). In this study we observed an increase in IL-10 central levels after alcohol withdrawal. The anti-inflammatory cytokine IL-10 decreases the magnitude of pro-inflammatory responses and promotes resolution of inflammation, considering that IL-10 is capable of inhibiting synthesis of pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF $\alpha$ . IL-10 is a central cytokine during the resolution phase of inflammation and prevents tissue damage caused by infections



and inflammations (Ouyang et al., 2011; Tabas and Glass, 2013). Thus, we can suggest that this increase in the levels of cytokine IL-10 in the hippocampus, prefrontal cortex and brainstem, important structures of CNS, is part of a homeostatic process to repair the inflammatory process and the alcohol-induced damage. This effect was observed after 12 days withdrawal ethanol, suggesting that in the structures analyzed this cytokine may be involved in the control of neurodegeneration related to neuroinflammation processes induced by alcohol withdrawal. Interestingly, Tabas and Glass (2013) pointed that an alternative strategy to inhibiting inflammation would be to commandeer nature's own anti-inflammatory mechanisms to induce program of resolution (Ouyang et al., 2011; Tabas and Glass, 2013). Using atherosclerosis as an example, IL-10 has marked antiatherosclerotic effects in mouse models (Ait-Oufella et al., 2006).

In conclusion, the present study demonstrates that alcohol withdrawal increases nociceptive threshold, and decreased nociceptive response suggesting an analgesic effect, and these effect can be related to increased central levels of BDNF and IL-10 observed. More studies were need for clarify these results.

### **Conflicts of interest**

The authors declare that they do not have any conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

### **Acknowledgements**

The research was supported by the following Brazilian funding agencies: National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (Dr. I.L.S.Torres, J.L.O.

Salomón); Committee for the Development of Higher Education Personnel - CAPES (I. C. Macedo; S. Moreira, R. V. A. Schunck) PROPESq/UFRGS.

## **REFERENCES**

Abernathy K , Chandler LJ, and Woodward JJ. Alcohol and the prefrontal cortex. *Int Ver Neurobiol* 2010;91:289-320.

Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006;12:178-80.

Alele PE, Devaud LL. Expression of cFos and brain-derived neurotrophic factor in cortex and hippocampus of ethanol-withdrawn male and female rats. *J Pharmacol Pharmacother* 2013;4:265-74.

Becker HC. Animal models of alcohol withdrawal. *Alcohol Res Health* 2000;24:105-13.

Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.

Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho RF, Carvalho AL, Duarte CB. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 2007;35:208-19.

Crews FT, Zou J, Qin L. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun* 2011;25:S4-S12.

Cui C, Grandison L, Noronha A. Neuroimmune mechanisms of brain function and alcohol related disorders. *Brain Behav Immun* 2011;25:S1-S3.

D'amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 1941;72:74-9.

Davis MI. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. *Pharmacol Ther* 2008;118:36-57.

Egli M, Koob GF, Edwards S. Alcohol dependence as a chronic pain disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 2012;36:2179-2192.

Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7579-7584.

Engblom D, Bilbao A, Sanchis-Segura C, et al. Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. *Neuron*; 2008;59(3):497-508.

Gao H, Xiang Y, Sun N, Zhu H, Wang Y, Liu M et al. Metabolic changes in rat prefrontal cortex and hippocampus induced by chronic morphine treatment studied ex vivo by high resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Neurochem Int* 2007;50:386-394.

Gatch, MB. Ethanol withdrawal and hyperalgesia. *Current Drug Abuse Reviews* 2009;2:41-50.

Gatch MB, Lal H. Effects of ethanol administration and withdrawal on thermal nociception in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:328-33.

George O, Koob GF. Individual differences in prefrontal cortex function and the transition from drug use to drug dependence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2010;35:232–247.

Harper C, Matsumoto I. Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:73-78.

Heilig M, Egli M, Crabbe JC, and Becker HC. Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: are they linked? *Addict Biol* 2010;15(2):169-84.

Hensler JG, Ladenheim EE, Lyons WE. Ethanol consumption and serotonin-1A (5-HT<sub>1A</sub>) receptor function in heterozygous BDNF (+/-) mice. *J Neurochem* 2003;85:1139-1147.

Hermann D, Weber-Fahr W, Sartorius A, et al. Translational magnetic resonance spectroscopy reveals excessive central glutamate levels during alcohol withdrawal in humans and rats. *Biol Psychiatry* 2012;71(11):1015-21.

Hu Y, Russek SJ. BDNF and the diseased nervous system: A delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J Neurochem* 2008;105:1-17.

Joe KH, Kim YK, Kim TS, Roh SW, Choi SW, Kim YB, et al. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:1833-1838.

Kane CJM; Phelan KD; Douglas JC; Wagoner G; Johnson JW; Xu J et al. Effects of ethanol on immune response in the brain: region-specific changes in aged mice. *J Neuroinflammation* 2013;10:66.

Koob GF. Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: alcohol addiction as a reward deficit disorder. In: Sommer WH and Spanagel R, editors. *Behavioral neurobiology of alcohol addiction*. Springer Basel; 2012. p. 3-30.

Kril JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Cartwright H. The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience* 1997;79:983-998.

Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 2003;10:86-98

Malcangio M, Lessmann V. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:116-21.

Mannion RJ, Costigan M, Decosterd I, Amaya F, Ma QP, Holstege JC, et al. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9385-90.

Matsushita S, Kimura M, Miyakawa T, Yoshino A, Murayama M, Masaki T, et al. Association study of brain-derived neurotrophic factor gene polymorphism and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1609-1612.

McGough NNH, He D, Logrip ML, Jeanblanc J, Phamluong K, Luong K, et al. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *J Neurosci* 2004;24:10542-10552.

Nandi R, Fitzgerald M. Opioid analgesia in the newborn. *Eur J Pain* 2005;9:105-108.

Netto CA, Siegfried B, Izquierdo I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of a concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol* 1987;48:304-309.

Neugebauer V, Li W, Bird GC, Han JS. The amygdala and persistent pain. *Neurosci* 2004;10:221-234.

Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011;29:71-109.

Overstreet DH, Knapp DJ, Breese GR. Accentuated Decrease in Social Interaction in Rats Subjected to Repeated Ethanol Withdrawals. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:1259-1268.

Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 2007;55:453-462.

Raivio N, Tiraboschi E, Saarikoski ST, Castrén E, Kiiänmaa K. Brain-derived neurotrophic factor expression after acute administration of ethanol. *Eur J Pharmacol* 2012;687:9-13.

Ren K, Dubner R. Pain facilitation and activity-dependent plasticity in pain modulatory circuitry: role of BDNF-TrkB signaling and NMDA receptors. *Mol Neurobiol* 2007;35:224-35.

Rocchitta G, Secchi O, Alvau MD, Migheli R, Calia G, Bazzu G, Farina D, Desole MS, O'Neill RD, Serra PA. Development and characterization of an implantable biosensor for telemetric monitoring of ethanol in the brain of freely moving rats. *Anal Chem* 2012;84:7072-9.

Simonato M. The neurochemistry of morphine addiction in the neocortex. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17:410-415.

Spanagel R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 2009;89(2):649–705.

Spanagel R, Durstewitz D, Hansson A, Heinz A, Kiefer F, Köhr G, et al. A systems medicine research approach for studying alcohol addiction. *Addict Biol* 2013;18:883-96.

Spanagel R, Kiefer F. Drugs for relapse prevention of alcoholism: ten years of progress. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29(3):109-15.

Sutherland GT, Sheedy D, Kril JJ. Using Autopsy Brain Tissue to Study Alcohol-Related Brain Damage in the Genomic Age. *Alcohol Clin Exp Res* 2014;38:1-8.

Szabo G, Mandrekar P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33:220-232.

Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* 2013;339:166-172.

White AM. What happened? Alcohol, memory blackouts and the brain. *Alcohol Res Health* 2003;27:186-196.

Vogt BA. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nature Reviews Neuroscience* 2005;6:533-544.

Witte PD, Pinto E, Ansseau M, Verbanck P. Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues. *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27:189-197.

Woolfe G, Macdonald AD. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther* 1944;80:300-307.

Zabrodskii PF, Lim VG, Grishin VA, Kuzmin AV. Mechanisms of Immune Status Disorders in Chronic Ethanol Intoxication. *Bull Exp Biol Med* 2011;152:90-92.

Zou JY, Crews FT. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res* 2005;1034:11-24.

## Legends

Fig. 1. Experimental design.

Fig. 2. Effects of alcohol withdrawal nociceptive threshold of rats submitted to the tail flick test. Values represent the mean  $\pm$  standard error (n = 9-15). There is a significant effect of time, and group ( $P < 0.05$ , repeated-measures ANOVA test, respectively)

\* Significant different from other groups ( $P < 0.05$ , SNK test).

Fig. 3. Effects of alcohol withdrawal nociceptive response of rats in the hot plate test Values represent the mean  $\pm$  standard error (n = 8-12).

There is a significant effect of time, and group ( $P = 0.003$ ,  $P < 0.001$ , respectively, repeated-measures ANOVA test)

\* Significant different from other groups ( $P = 0.003$ , SNK test).

Fig. 4. Effect of alcohol withdrawal in hippocampus, prefrontal cortex and brainstem BDNF levels of rats. Values represent the mean  $\pm$  standard error (n = 4-5).

\* Significant different from water treated group ( $P < 0.05$ , Student's *t* test).

Fig. 5. Effect of alcohol withdrawal in hippocampus, prefrontal cortex and brainstem levels of IL-10 of rats. Values represent the mean  $\pm$  standard error (n=5-6).

\* Significant different from water treated group ( $P < 0.05$ , Student's *t* test).



## Figures

Figure 1

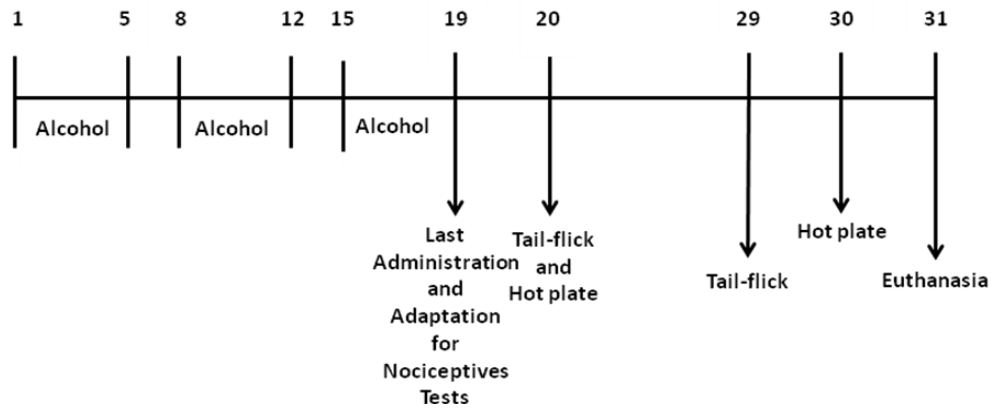


Figure 2

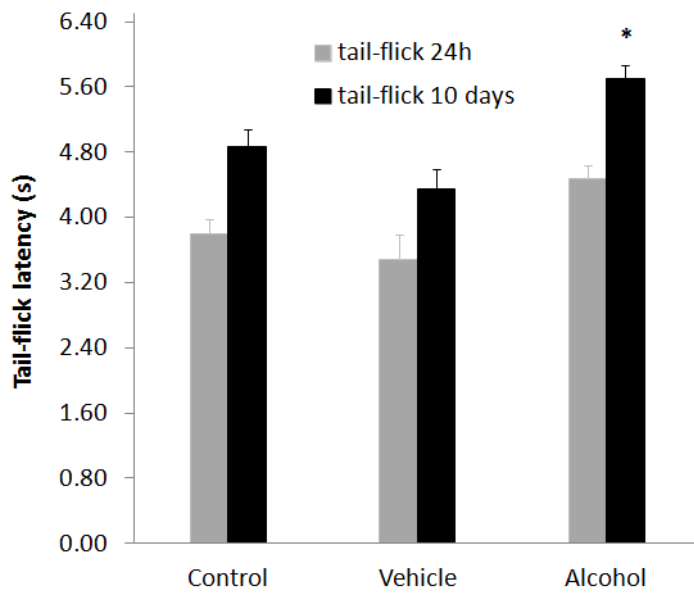


Figure 3

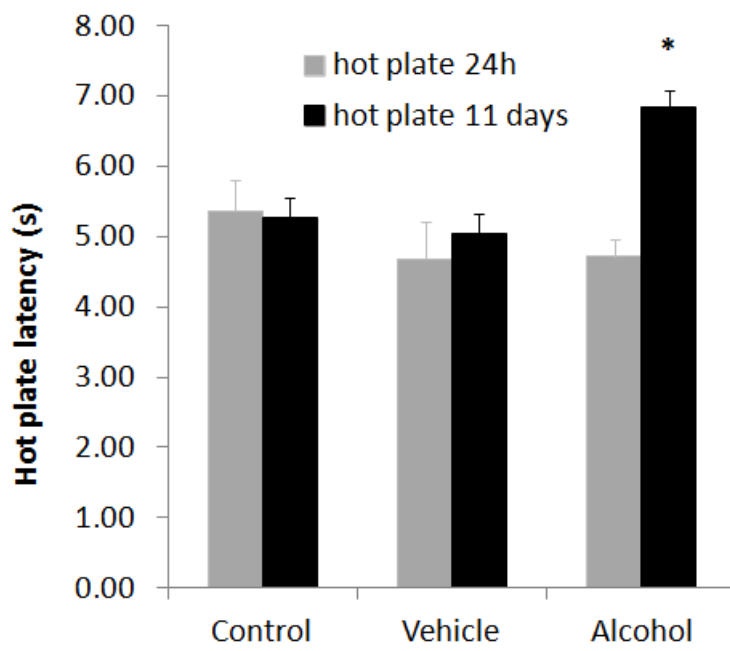


Figure 4

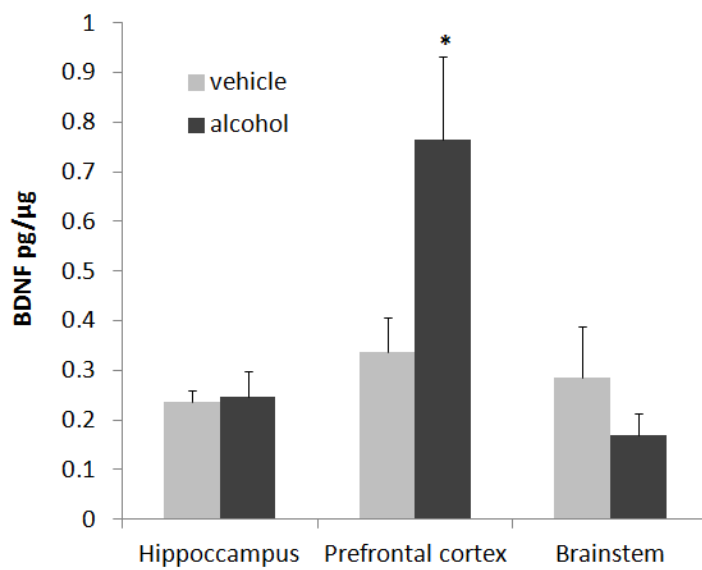
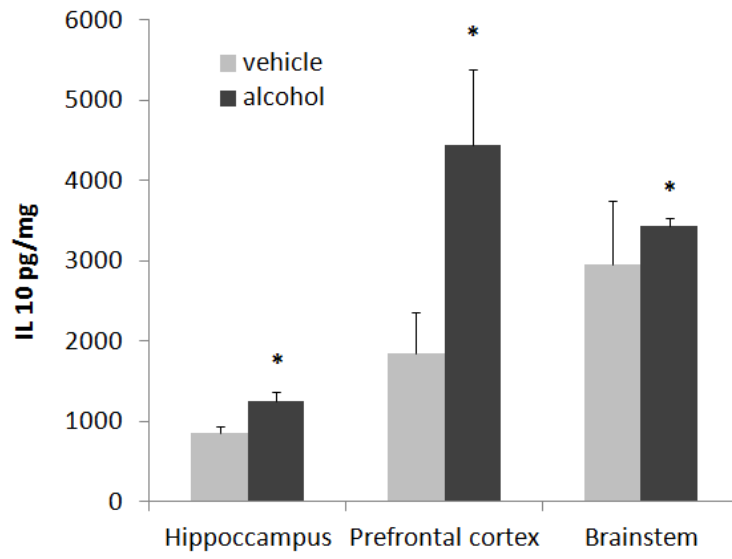


Figure 5



## **Capítulo II**

**Analgesia induced by alcohol withdrawal is reverted by *Passiflora incarnata* L. extract  
in rats**

**Manuscrito em preparação a ser submetido à  
*Journal of Ethnopharmacology***

**Analgesia induced by alcohol withdrawal is reverted by *Passiflora incarnata* L. extract  
in rats**

Rebeca Vargas Antunes Schunck<sup>1,2</sup>, Gabriela Laste<sup>3</sup>, Andressa de Souza<sup>3</sup>, Isabel Cristina Macedo<sup>3</sup>, Marina Tuerlinckx Costa Valle<sup>1,2</sup>, Janaína L.O. Salomón<sup>2</sup>, Sonia Moreira<sup>3</sup>, Ellen Almeida Nunes<sup>3</sup>, Eliane Dallegrave<sup>4</sup>, Iraci L. S. Torres<sup>3\*</sup>, Mirna Bainy Leal<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500/107, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite, 500/202, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP 90050-170, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Modelos Animais. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP 90050-170, Porto Alegre, Brazil. Tel.: +055-51 3308 3183.

<sup>4</sup> Departamento de Farmacociência, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

\* CORRESPONDING AUTHORS:

Mirna B. Leal

Iraci L. S. Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: 0055-51 3308 3183; FAX: 0055-51 3308 3121

E-mail: [mirnablufgrs@gmail.com](mailto:mirnablufgrs@gmail.com)/[iracitorres@gmail.com](mailto:iracitorres@gmail.com)

## ABSTRACT

Alcohol addiction is defined as a chronic relapsing disorder characterized by compulsive alcohol seeking and drinking, loss of control over limiting alcohol intake, and the emergence of a chronic negative affective state when access to alcohol is prevented. Moreover, associations between alcohol problems and chronic pain conditions have been reported. In this context, the neuroimmune system play a role in the development of alcoholism and pain, resulting in the induction of genes involved in innate immunity. Other factor that plays an important role in alcohol dependence and pain is the BDNF. In this context, *Passiflora incarnata* L. has a long history of use as traditional herbal medicines and exhibits various properties and possesses a complex phytochemistry. This plant is traditionally used for treatment of anxiety, insomnia, pain, mild infections, addiction of substances, and other. Thus, the aim of this work was to study the effect of an extract of *Passiflora incarnata* in the nociceptive response of rats submitted to a model of alcohol withdrawal syndrome. In addition, it was evaluating the BDNF and interleukin-10 in the prefrontal cortex, brainstem and hippocampus these rats. Male adult rats were divided in groups and administrated as follows: (1) water initially (the first 19 days), 1 day without treatment and then water (8 days), (2) water initially (the first 19 days), 1 day without treatment and then *Passiflora incarnata* (8 days), (3) alcohol initially (the first 19 days), 1 day without treatment and then water (8 days) and (4) alcohol initially (the first 19 days), 1 day without treatment and then *Passiflora incarnata* (8 days). The nociceptives assays used was the tail-flick test and the hot plate test. In the tail-flick test the groups that received alcohol presents an increased in the nociceptive response. There were increases in latency in the hot plate test in the group that received alcohol, but *Passiflora incarnata* reversed this effect of the alcohol. The levels of BDNF and IL-10 increased in prefrontal cortex of groups that received alcohol, without effect of

*Passiflora incarnata*. Thus, we can be suggested that *Passiflora incarnata* treatment could be an adjuvant therapy in the alcohol withdrawal syndrome. Complementary studies are necessary for clarify this hypothesis.

**KEY WORDS: BDNF, Interleukin-10, Alcohol Withdrawal, *Passiflora incarnata*, Pain**



## 1. INTRODUCTION

Alcohol addiction is defined as a chronic relapsing disorder characterized by compulsive alcohol seeking and drinking, loss of control over limiting alcohol intake, and the emergence of a chronic negative affective state when access to alcohol is prevented (Koob, 2012). The negative affective state of alcohol abuse describes the development of anxiety, depression, and other dysphoric psychiatric sequelae, which may be caused by the abrupt cessation of alcohol consumption (Pandey, 2004). Seizures, agitation, hyperreactivity, and, anxiety have long been considered hallmark signs of alcohol withdrawal (Becker, 2000).

Moreover, associations between alcohol problems and chronic pain conditions have been reported in the episodes of alcohol abuse antedating chronic pain in some people, and alcohol dependence emerging after the onset of chronic pain in others (Katon et al., 1985). On the other hand previous studies show that people experiencing chronic pain seek the alcohol presumably for its relief (Riley and King, 2009). Interestingly, alcohol chronic use has impacts in the several peripheral and central nervous system actions (Egli et al., 2012). In addition it has been observed that oral alcohol administration increases human pain thresholds, and the withdrawal from chronic use often increases pain sensitivity as one symptom of the alcohol withdrawal syndrome (Jochum et al., 2010).

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is a molecule of interest that is involved in many psychiatric disorders such as depression, stress, anxiety, pain and drug addictions (Horger et al., 1999; Hall et al., 2003; Murakami et al., 2005; Pandey et al., 2006; Merighi et al., 2008; Davis, 2008). BDNF, as well as most neurotrophins is responsible for neuronal survival, development and plasticity (Thoenen, 1995). It is not only expressed by neurons but is also found in astrocytes (Parpura and Zorec, 2010) and microglia (Trang et al., 2011).

On the other hand, the neuroimmune system play a role in the development of alcoholism, resulting in the induction of genes involved in innate immunity. Innate immune gene induction in certain brain regions (e.g., the frontal cortex), in turn, can disrupt decision making, which is a characteristic of addiction to alcohol (Crews, 2012). Interestingly, altered neuroimmune signaling processes are linked to alcohol-induced negative affect and depression-like behaviors and also regulate alcohol-drinking behavior. Immune cells such as monocytes, microglia and astrocytes are activated when the immune system is stimulated or tissue damage occurs (Crews, 2012). Immune responses involve a rapid production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), and interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), which serve to initiate the host's defense against pathogens and cellular damage (Clark et al., 2013). However, excessive inflammation may give rise to disturbances, which are harmful to the host organism. Anti-inflammatory cytokines act to regulate the inflammatory process, limiting tissue damage and restoring homeostasis (Clark et al., 2013). In this context, IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine and is essential for the regulation of immune responses. The anti-inflammatory mechanisms of IL-10 result in the attenuation of proinflammatory cytokine synthesis, such as IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  (Clark et al., 2013).

Interestingly, *Passiflora incarnata* L. has a long history of use as traditional herbal medicines and exhibits various properties and possesses a complex phytochemistry (Dhawan et al., 2004; Miroddi et al., 2013). In European traditional medicine *Passiflora incarnata* L. has various indications such as anxiety, nervousness, mild infections, insomnia. In North America, it is used for the treatment of neuralgia, insomnia, anxiety, muscle cramps, hysteria, and, interestingly, as a pain reliever for various conditions. In other countries, for example, in

India it is used to treat morphine dependence and in the African countries it is employed for its sedative, nervine and analgesic effects (Miroddi et al, 2013).

Thus, the aim of this work was to study the effect of an extract of *Passiflora incarnata* in the nociceptive response of rats submitted to a model of alcohol withdrawal syndrome. In addition, it was evaluating the BDNF and interleukin-10 in the prefrontal cortex, brainstem and hippocampus these rats.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Animals**

Male adult Wistar rats weighing 400-450g were allocated in groups of five in 49x34x16-cm polypropylene home cages. All animals were maintained under a standard 12-hour light/dark cycle (lights on at 07:00 a.m. and off at 07:00 p.m.) in a temperature-controlled environment ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Animals had ad libitum access to water and chow. All experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (Application No. 23651 - Graduate Research Group at Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS), were compliant with Brazilian guidelines regulating the use of animals in research (Law No. 11.794), and adhered to the ethical and methodological standards of the Principles of Laboratory Animal Care (Laboratory guide for the care and use of animals, 8th ed., 2011). All possible measures were taken to minimize animal suffering and external sources of pain and discomfort. In addition, the minimum number of animals required to produce reliable scientific data were used.

### **2.2. Chemicals**

Alcohol (Ethyl Alcohol, Casa da Química, Diadema, SP, Brazil) was diluted daily with distilled water for prepared solution of 20% w/v and administrated for gavage in a volume of 4 g/Kg of body weight. Extract of *Passiflora incarnata* (Aché, Guarulhos, SP, Brazil) standardized in 21 mg (7%) of total flavonoids expressed in vitexin was diluted in distilled water and administrated for oral gavage in a dose of 200 mg/Kg of body weight. The BDNF levels were determined using a commercially available enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay kit (ChemiKine, Millipore, Billerica, MA, USA). IL-10 levels were evaluated using DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

### **2.3. Experimental design**

Rats were habituated to the maintenance room for 1 week prior to the experiment. Subsequently, animals were randomly divided into four different groups, of 8-10 animals each. Animals were treated by oral gavage. Rats were divided into four groups: group Water (WATER): water initially for 19 days, 1 day without treatment and after water for more 8 days, group *Passiflora incarnata* (PASSI): water initially for 19 days, 1 day without treatment and after *Passiflora incarnata* for more 8 days, group Alcohol Withdrawal (AW): alcohol initially for 19 days, 1 day without treatment and after water for more 8 days and group *Passiflora incarnata* in Withdrawal of Alcohol (PAWA): alcohol initially for 19 days, 1 day without treatment and after *Passiflora incarnata* for more 8 days. The initial administration of 19 days was performed in three periods of five days of treatment with two intervals of two days between them (repeated alcohol withdrawals). On day 20 there was no administration for conducting nociceptive tests. The animals were administrated in the same hours all days between 10.00 a.m. and 12.00 a.m.

## **2.4. Nociceptive analysis**

### **2.4.1. The tail-flick test (TFL)**

The TFL apparatus was described by D'amour and Smith (1941). Twenty-four hours before the experiment, the animals were exposed to the apparatus to familiarize them with the procedure, since the novelty can itself induce antinociception (Netto et al., 1987). Rats were wrapped in a towel and placed on the apparatus; the light source positioned below the tail was focused on a point 2.3 cm rostral to the tip of the tail. Deflection of the tail activated a photocell and automatically terminated the trial. A cut-off time of 10 s was used to prevent tissue damage. It was performed 24 hours and 10 days after the last administration of initial treatment with water or alcohol.

### **2.4.2. The hot plate test (HPT)**

The HPT was carried out to assess the effects of the study agent on the thermal nociceptive threshold (Woolfe and Macdonald, 1944). All rats were acclimated to the hot plate for five minutes, 24 hours prior to testing. The temperature of the plate was kept at 50°C. The animals were placed on glass funnels over the heated surface, and the time between placement of the animals on the hot plate and onset of paw licking or jumping was recorded in seconds (s), as latency of response. It was performed 24 hours and 11 days after the last administration of initial treatment with water or alcohol.

## **2.5. Sample collection**

On the day 31 after of the onset of administration, the animals were anesthetized using ketamine/xylazine (10 mg/kg and 50 mg/kg, respectively), and an experienced investigator killed the animals by decapitation. The prefrontal cortex, brainstem and hippocampus were separated on a cold surface and immediately frozen in liquid nitrogen according to the experiment frozen at -80°C for subsequent analysis.

## **2.6. Analysis of BDNF and IL-10 immunocontent**

The prefrontal cortex, brainstem and hippocampus were weighed and homogenized with a handheld homogenizer in Tris-buffered saline. The resulting homogenates were centrifuged for 10 min at 4500 rpm. Before specific analyses, the total amount of proteins was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976). The BDNF levels were determined using a commercially available enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay kit (ChemiKine, Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The results of BDNF were expressed in pg/μg of protein. IL-10 levels were evaluated using DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as a pg/mg tissue protein.

## **2.7. Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences software (SPSS) version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). The statistical tests employed in this study were one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls (SNK) *post hoc* test for

multiple comparisons. All results were expressed as means  $\pm$  standard error of mean (SEM). Significance was set at  $P < 0.05$ .

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Effect of extract of *Passiflora incarnata* in the nociceptive threshold of rats.**

The treatment with extract of *Passiflora incarnata* did not influence the nociceptive response in the TFL, there was no significant statistical difference between group AW and PAWA (ANOVA/SNK,  $P > 0.05$ ). However, after treatments the groups that received alcohol (AW and PAWA groups) presents an increased in the nociceptive response in the TFL when compared to groups that received water (WATER and PASSI groups) (one-way ANOVA,  $F_{(2,32)} = 4.802$ ,  $P = 0.007$ , SNK,  $P < 0.05$ ) (Fig. 1).

#### **3.2. Effect of extract of *Passiflora incarnata* in the nociceptive response of rats.**

In the HPT it was observed an effect of the treatments in the nociceptive response (one-way ANOVA,  $F_{(3,33)} = 6.809$ ,  $P < 0.001$ ). Thus, the treatment with extract of *Passiflora incarnata* reversed the effect of the alcohol in the nociceptive response evaluated in the HPT, where AW group increased the latency in the hot plate test (decreases nociceptive response) in relation to other groups analyzed (one-way ANOVA/SNK,  $P < 0.05$ ) (Fig. 2).

#### **3.3. Effect of extract of *Passiflora incarnata* in the analysis of BDNF and IL-10 immunocontent**

In relation to BDNF immunocontent was observed an significant increased in the prefrontal cortex in the group AW and PAWA in relation to the other groups (one-way

ANOVA,  $F_{(3,15)}= 11.891$ ;  $P=0.0001$ / SNK,  $P<0.05$ ) (Fig. 3A). In addition, when it was analyzed the BDNF in brainstem and hippocampus was not found statistical significant differences between groups (one-way ANOVA,  $F_{(3,13)}= 0.216$ ;  $P=0.884$  and one-way ANOVA,  $F_{(3,16)}= 1.413$ ;  $P=0.284$ , respectively). Moreover, IL-10 immunocontent presented high level in the AW and PAWA groups in the prefrontal cortex. Nevertheless in the brainstem was not observed significant differences between groups in the interleukin levels (one-way ANOVA,  $F_{(3,19)}= 0.973$ ;  $P=0.426$ ) (Fig. 4A).

#### 4. DISCUSSION

In this study we showed that the effect of *Passiflora incarnata* treatment in the nociceptive response depends of the nociceptive test used. This treatment reversed the analgesia induced alcohol withdrawal, resulting of 11 days without administration of alcohol, evaluated in the HPT, but no in the TFL. In addition, this data confirmed data previous of our group showing that alcohol withdrawal induced analgesia (Schunck RVA, personal communication).

Highlighting, that in the TFL, the nociceptive response is related to the spinal cord reflex, but the response remains under control of supraspinal structures. It involves phasic pain, with short duration stimulus; the pain threshold measured involves the thermal stimulation of A $\delta$  fibers (Le Bars et al., 2001). On the other hand, the HPT produces two behavioral components that can be measured in terms of their reaction times, namely paw licking and jumping. Both are considered to be supraspinally-integrated responses (Le Bars et al., 2001). Thus, considering the generalized alcohol effect in central nervous system (CNS) is



difficult to determine which are the specific neural networks involved in alcohol-induced antinociception and in the *Passiflora incarnata* effect in this analgesia.

In addition, in this study we observed that BDNF and IL-10 immunocentents were significant increased in the prefrontal cortex in the group AW and PAWA. These results indicated that the alcohol is able induced increased BDNF and IL-10 levels but there is not effect of *Passiflora incarnata* in these parameters. Thus, we can suggested that the mechanism of the reversion of analgesia induced by alcohol withdrawal by the *Passiflora incarnata* to baseline level (water group) in the HPT does not have a relationship BDNF and IL-10 central levels, since this substances showed similar levels in the group AW and PAWA.

Previous studies show that various bioactive constituents can contribute to the reported clinical effects of *Passiflora incarnata*, probably in a synergistic manner (Miroddi et al., 2013). The aerial parts of *Passiflora incarnata* are phytochemically characterized by the presence of a pattern of several primary constituents consisting of flavonoids, maltol, cyanogenic glycosides and indole alkaloids (Marchart et al., 2003). The *Passiflora incarnata* is a central nervous system depressant (Dhawan et al., 2004). The extracts of this plant were found to contain a certain amount of gamma-aminobutyric acid (GABA), suggesting that the bioactivity of this plant could result from the synergistic action of GABA with additional phytochemicals that may facilitate membrane permeation, leading to the positive modulation of GABA<sub>A</sub> receptors by flavonoids (Campbell et al., 2004; Carratù et al., 2008). Numerous pharmacological effects of *Passiflora incarnata* are mediated via the modulation of the GABA system, including affinity to the GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors and effects on GABA uptake. It appears to be unlikely that *Passiflora incarnata* extract acts by binding to the benzodiazepine site. However, it is plausible that binding to the GABA-site of the GABA<sub>A</sub> receptor is one mode of action of the plant extract (Appel et al., 2011).

A significant body of scientific literature highlighted the preclinical evidence regarding the beneficial properties of *Passiflora incarnata* as a treatment for addictive behaviors linked to substances such as amphetamine, nicotine, cannabis and ethanol, and benzodiazepines (Capasso and Sorrentino, 2005; Dhawan et al., 2002a,b,c; Dhawan and Sharma, 2003a). Previous study showed that *Passiflora incarnata* benzoflavone moiety (BZF) compound can decrease the levels of anxiety measured using the elevated plus maze in ethanol-dependent mice. Additionally, mice treated with ethanol-BZF combinations exhibited less dependence and fewer withdrawal signs in comparison to the group of mice that only received ethanol and these effects were dose-dependent (Dhawan, 2003b). These results corroborated our results obtained in the nociceptive behavior rats using *Passiflora incarnata* extract, and suggested its efficacy in the reduction of alcohol withdrawal symptoms.

In conclusion *Passiflora incarnata* treatment was able reverted the analgesia induced by alcohol withdrawal, but no modified its effect in the BDNF and IL-10 central levels. Thus, we can be suggested that *Passiflora incarnata* treatment could be an adjuvant therapy in the alcohol withdrawal syndrome. Complementary studies are necessary for clarify this hypothesis.

### **Conflicts of interest**

The authors declare that they do not have conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

### **Acknowledgements**

The research was supported by the following Brazilian funding agencies: National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (Dr. I.L.S.Torres, J.L.O.

Salomón); Committee for the Development of Higher Education Personnel - CAPES (I. C. Macedo; S. Moreira, R.V.A.Schunck) and PROPESq/UFRGS.

## REFERENCES

- Appel, K., Rose, T., Fiebich, B., Kammler, T., Hoffmann, C., Weiss, G., 2011. Modulation of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system by *Passiflora incarnata* L. *Phytotherapy Research*. 25, 838–843.
- Becker, H.C., 2000. Animal models of alcohol withdrawal. *Alcohol Res Health*; 24: 105-13.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254.
- Campbell, E.L., Chebib, M., Johnston, G.A., 2004. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA(A)receptors. *Biochemical Pharmacology*. 68, 1631–1638.
- Capasso, A., Sorrentino, L., 2005. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of Kava kava and Passiflora extracts combination. *Phytomedicine*. 12, 39–45.
- Carratù, B., Boniglia, C., Giammarioli, S., Mosca, M., Sanzini, E., 2008. Free amino acids in botanicals and botanical preparations. *Journal of Food Science*. 73, C323–C328.
- Clark, A.K., Old, E.A., Malcangio, M., 2013. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *Journal of Pain Research*. 21, 803–14.
- Crews, F.T., 2012. Immune function genes, genetics, and the neurobiology of addiction. *Alcohol Research*. 34, 355–61.
- D'amour, F.E., Smith, D.L., 1941. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 72, 74–9.

- Davis, M.I., 2008. Ethanol–BDNF interactions: still more questions than answers. *Pharmacology & Therapeutics*. 118, 36–57.
- Dhawan, K., Dhawan, S., Sharma, A., 2004. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*. 94, 1–23.
- Dhawan, K., Kumar, S., Sharma, A., 2002a. Suppression of alcohol-cessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 81, 239–244.
- Dhawan, K., Kumar, S., Sharma, A., 2002b. Reversal of cannabinoids (delta9THC) by the benzoflavone moiety from methanol extract of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice: a possible therapy for cannabinoid addiction. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 54, 875–881.
- Dhawan, K., Kumar, S., Sharma, A., 2002c. Comparative anxiolytic activity profile of various preparations of *Passiflora incarnata* linneaus: a comment on medicinal plants' standardization. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 8, 283–291.
- Dhawan, K., Sharma, A., 2003a. Restoration of chronic Delta 9-THC induced decline in sexuality in male rats by a novel benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linn. *British Journal of Pharmacology*. 138, 117-120.
- Dhawan, K., 2003b. Drug/substance reversal effects of a novel tri-substituted benzoflavone moiety (BZF) isolated from *Passiflora incarnata* Linn., a brief perspective. *Addiction Biology*. 8, 379–386.
- Egli, M., Koob, G.F., Edwards, S., 2012. Alcohol dependence as a chronic pain disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 36, 2179–2192.

- Hall, F.S., Drgonova, J., Goeb, M., Uhl, G.R., 2003. Reduced behavioral effects of cocaine in heterozygous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) knockout mice. *Neuropsychopharmacology*. 28, 1485–90.
- Horger, B.A., Iyasere, C.A., Berhow, M.T., Messer, C.J., Nestler, E.J., Taylor, J.R., 1999. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience*. 19, 4110–22.
- Jochum, T., Boettger, M.K., Burkhardt, C., Juckel, G., Bar, K., 2010. Increased pain sensitivity in alcohol withdrawal syndrome. *European Journal of Pain*. 14, 713–718.
- Katon, W., Egan, K., Miller, D., 1985. Chronic pain: lifetime psychiatric diagnoses and family history. *American Journal of Psychiatry*. 142, 1156–1160.
- Koob, G.F., 2012. Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: alcohol addiction as a reward deficit disorder, in: Sommer, W.H., Spanagel, R. (Eds.), *Behavioral neurobiology of alcohol addiction*. Springer, Germany, pp. 3–30.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal Models of Nociception. *Pharmacological Reviews*. 53:597–652
- Marchart, E., Krenn, L., Kopp, B., 2003. Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. *Planta Medica*. 69, 452–466.
- Merighi, A., Salio, C., Ghirri A., et al., 2008. BDNF as a pain modulator. *Progress in Neurobiology*. 85, 297–317.
- Miroddi, M., Calapai, G., Navarra, M., Minciullo, P.L., Gangemi, S., 2013. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *Journal of Ethnopharmacology*. 150, 791–804.

- Murakami, S., Imbe, H., Morikawa, Y., Kubo, C., Senba, E., 2005. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neuroscience Research*. 53, 129–39.
- Netto, C.A., Siegfried, B., Izquierdo, I., 1987. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of a concurrent and post-training stressful stimulation. *Behavioral and Neural Biology*. 48, 304–309.
- Pandey, S.C., 2004. The gene transcription factor cyclic AMP responsive element binding protein: role in positive and negative affective states of alcohol addiction. *Pharmacology & Therapeutics*. 104, 47–58.
- Pandey, S.C., Zhang, H., Roy, A., Misra, K., 2006. Central and medial amygdaloid brain-derived neurotrophic factor signaling plays a critical role in alcohol-drinking and anxiety-like behaviors. *The Journal of Neuroscience*. 26, 8320–31.
- Parpura, V., Zorec, R., 2010. Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews*. 63, 83–92.
- Riley III, J.L., King, C., 2009. Self-report of alcohol use for pain in a multi-ethnic community sample. *Journal of Pain*. 10, 944–952.
- Thoenen, H., 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 270, 593–8.
- Trang, T., Beggs, S., Salter, M.W., 2011. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biology*. 7, 99–108.
- Woolfe, G., Macdonald, A.D., 1944. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 80, 300-307.

## Legends

Fig. 1. Effects of *Passiflora incarnata* extract in the tail flick test (TFL) in the nociceptive threshold of rats alcohol withdrawal.

Values represent the mean  $\pm$  standard error (n=9-10). After treatments the groups that received alcohol (group Alcohol Withdrawal and group *Passiflora incarnata* in Withdrawal of Alcohol) presents an increased in the nociceptive response in the TFL when compared to groups that received water (Water and *Passiflora incarnata* groups) (ANOVA/SNK,  $P>0.05$ ).

WATER means group Water, PASSI means group *Passiflora incarnata*, AW means Alcohol Withdrawal and PAWA means *Passiflora incarnata* in Withdrawal of Alcohol.

Fig. 2. Effects of *Passiflora incarnata* extract in the hot plate test (HPT) in the nociceptive response of rats alcohol withdrawal. Values represent the mean  $\pm$  standard error (n=8-10). The treatment with extract of *Passiflora incarnata* reversed the effect of the alcohol in the nociceptive response evaluated in the HPT, where group Alcohol Withdrawal increased the latency in the hot plate test (decreases nociceptive response) in relation to other groups analyzed (one-way ANOVA/SNK,  $P<0.05$ ).

WATER means group Water, PASSI means group *Passiflora incarnata*, AW means Alcohol Withdrawal and PAWA means *Passiflora incarnata* in Withdrawal of Alcohol.

Fig. 3. Effects of *Passiflora incarnata* extract in levels of BDNF in (A) prefrontal cortex, (B) brainstem and (C) hippocampus of rats alcohol withdrawal. Values represent the mean  $\pm$  standard error (n=4-5). \* Significant difference of other groups ( $P>0.05$ , SNK test).

WATER means group Water, PASSI means group *Passiflora incarnata*, AW means Alcohol Withdrawal and PAWA means *Passiflora incarnata* in Withdrawal of Alcohol.

Fig. 4. Effects of Effects of *Passiflora incarnata* extract in levels of IL-10 in (A) prefrontal cortex, (B) brainstem and (C) hippocampus of rats alcohol withdrawal. Values represent the mean  $\pm$  standard error (n=4-6). \* Significant difference of other groups (P=0.005, SNK test).

WATER means group Water, PASSI means group *Passiflora incarnata*, AW means Alcohol Withdrawal and PAWA means *Passiflora incarnata* in Withdrawal of Alcohol



## Figures

Figure 1

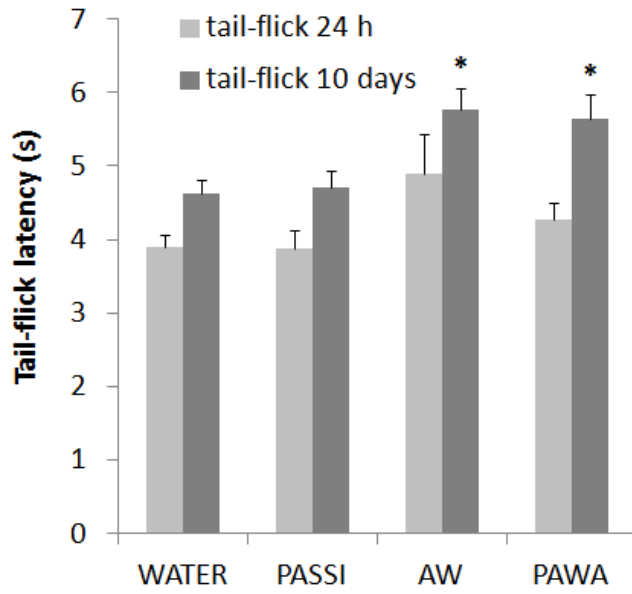


Figure 2

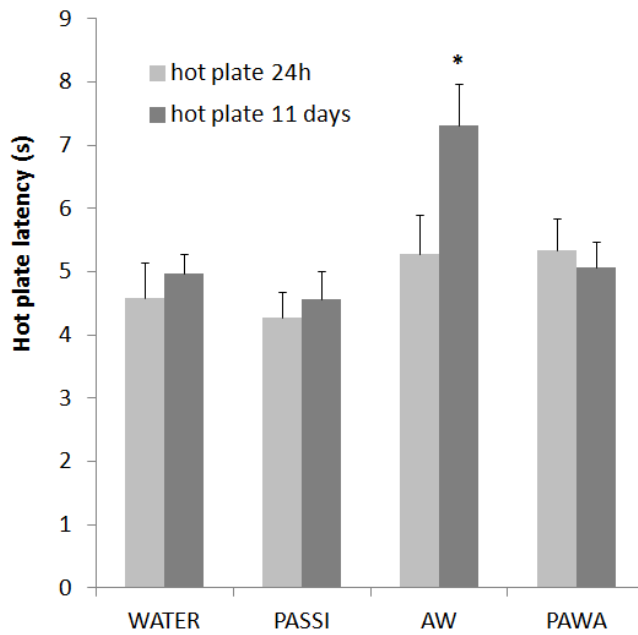


Figure 3

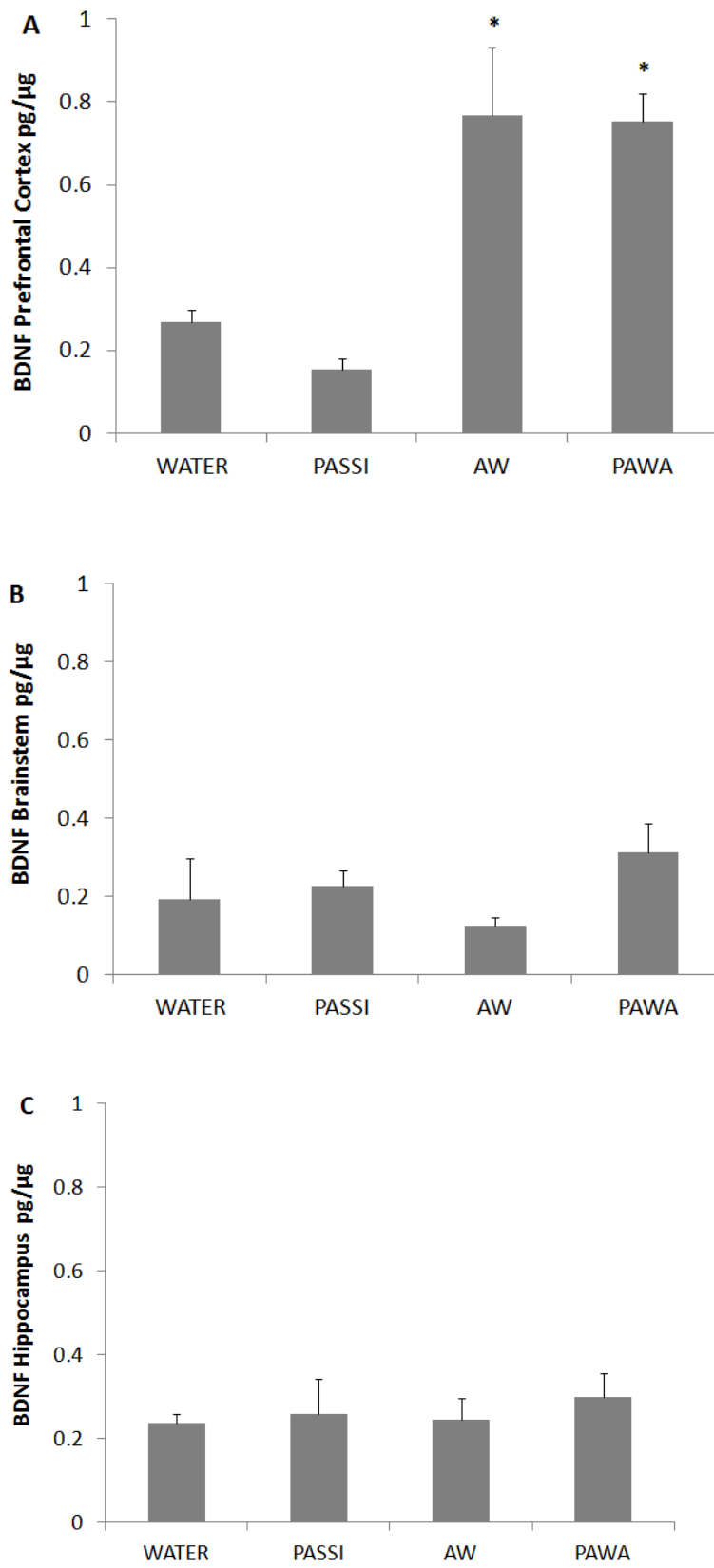
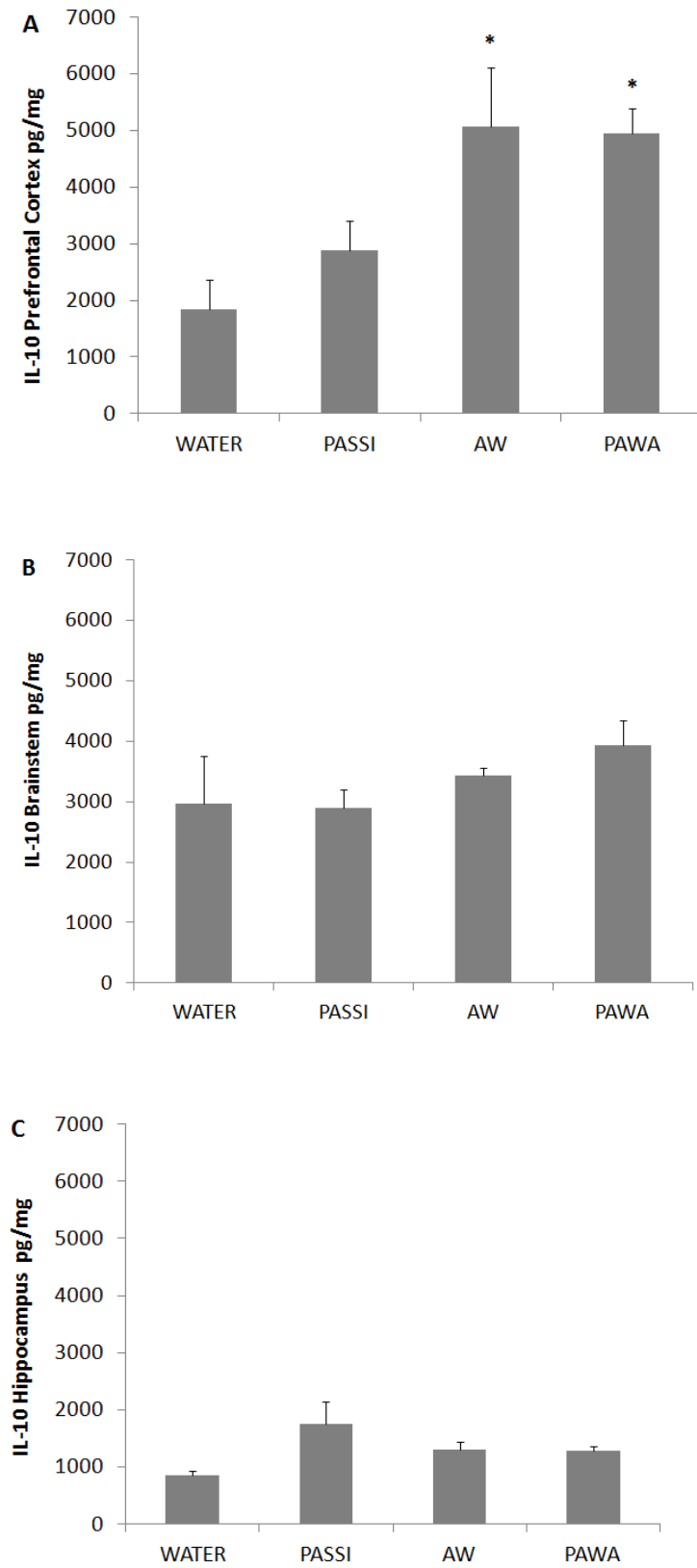


Figure 4



## **PARTE III**

### 3. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a retirada de álcool aumenta o limiar nociceptivo (avaliação realizada pelo teste do *tail-flick*) e diminui a resposta nociceptiva (avaliação realizada pelo teste da placa quente), observando-se então analgesia após retirada de álcool, ao contrário da hiperalgesia observada em muitos estudos que avaliaram a resposta nociceptiva após tratamento agudo ou crônico com álcool (EGLI *et al.*, 2012). Os testes nociceptivos que realizamos foram aplicados 10 dias após o último tratamento com álcool, enquanto que na maioria dos estudos que encontraram hiperalgesia, a resposta nociceptiva foi avaliada após algumas horas (3, 6, 12, 24, 36 h) ou alguns dias (1, 2, 3 dias) depois da retirada de álcool (GATCH & LAL, 1999; DINA, 2006; GATCH, 2009). Outro fator importante que deve ser levado em consideração é que realizamos uma administração intermitente de álcool, com episódios de retirada do tratamento, o que parece incrementar a abstinência.

Em relação ao aumento nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal de ratos abstinentes ao álcool, nossos dados corroboram com outros estudos que demonstraram aumento nos níveis desta neurotrofina em certas regiões encefálicas após tratamento com álcool (ALELE & DEVAUD, 2013). Entretanto, resultados envolvendo administração de álcool em ratos e avaliação dos níveis de BDNF são muito controversos, pois alguns apresentam acréscimo, enquanto outros demonstram decréscimo nos níveis. Esta questão pode estar relacionada ao fato de que existem diferenças entre o tempo decorrido desde a última administração de álcool e a retirada das estruturas a serem analisadas entre estudos, variando de horas a dias. No nosso trabalho realizamos a retirada das estruturas após 12 dias do término da administração do álcool. Além disso, pelos resultados encontrados em diversos estudos, a ação desta neurotrofina é complexa e varia também entre diferentes regiões encefálicas (HU &

RUSSEK, 2008). No processamento da dor, o BDNF atua nos níveis espinal e supra espinal modulando a resposta nociceptiva (PEZET & MCMAHON, 2006). Espinalmente, sabe-se que o aumento nos níveis de BDNF pode modular os níveis de glutamato, aumentando-os, por ação nos receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA, promovendo sobrevivência e recuperação neuronal num ambiente abstinentemente ao álcool. O BDNF também age na transmissão por GABA, possivelmente em receptores GABA<sub>A</sub> (CALDEIRA *et al.*, 2007). O papel desta neurotrofina no nível supra espinal é ainda parcialmente entendido. Estudos realizados nesta região relataram um efeito analgésico quando BDNF foi infundido diretamente no encéfalo, próximo à região da SCP e ao núcleo dorsal da rafe. Nesse experimento, o BDNF causou um decréscimo na resposta a estímulos térmicos e químicos (formalina). Esses efeitos foram acompanhados por aumento nos níveis de vários neurotransmissores (tais como opioides e peptídeos) no encéfalo e na medula espinal. Em particular, a atividade serotoninérgica aumentou e, nesse estudo, um efeito na síntese de serotonina foi hipotetizado (SIUCIAK *et al.*, 1994, 1995, 1998). Em acordo com o que foi encontrado no estudo anterior, FRANK e colaboradores (1997) demonstraram que a infusão contínua de altas doses de BDNF ao nível da SCP e do núcleo dorsal da rafe produziu analgesia, causando aumento da latência do *tail-flick* no prazo de 24 horas. Efeito analgésico também foi obtido durante estimulação térmica nociva após uma única administração intracerebroventricular de BDNF (CIRULLI *et al.*, 2000). Os achados anteriores podem sugerir que o aumento nos níveis de BDNF encontrados no nosso estudo no córtex pré-frontal de ratos após 12 dias de retirada de álcool podem ter contribuído para o desenvolvimento do efeito analgésico obtido pelas avaliações nociceptivas.

Em relação ao aumento observado nos níveis de IL-10 no córtex pré-frontal, hipocampo e tronco de ratos após 12 dias da retirada de administração de álcool, nosso estudo foi

pioneiro em correlacionar níveis desta interleucina nas estruturas analisadas após vários dias de abstinência. Sabe-se que a presença massiva de álcool no encéfalo gera um processo inflamatório, levando a ativação de células gliais na tentativa de restabelecer a homeostase. Estas células respondem liberando diversos mediadores no local inflamado (BLAYLOCK, 2013). Num primeiro momento, ocorre liberação de fatores pró-inflamatórios, levando a um estado hiperalgésico, o que explica outros estudos terem encontrado esse resultado após poucas horas ou dias da retirada de álcool. Como a liberação de mediadores ocorre de forma organizada e sequencial, num segundo momento tem-se a liberação de mediadores anti-inflamatórios, como por exemplo, a IL-10, os quais agem diminuindo a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, suprimindo a atividade de células Th1 e reparando o local lesionado (FERREIRA *et al.*, 2009). Estudos demonstraram que a administração sistêmica de IL-10 diminui processos inflamatórios a nível espinhal e produz um efeito analgésico em modelos de dor inflamatória (ZHOU *et al.*, 2008; VALE *et al.*, 2003). Então, o aumento de IL-10 em diferentes estruturas encefálicas pode estar envolvido no mecanismo que leva ao surgimento da analgesia observada através dos testes de *tail-flick* e placa quente realizados após 10 e 11 dias, respectivamente, da retirada do álcool.

Um importante aspecto que deve ser considerado são os substratos neurais que coincidem tanto na via da dor quanto no desenvolvimento do alcoolismo (EGLI *et al.*, 2012). Evidências experimentais sugerem que os substratos neurais relacionados aos aspectos emocionais da dependência e abstinência ao álcool coincidem com os substratos neurais dos aspectos emocionais do processamento nociceptivo em áreas encefálicas como a amígdala e o córtex pré-frontal, para onde as vias ascendentes do componente emocional da dor projetam-se (NEUGEBAUER *et al.*, 2004; VOGT, 2005). Assim, álcool atua diretamente nestas regiões da circuitaria nociceptiva ascendente para regular a plasticidade neuronal relacionada

à intersecção entre dor e aspectos negativos da dependência e abstinência de álcool (EGLI *et al.*, 2012). Interessantemente, o córtex pré-frontal envia projeções a estruturas subcorticais via sinapses glutamatérgicas, e estas projeções poderiam ser um substrato para a formação da memória da dependência via formação de mudanças de longo prazo que ocorrem na transmissão sináptica depois de exposição a drogas, entre elas o álcool (EGLI *et al.*, 2012). Um fator adicional na dependência de álcool que contribui para o desequilíbrio na homeostase e na transmissão glutamatérgica é a acentuada liberação de glutamato durante cada período de abstinência que pode induzir ou plasticidade de longo prazo, dano estrutural, ou uma combinação de ambos (HEILIG *et al.*, 2010; HERMANN *et al.*, 2012). De fato, abstinência de álcool produz mudanças de longo prazo em sinapses glutamatérgicas no córtex pré-frontal que parecem desempenhar um papel na adição e no relapso ao álcool (ABERNATHY *et al.*, 2010). Outro fato que é muito importante de ser levado em consideração é o resultado de um recente estudo que demonstrou que a metilação do ADN em genes do córtex pré-frontal pode estar envolvida na mediação da patologia associada com dor crônica. O estudo demonstrou que depois de 5 a 6 meses de dano aos nervos periféricos de camundongos observou-se uma redução da metilação do ADN no córtex pré-frontal e na amígdala. Além disso, intervenções que aliviaram a dor periférica nestes camundongos foram acompanhadas por aumento na metilação do ADN (TAJERIAN *et al.*, 2013; QUINTERO, 2013). Estes resultados, somados aos nossos, sugerem que o córtex pré-frontal pode participar de uma forma ativa na atenuação da resposta dolorosa. Como esta estrutura está envolvida tanto no desenvolvimento dos sintomas emocionais da dependência e abstinência de álcool como na resposta emocional da dor, o aumento nos níveis de BDNF e IL-10 após alguns dias de abstinência ao álcool ajuda na reversão dos danos causados pela presença massiva de álcool no encéfalo e contribuem para a atenuação da dor, no intuito de restabelecer o equilíbrio homeostático.



Nesse contexto, o extrato de *Passiflora incarnata* demonstrou reverter a analgesia observada pela avaliação do teste da placa quente, mas não apresentou efeito no teste do *tail-flick*. Esta reversão é benéfica, pois faz com que a resposta nociceptiva retorne aos níveis basais encontrados em ratos controle. Sabe-se que o teste da placa quente avalia a resposta nociceptiva a nível supra espinhal, e, portanto a *Passiflora incarnata* poderia modular a resposta nociceptiva nesse nível. Pelos resultados que obtivemos neste estudo verificamos que a reversão da analgesia produzida por este extrato não teve correlação com os níveis de BDNF e IL-10, os quais mostraram estar próximos aos níveis encontrados nos animais abstinentes ao álcool que não receberam tratamento. Podemos sugerir então que o aumento nos níveis das substâncias mencionadas se deve a uma ação *per se* da abstinência ao álcool. Sabe-se que a *Passiflora incarnata* contém muitos constituintes e que agem de uma maneira sinérgica (MIRODDI *et al.*, 2013). Sabe-se que alguns dos flavonoides desta planta possuem ação antioxidante (MASTEIKOVA *et al.*, 2008). Estudos realizados com o objetivo de encontrar o mecanismo de ação do efeito ansiolítico da *Passiflora incarnata* demonstraram que a planta contém uma certa quantidade do aminoácido GABA e que, além disso, outros constituintes desta planta exercem seus efeitos nos receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub> e na recaptação do GABA (CAMPBELL *et al.*, 2004; CARRATÙ *et al.*, 2008). Apesar de diversos trabalhos estudarem esta planta por seus efeitos ansiolíticos, não há muitos estudos correlacionando seus constituintes às suas outras ações farmacológicas já encontradas. Nesses sentido, faz-se necessário mais estudos que avaliem o mecanismo de ação desta planta que, pelos seus numerosos usos tradicionais que coincidem entre diferentes regiões geográficas, pode exercer efeito terapêutico em diversas patologias.

#### 4. CONCLUSÕES

Podemos concluir que a retirada de álcool aumenta o limiar nociceptivo e decresce a resposta nociceptiva, levando a analgesia. Este efeito pode estar relacionado ao aumento nos níveis centrais de BDNF e IL-10. O tratamento com extrato de *Passiflora incarnata* pode reverter a analgesia observada após a retirada de álcool, mas este efeito não tem correlação com níveis de BDNF e IL-10. Mais estudos são necessários, pois é preciso elucidar os mecanismos envolvidos tanto no desenvolvimento de analgesia numa fase mais tardia da abstinência ao álcool quanto na ação da *Passiflora incarnata* em revertê-la.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNATHY, K., CHANDLER, L.J., WOODWARD, J.J. Alcohol and the prefrontal cortex. *Int Ver Neurobiol*, 91: 289-320, 2010.

ACQUAAH-MENSAH, G.K., MISRA, V., BISWAL, S. Ethanol sensitivity: a central role for CREB transcription regulation in the cerebellum. *BMC Genomics*, 7: 308, 2006.

ALELE, P.E., DEVAUD, L.L. Expression of cFos and brain-derived neurotrophic factor in cortex and hippocampus of ethanol-withdrawn male and female rats. *J Pharmacol Pharmacother*, 4: 265–74, 2013.

BARNES, J., ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D. Maracujá. In: BARNES, J., ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D. *Fitoterápicos*, 3 ed., pp. 444–452. Porto Alegre: Artmed, 2012.

BARTH, K.S., MALCOLM. R.J. Disulfiram: An Old Therapeutic with New Applications. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9: 5–12, 2010.

BEAR, M.F., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A.; tradução DALMAZ, C., QUILLFELDT, J.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BLAYLOCK, R.L. Immunology primer for neurosurgeons and neurologists part 2: Innate brain immunity. *Surg Neurol Int*, 4: 118, 2013.

BLEDNOV, Y.A., PONOMAREV, I., GEIL, C., BERGESON, S., KOOB, G.F., HARRIS, R.A. Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes obtained from genomic studies. *Addict Biol*, 17: 108–120, 2012.

BOLANOS, C.A., NESTLER, E.J. Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromolecular Med*, 5: 69–83, 2004.

BOUZYK-SZUTKIEWICZ, J., WASZKIEWICZ, N., SZULC, A. Alcohol and psychiatric disorders. *Pol Merkur Lekarski*, 33(195): 176-81, 2012.

BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R., BRUNS, D.E. TIETZ Fundamentos de Química Clínica. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, pp. 578–582.

CALDEIRA, M.V., MELO, C.V., PEREIRA, D.B., CARVALHO, R.F., CARVALHO, A.L., DUARTE, C.B. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*, 35: 208-19, 2007.

CAMPBELL, E.L., CHEBIB, M., JOHNSTON, G.A. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA(A)receptors. *Biochem Pharmacol*, 68, 1631–1638, 2004.

CARRATÙ, B., BONIGLIA, C., GIAMMARIOLI, S., MOSCA, M., SANZINI, E. Free amino acids in botanicals and botanical preparations. *J Food Sci*, 73, C323–C328, 2008.

CIRULLI, F., BERRY, A., ALLEVA, E. Intracerebroventricular administration of brain-derived neurotrophic factor in adult rats affects analgesia and spontaneous behavior but not memory retention in a Morris Water Maze task. *Neurosci Lett*, 287: 207, 2000.

CISA (Centro de Informações sobre Saúde e Álcool), consultado em 06 de março de 2014. <http://www.cisa.org.br/artigo/155/i-levantamento-nacional-sobre-os-padres.php>.

CREWS, F., NIXON, K., KIM, D., JOSEPH, J., SHUKITT-HALE, B., QIN, L., ZOU, J. BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcohol Clin Exp Res*, 30: 1938–1949, 2006.

CREWS, F.T., ZOU, J., QIN, L. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun*, 25, S4–S12, 2011.

- D'AMOUR, F.E., SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther*, 72: 74-9, 1941.
- DAVIS, M.I. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. *Pharmacol Ther*, 118: 36–57, 2008.
- DAYAS, C.V., LIU, X., SIMMS, J.A., WEISS, F. Distinct patterns of neural activation associated with ethanol seeking: effects of naltrexone. *Biological Psychiatry*, 61: 979–989, 2007.
- DHAWAN, K., DHAWAN, S., SHARMA, A. Passiflora: a review update. *J Ethnopharmacol*, 94: 1–23, 2004.
- DINA, O.A., MESSING, R.O., LEVINE, J.D. Ethanol withdrawal induces hyperalgesia mediated by PKC $\epsilon$ . *Eur J Neurosci*, 24: 197-204, 2006.
- DSM-V-TR. *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*. 5º ed. 2013.
- EGLI, M., KOOB, G.F., EDWARDS, S. Alcohol dependence as a chronic pain disorder. *Neurosci Biobehav Ver*, 36: 2179–2192, 2012.
- ELISABETSKY, E., SOUZA, G.P.C., SANTOS, M. A. C., SIQUEIRA, I. R., AMADOR, T. Sedative properties of Linalol. *Fitoterapia*, 15(5): 407-414, 1995.
- FERREIRA, S.H., FERRARI, L.F., CUNHA, T.M., NASCIMENTO, P.G., JUNIOR, W.A.V., CUNHA, F.Q. Dor inflamatória. In: NETO, O.A., COSTA, C.M.C., DE SIQUEIRA, J.T.T., TEIXEIRA, M.J. (Ed) *Dor – Princípios e Prática*. 1.ed. cap. 19, pp. 265–279. Artmed: Porto Alegre, 2009.
- FONOFF, E.T. Mecanismo encefálico da dor. In: NETO, O.A., COSTA, C.M.C., DE SIQUEIRA, J.T.T., TEIXEIRA, M.J. (Ed) *Dor – Princípios e Prática*. 1.ed. cap. 13, pp. 176–188. Artmed: Porto Alegre, 2009.

FRANK, L., WIEGAND, S.J., SIUCIAK, J.A., LINDSAY, R.M., RUDGE, J.S. Effects of BDNF infusion on the regulation of TrkB protein and message in adult rat brain. *Exp Neurol*, 145: 62–70, 1997.

GASS, J.T., OLIVE, M.F. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol*, 75: 218–65, 2008.

GATCHEL, R.J., DERSH, J. Psychological disorders and chronic pain: are there cause-and-effect relationships? In: TURK, D.C, GATCHEL, R.J. (Ed) *Psychological approaches to pain management: a practitioner's handbook*. 2.ed. pp. 234–255. Guilford: New York, 2002.

GATCH, M.B. Ethanol withdrawal and hyperalgesia. *Curr Drug Abuse Rev*, 2: 41–50, 2009.

GATCH, M.B., LAL, H. Effects of ethanol administration and withdrawal on thermal nociception in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 23: 328–33, 1999.

GEORGE, O., KOOB, G.F. Individual differences in prefrontal cortex function and the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev*, 35: 232–247, 2010.

GHITZA, U.E., ZHAI, H., WU, P., AIRAVAARA, M., SHAHAM, Y., LU, L. Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: a review. *Neurosci Biobehav Rev*, 35: 157–171, 2010.

GONZALES, R.A., JOB, M.O., DOYON, W.M. The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacol Ther*, 103:121-146, 2004.

GOODMAN, A. Neurobiology of addiction: An integrative review. *Biochem Pharmacol*, 75: 266-322, 2008.

GUNDERSON, E.W., STIMMEL, B. Treatment of pain in drug-addicted persons. In: GALANDER, M., KLEBER, H.D. *Textbook of substance abuse treatment*. 3.ed. pp. 563–573. American Psychiatric Publishing: Washington, D.C, 2004.

HEILIG, M., KOOB, G.F. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends Neurosci*, 30:399–406, 2007.

HENRIQUES, A.A., KESSLER, F.H.P., NETO, O.A. Dor e dependência química. In: NETO, O.A., COSTA, C.M.C., DE SIQUEIRA, J.T.T., TEIXEIRA, M.J. (Ed) *Dor – Princípios e Prática*. 1.ed. cap. 75, pp. 926–932. Artmed: Porto Alegre, 2009.

HERMANN, D., WEBER-FAHR, W., SARTORIUS, A., *et al.* Translational magnetic resonance spectroscopy reveals excessive central glutamate levels during alcohol withdrawal in humans and rats. *Biol Psychiatry*, 71(11): 1015-21, 2012.

HU, Y., RUSSEK, S.J. BDNF and the diseased nervous system: A delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J Neurochem*, 105: 1-17, 2008.

HUGHES, J.R. Alcohol withdrawal seizures. *Epilepsy Behav*, 15: 92–97, 2009.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional da Saúde do Escolar, 2012. [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pense/2012/pense\\_2012.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pense/2012/pense_2012.pdf). Acesso em 04/01/2014.

JAFFE, J.H. Transtornos relacionados a substâncias. In: KAPLAN, H.J., SADOCK, B.J. (Ed) *Tratado de Psiquiatria*. Cap. 13, pp. 815-837. São Paulo: Artes Médicas, 1999.

JOHNSON, B. A., ROSENTHAL, N., CAPECE, J. A., WIEGAND, F., MAO, L., BEYERS, K., MCKAY, A., *et al.* Topiramate for treating alcohol dependence: a randomized controlled trial. *JAMA*, 298, 1641–1651, 2007.

JOHNSON, B.A. Update on neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings. *Biochem Pharmacol*, 75, 34–56, 2008.

JONES, D.J. Alcohol and violence: reflection on care and responsibility. *Rev Med Suisse*, 7(302): 1455-7, 2011.

KINGHORN, G. Passion, stigma, and STI. *Sex Transm Infect*, 77: 370–375, 2001.

KLEIN, R. Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J*, 8: 738–744, 1994.

KNAPP, D.J., BREESE, G.R. Models of Chronic Alcohol Exposure and Dependence. In: KOBEISSY, F.H. (Ed) *Psychiatric Disorders: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 829: 205–230, 2012.

LASSETER, H.C., XIE, X., RAMIREZ, D.R., FUCHS, R.A. Prefrontal cortical regulation of drug seeking in animal models of drug relapse. *Curr Top Behav Neurosci*, 3: 101–117, 2010.

LENAD. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas. INPAD. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas. [www.inpad.org.br/lenad](http://www.inpad.org.br/lenad) - Acesso em 06/01/2014.

LOVINGER, D.M., ROBERTO, M. Synaptic effects induced by alcohol. In: SOMMER, W.H., SPANAGEL, R. (Ed) *Behavioral neurobiology of alcohol addiction*. pp. 31–86. Springer: BASEL, 2012.

LU, B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem*, 10: 86–98, 2003.

MARSHALL, S.A., MCCLAIN, J.A., KELSO, M.L., HOPKINS, D.M., PAULY, J.R., NIXON, K. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. *Neurobiol Dis*, 54: 239–251, 2013.

MASON, B.J., HEYSER, C.J. Acamprosate: A prototypic neuromodulator in the treatment of alcohol dependence. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9(1): 23–32, 2010.

MASTEIKOVA, R., BERNATONIENE, J., BERNATONIENE, R., VELZIENE, S. Antiradical activities of the extract of *Passiflora incarnata*. *Acta Pol Pharm*, 65: 577-583, 2008.

MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L., DA SILVA, L.F.S. Mecanismos neurais e modulação da dor. In: NETO, O.A., COSTA, C.M.C., DE SIQUEIRA, J.T.T., TEIXEIRA, M.J. (Ed) *Dor – Princípios e Prática*. 1.ed. cap. 17, pp. 235–246. Artmed: Porto Alegre, 2009.



MEYER, J.S., QUENZER, L.F. Psychopharmacology: Drugs, the Brain, and Behavior. Sinauer Associates:Sunderland, MA, 2005.

MIRODDI, M., CALAPAI, G., NAVARRA, M., MINCIULLO, P.L., GANGEMI, S. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *J Ethnopharmacol*, 150: 791–804, 2013.

MOAL, M.L., KOOB, G.F. Drugs addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol*, 17: 377–393, 2007.

MOONAT, S., STARKMAN, B. G., SAKHARKAR, A., PANDEY, S.C. Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, 67:73–88, 2010.

NIH/NIAAA. National Institutes of Health/National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. 77, 2009.

NESTLER, E.J. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci*, 8 (11): 1445–1449, 2005.

NEUGEBAUER, V., LI, W., BIRD, G.C., HAN, J.S. The amygdala and persistent pain. *Neurosci*, 10: 221–234, 2004.

NIDA WEBSITE. Future directions, acessado em 6 Março de 2012. [www.nida.nih.gov/anout/milestone/Future.html](http://www.nida.nih.gov/anout/milestone/Future.html).

O'BRIEN, C.P. Anticraving medications for relapse prevention: A possible new class of psychoactive medications. *Am J Psychiatry*, 162: 1423–1431, 2005.

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*, 26: 1259–1268, 2002.

PANDEY, S.C. The gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein: role in positive and negative affective states of alcohol addiction. *Pharmacol Ther*, 104: 47–58, 2004.

PANG, P.T., LU, B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev*, 3: 407–430, 2004.

PELUCCHI, C., TRAMACERE, I., BOFFETTA, P., NEGRI, E., VECCHIA, C.L. Alcohol Consumption and Cancer Risk. *Nutr Cancer*, 63: 983–990, 2011.

PEZET, S., MALCANGIO, M. Brain-derived neurotrophic factor as a drug target for CNS disorders. *Expert Opin Ther Target*, 8: 391–399, 2004.

PEZET, S., MCMAHON, S.B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci*, 29: 507–538, 2006.

QIN, L., HE, J., HANES, R.N., PLUZAREV, O., HONG, J.S., CREWS, F.T. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation*, 5: 10, 2008.

QUINTERO, G.C. Advances in cortical modulation of pain. *J Pain Res*, 6: 713–725, 2013.

RAIVIO, N., TIRABOSCHI, E., SAARIKOSKI, S.T., CASTRÉN, E., KIIANMAA, K. Brain-derived neurotrophic factor expression after acute administration of ethanol. *Eur J Pharmacol*, 687: 9–13, 2012.

RAY, L.A., CHIN, P.F., MIOTTO, K. Naltrexone for the Treatment of Alcoholism: Clinical Findings, Mechanisms of Action, and Pharmacogenetics. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9: 13–22, 2010.

- REHWALD, A., STICHER, O., MEIER, B. Trace analysis of Harman alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Phytochem Analysis*, 6: 96–100, 1995.
- ROCCHITTA, G., SECCHI, O., ALVAU, M.D., MIGHELI, R., CALIA, G., BAZZU, G., FARINA, D., DESOLE, M.S., O'NEILL, R.D., SERRA, P.A. Development and characterization of an implantable biosensor for telemetric monitoring of ethanol in the brain of freely moving rats. *Anal Chem*, 84(16): 7072–9, 2012.
- RON, D., MESSING, R.O. Signaling pathways mediating alcohol effects. In: SOMMER, W.H., SPANAGEL, R. (Ed) *Behavioral neurobiology of alcohol addiction*. pp. 87–126. Springer, Basel, 2012.
- SAMPATH, C., HOLBIK, M., KRENN, L., BUTTERWECK, V. Anxiolytic effects of fractions obtained from *Passiflora incarnata* L. in the elevated plus maze in mice. *Phytother Res*, 25: 789–795, 2011.
- SHAHAM, Y., SHALEV, U., LU, L., De WIT, H., StEWART, J. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology*, 168: 3–20, 2003.
- SIUCIAK, J.A., ALTAR, C.A., WIEGAND, S.J., LINDSAY, R.M. Antinociceptive effect of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Brain Res*, 633: 326–330, 1994.
- SIUCIAK, J.A., CLARK, M.S., RIND, H.B., WHITTEMORE, S.R., RUSSO, A.F. BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *J Neurosci Res*, 52, 149–158, 1998.
- SIUCIAK, J.A., WONG, V., PEARSALL, D., WIEGAND, S.J., LINDSAY, R.M. BDNF produces analgesia in the formalin test and modifies neuropeptide levels in rat brain and spinal cord areas associated with nociception. *Eur J Neurosci*, 7: 663–670, 1995.

SOMMER, W.H. Pathophysiology of alcohol addiction. In: SOMMER, W.H., SPANAGEL, R. (Ed) *Behavioral neurobiology of alcohol addiction*. Cap. 10, pp. 84–96. Springer: Basel, 2012.

SPANAGEL, R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev*, 89: 649–705, 2009.

SUN, H., NEUGEBAUER, V. mGluR1, but not mGluR5, activates feed-forward inhibition in the medial prefrontal cortex to impair decision making. *J Neurophysiol*, 106: 960–973, 2011.

TAJERIAN, M., ALVARADO, S., MILLECAMP, M., et al. Peripheral nerve injury is associated with chronic, reversible changes in global DNA methylation in the mouse prefrontal cortex. *PLoS One*, 8(1): 55259, 2013.

TEIXEIRA, M.J. Fisiopatologia da dor. In: NETO, O.A., COSTA, C.M.C., DE SIQUEIRA, J.T.T., TEIXEIRA, M.J. (Ed) *Dor – Princípios e Prática*. 1.ed. cap. 12, pp. 145–175. Artmed: Porto Alegre, 2009.

THORSELL, A. Central neuropeptide Y in anxiety- and stress related behavior and in ethanol intake. *Ann N Y Acad Sci*, 1148:136–140, 2008.

ULMER, T., MACDOUGAL, J.M., ULMER, B. *Passiflora: passionflowers of the world*. Timber Press. Portland: USA, 2004.

UYLINGS, H.B., VAN EDEN, C.G. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog Brain Res*, 85: 31–62, 1990.

VALE, M.L., MARQUES, J.B., MOREIRA, C.A., ROCHA, F.A., FERREIRA, S.H., POOLE, S., et al. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 304: 102–108, 2003.

- VENGELIENE, V., BILBAO, A., MOLANDER, A., SPANAGEL, R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol*, 154 (2): 299–315, 2008.
- VOGT, B.A. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat Rev Neurosci*, 6: 533–544, 2005.
- WANG Y, GHEZZI A, YINin JC, ATKINSON NS (2009) CREB regulation of BK channel gene expression underlies rapid drug tolerance. *Genes Brain Behav*, 8:369–376
- WEINSHENKER, D. Special addiction issue editorial. *Biochem Pharmacol*, 75, Editorial, 2008.
- WITTE, P.D., PINTOB, E., ANSSEAUB, M., VERBANCKC, P. Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues. *Neurosci Biobehav Rev*, 27: 189–197, 2003.
- WOHLMUTH, H., PENMAN, K.G., PEARSON, T., LEHMANN, R.P. Pharmacognosy and chemotypes of passionflower (*Passiflora incarnata* L.). *Biolo Pharm Bull*, 33: 1015–1018, 2010.
- WOLF, K. Addiction Medicine. In: KARKH, J. (Ed) *Drug Abuse Handbook*. Cap. 7, pp. 500-513, CRC: São Francisco, 1998.
- WOOLFE, G., MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther*, 80: 300–307, 1944.
- ZHOU, Z., PENG, X., HAO, S., FINK, D.J., MATA, M. HSV-mediated transfer of interleukin-10 reduces inflammatory pain through modulation of membrane tumor necrosis factor  $\alpha$  in spinal cord microglia. *Gene Ther*, 15(3): 183–190, 2008.
- ZOU, J., CREWS, F. CREB and NF- $\kappa$ B transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol*, 26: 385–405, 2006.