

EVIDÊNCIA DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES GABA B NA MODULAÇÃO DO CONSUMO ETÍLICO EM RATOS WISTAR

**Anderson Proust Gonçalves De Souza¹, Daiane De Paula Barros¹, Luiza
Ferreira Ribeiro Tadeu¹, Jaqueline Melo Soares² & Patrícia Gonçalves da Motta³**

- 1- Acadêmicos do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil.
- 2- Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. Co-orientadora do TCC.
- 3- Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. Orientadora do TCC.

RESUMO

Introdução: O etilismo é um grave problema de saúde pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define o alcoolismo como uma doença complexa cujo tratamento faz-se necessário com processos profiláticos e terapêuticos de grande amplitude. Estudos demonstram a interação entre o etanol e o receptor GABA constatando uma redução de sintomas da síndrome de abstinência pelo uso de substâncias que aumentam a atividade do neurotransmissor. Atualmente, o tratamento da dependência alcoólica envolve medicamentos que atuam sobre receptores GABA_A. Estudos recentes demonstram evidências da participação de receptores GABA_B neste tratamento. **Objetivo:** Avaliar o efeito do baclofeno, um agonista GABA_B, sobre a diminuição ou interrupção do consumo etílico em ratos Wistar. **Métodos:** O protocolo consistiu em quatro fases: exposição, abstinência, re-exposição e tratamento. Os animais foram alocados em seis grupos: Grupos 1, 2, 3 e 4 ($n=5$ por grupo), expostos à água pura, solução hidroalcoólica 5% e solução hidroalcoólica 10%, Grupo 5 (subdividido em A, B e C, $n=5$ por subgrupo) e Grupo 6 ($n=5$), ambos expostos à apenas água pura. A administração de baclofeno via intraperitoneal se destinou aos animais dos grupos 1, 2, 3 e 5 (A, B e C) em diferentes doses. Nos demais grupos controles foi administrado solução salina. O consumo das soluções foi aferido em todas as fases para fins comparativos. **Resultados:** O uso de baclofeno, na dose de 1mg/Kg, reduziu o consumo etílico de solução hidroalcoólica a 10% (v/v) nos animais do grupo 1, grupo este que apresentou também maior consumo etílico durante o experimento. Os demais grupos apresentaram menor consumo das concentrações hidroalcoólicas ofertadas e não apresentaram redução de consumo etílico após administração da droga nas doses de 2 e 3mg/Kg. **Conclusão:** Baclofeno reduz etilismo apenas em animais com maior consumo etílico prévio à administração da droga. O peso dos animais não é fator determinante no consumo etílico ou na resposta ao baclofeno. A dose de baclofeno efetiva no tratamento dos efeitos da privação alcoólica foi a de menor concentração de administração, sendo esta de 1mg/kg.

Palavras-chave: Ratos Wistar. Baclofeno. Etilismo. Receptor GABA B.

1 INTRODUÇÃO

O uso inapropriado de bebidas alcoólicas é um grave problema de saúde pública, repercutindo na saúde física e mental de milhares de adultos e adolescentes. Alcoolismo é definido como uma doença crônica e progressiva caracterizada por uma perda de controle sobre o uso de álcool, com consequências sociais, legais, psicológicas e físicas subsequentes. Sintomas como depressão, ansiedade, demência, distúrbios gastrintestinais são algumas das doenças induzidas pelo uso abusivo do álcool (ROOM, 2013).

Os danos causados ao cérebro pelo uso do álcool, especialmente aqueles relacionados ao seu efeito sedativo, são referentes a alterações do movimento, memória, julgamento e respiração. Evidências científicas sugerem que o álcool inicialmente potencializa os efeitos do ácido gama-aminobutírico (GABA), principal substância inibitória do sistema nervoso central (SNC), o que explicaria sua ação ansiolítica e lentificadora do processamento cognitivo dos usuários. Porém, com o passar do tempo, o uso crônico do álcool reduz o número de receptores GABA por um processo de regulação negativa o que explicaria o efeito de tolerância ao álcool, ou seja, o fato dos indivíduos necessitarem de doses maiores de álcool para obter os mesmos sintomas anteriormente obtidos com doses previamente menores (ROBERTO; SIGGINS, 2006).

O neurotransmissor GABA está envolvido na regulação de uma variedade de mecanismos fisiológicos, implicado na patofisiologia de muitas doenças do SNC. O GABA é responsável por um terço de todas as transmissões sinápticas que ocorre no SNC e é conhecido por interagir com vários sítios receptores nas membranas neuronais, exercendo sua atividade através da interação com três tipos de receptores GABA_A, GABA_B e GABA_C (KINJO et al., 2013).

Os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos no uso abusivo de álcool, assim como as principais drogas estudadas até o momento para o tratamento da Síndrome de Abstinência Alcoólica (SAA), estão fundados em estudos referentes ao receptor GABA_A, tais como benzodiazepínicos e barbitúricos (HOBBS; RALL; VERDOORN, 1996).

O GABA também ativa receptores metabotrópicos GABA_B, os quais são amplamente distribuídos dentro do SNC e também nas terminações autonômicas periféricas. A sua ativação causa uma inibição da atividade da adenilato-ciclase. Os

receptores GABA_B estão acoplados através das proteínas G aos canais neuronais de íons K⁺ ou Ca⁺⁺, sendo que a ativação desse receptor aumenta a condutância de potássio ou o decréscimo da condutância de cálcio, modulando a inibição sináptica lenta nas membranas neurais (SUBROTO et al., 2011).

Durante vários anos, as intervenções farmacológicas ficaram limitadas no que diz respeito ao tratamento da SAA e ao uso de drogas para tal finalidade. Nos últimos anos, novas drogas atuantes em receptores GABA foram desenvolvidas, porém, até o presente momento, nenhuma droga ou combinação de medicamentos obteve sucesso pleno na terapêutica do etilismo. O baclofeno, uma droga agonista seletivo de GABA_B, tem sido apontado como uma nova opção de tratamento, quando administrado em animais por via intravenosa ou intracérebro ventricular (MÜLLER et al., 2014).

O baclofeno é estruturalmente semelhante ao GABA, possuindo mais um grupo clorofenil, que se traduz por maior lipossolubilidade, sendo ele o ácido (-)-(R)-4-amino-3-(4-clorofenil)-butírico (Baclofen). É um antiespástico de ação medular altamente eficaz, no entanto, atravessa com dificuldade a barreira hematoencefálica (BHE), sendo necessário recorrer a elevadas doses por via oral, para a obtenção de concentrações eficazes no líquido. Apesar do mecanismo de ação não ser conhecido com exatidão, sabe-se que atua através da inibição das vias aferentes polissinápticas e monossinápticas, ligando-se aos receptores GABA_B acoplados aos canais de cálcio e potássio pertencentes às interações pré e pós-sináptico. Em nível pré-sináptico, este hiperpolariza a membrana bloqueando o influxo de cálcio e, conseqüentemente, reduzindo a liberação de neurotransmissores nas vias espinhais excitatórias e a atividade do neurônio motor alfa. Em nível pós-sináptico liga-se às terminações aferentes aumentando a condutância do potássio, hiperpolarizando a membrana e promovendo a inibição pré-sináptica. A transmissão neuromuscular não é afetada por este fármaco (MÜLLER et al., 2014).

Existem poucos trabalhos que avaliam o efeito de baclofeno, quando administrado em via de rápida disseminação sistêmica, como a intraperitoneal em ratos. A proposta do presente estudo foi avaliar o potencial desta droga, quando administrada em baixas concentrações, por via intraperitoneal, na redução do consumo de etanol em ratos Wistar, e cujos resultados podem contribuir para o controle da dependência e abstinência alcoólica em humanos.

2 MÉTODOS

2.1 Animais

O estudo consistiu em um trabalho experimental, aprovado pelo Comitê de Ética de Animais do Instituto Metropolitano de Ensino Superior (protocolo 01.001.14).

Os animais sujeitos à experimentação foram da espécie *Rattus norvegicus*/ ratos Wistar provenientes do Biotério do Instituto Metropolitano de Ensino Superior (IMES/UNIVAÇO), Ipatinga – MG, com idade em torno de 110 dias, e peso aproximado de 200-500g, com média de 340g. A amostra foi composta por um total de 40 animais, sendo 18 do sexo feminino (45%) e 22 do sexo masculino (55%).

O número de animais adotados no procedimento experimental seguiu de maneira similar ao número utilizado em estudo previamente publicado na literatura (BOAS et al., 2012).

Os animais foram alojados em gaiolas galvanizadas nas dimensões de 25x13x12cm, sendo um animal/gaiola, mantidos sob condição de temperatura controlada variando de 18-25°C, ciclo claro-escuro de 12 horas e dieta *Ad libitum* (ração Nuvilab). A maravalha foi renovada 3 vezes por semana, pela parte da manhã nos dias de segunda, quarta e sexta-feiras.

2.2 - Descrição geral do experimento

Inicialmente os animais foram distribuídos, de forma aleatória, em seis grupos (1, 2, 3, 4, 5 e 6), sendo cinco deles compostos por cinco animais e um grupo de 15 animais, num total de quarenta (Quadro 1). Em primeiro momento, antes do início dos experimentos, eles passaram por um período de uma semana de ambientação. Após este período, na fase I do experimento, os animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 receberam dieta *Ad libitum* e, por três semanas, tiveram dieta líquida que foi ofertada em três opções diferentes contendo, respectivamente, solução hidroalcoólica 10%v/v, outra, com solução hidroalcoólica 5%v/v e, por fim, contendo água pura, as quais foram ofertadas diariamente e simultaneamente aos animais. Essa fase experimental foi denominada de fase de Exposição.

Ao final de três semanas, na fase II do experimento, os animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 sofreram uma ausência na oferta das soluções hidroalcoólicas por um

período de uma semana, sendo ofertada apenas água pura, caracterizando essa a fase de Abstinência. Ao final desta semana, fase III do experimento, os grupos 1, 2, 3 e 4 sofreram uma re-exposição contínua às diferentes concentrações de solução hidroalcoólica e água, idênticas às praticadas na fase I de experimentação por um período de uma semana. Tal fase recebeu o nome de Re-exposição.

Ao longo de todo o período experimental, os grupos 5 e 6 também receberam dieta *Ad libitum* e foram ofertadas três mamadeiras contendo apenas água, sem adição de qualquer outra substância. Foram considerados, portanto, como grupos controles.

Quadro 1. Distribuição dos animais conforme o grupo

Grupo 1	Cinco animais
Grupo 2	Cinco animais
Grupo 3	Cinco animais
Grupo 4	Cinco animais
Grupo 5A	Cinco animais
Grupo 5B	Cinco animais
Grupo 5C	Cinco animais
Grupo 6	Cinco animais
Total	Quarenta animais

2.2.1 Grupos experimentais

Na fase IV, os animais foram avaliados quanto ao grau de consumo etílico com o intuito correlacionar o grau de dependência etílica, ao efeito terapêutico esperado da droga baclofeno na abstinência pelo etanol. Por duas semanas subsequentes, os animais dos grupos 1, 2 e 3 receberam dias alternados de baclofeno e mantiveram a exposição às diferentes concentrações de solução hidroalcoólica (5% e 10% v/v) e água (fase IV). As doses de baclofeno administradas para os grupos 1, 2 e 3 foram nas concentrações de 1, 2 e 3mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal. Esta fase transcorreu por duas semanas.

2.2.2 Grupos controle

O GRUPO CONTROLE 4: refere-se aos animais do grupo 4, que sofreram a mesma dinâmica de oferta de água e solução hidroalcoólica do grupo experimental (1, 2 e 3), exceto pelo fato de não receber a droga baclofeno. A fim de controle experimental, foi administrada a estes animais solução fisiológica 0,9% intraperitoneal.

O GRUPO CONTROLE 5: refere-se aos animais do grupo 5, aos quais foram ofertadas três mamadeiras de água e foi administrado baclofeno intraperitoneal nas doses idênticas aos do grupo experimental, sendo que os grupos 5A, 5B e 5C, receberam respectivamente 1, 2 e 3mg/kg.

O GRUPO CONTROLE 6: refere-se aos animais do grupo 6, que receberam desde o início do experimento apenas a oferta de água e a este também foi administrada solução salina 0,9% intraperitoneal.

O procedimento experimental é descrito no Quadro 2.

Quadro 2- Descrição do procedimento experimental

	<i>Grupos experimentais</i>			<i>Grupos controle</i>		
	1	2	3	4	5 (A,B e C)	6
Fase I Exposição	Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Oferta diária: Água	Oferta diária: Água
Fase II Abstinência	Oferta diária: Água	Oferta diária: Água	Oferta diária: Água	Oferta diária: Água	Oferta diária: Água	Oferta diária: Água
Fase III Reexposição	Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Oferta diária: Água	Oferta diária: Água
Fase IV Baclofeno e Avaliação	Baclofeno 1mg/kg Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Baclofeno 2mg/kg Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Baclofeno 3mg/kg Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Solução fisiológica 0,9% Oferta diária: SHA* 10% e 5% Água	Baclofeno 1,2 e 3 mg/kg Oferta diária: Água	Solução fisiológica 0,9% Oferta diária: Água

* SHA: Solução hidroalcoólica

2.2.3 Administração de baclofeno

Os animais foram pesados no início do período de ambientação e na última fase do experimento em balança analítica Toledo, modelo 2090 XXIIC Série: 00033009877-GB.

A dose administrada a cada animal variava de acordo com o peso individual. Para obtenção dessa dose adequada, diluições foram necessárias. O medicamento foi armazenado sob refrigeração até o momento das administrações. O volume máximo de 2 mL por 100g de peso corporal foi respeitado quando da administração das soluções de baclofeno aos animais

Para a realização deste procedimento, os animais eram retirados da gaiola, contidos firmemente, colocando-se a mão sobre o dorso e a caixa torácica. A cabeça era contida com o polegar e o indicador, imediatamente atrás da mandíbula. Cada animal era manipulado individualmente respeitando a ordem crescente dos grupos e numérica de cada animal. O medicamento era então administrado por via intraperitoneal, nas diferentes concentrações, aos diferentes grupos de animais. O período de administração da droga seguiu conforme descrito anteriormente.

2.3- Coleta de dados

Sempre ao final dos intervalos de 48 horas, eram aferidos os volumes residuais tanto de água quanto das soluções hidroalcoólicas por meio de proveta de graduação. Da mesma forma o volume repostado de água e soluções hidroalcoólicas era sempre previamente aferidos em proveta antes de serem alocados nas devidas mamadeiras. As provetas eram sempre higienizadas e secas em estufa para minimizar resíduos de secagem.

O valor consumido pelo animal no decorrer de 48 horas foi determinado subtraindo-se o volume residual encontrado nas mamadeiras do volume previamente ofertado (250ml). O valor obtido era então registrado em tabelas de controle confeccionadas individualmente para cada animal assim como em planilhas do programa Microsoft Office Excel 2007. Essa rotina permaneceu inalterada no decorrer de todo o procedimento.

2.4- Análise de dados

Os dados foram digitados no software Microsoft Excel 2010 e analisados no pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versão 15.0. Foram realizadas análises descritivas por meio do cálculo de medidas de tendência central (média e mediana) e de variabilidade (desvio-padrão, mínimo e máximo). Para ilustrar os resultados foram construídos gráficos de linhas para avaliação do consumo entre os grupos ao longo das quatro fases.

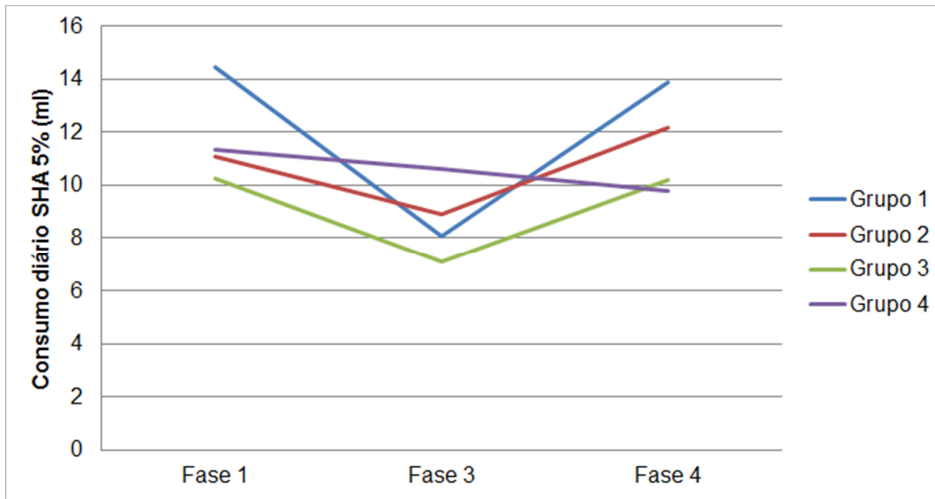
Para avaliar se houve diferença no consumo ao longo das fases em cada grupo foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Optou-se por utilizar um teste não-paramétrico devido ao caráter assimétrico das variáveis analisadas. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%.

3 Resultados

No gráfico 1 pode-se observar o consumo de solução hidroalcoólica 5% durante as fases I, III e IV, que correspondem respectivamente às fases de exposição, re-exposição e tratamento com baclofeno, para os grupos 1, 2, 3 e 4.

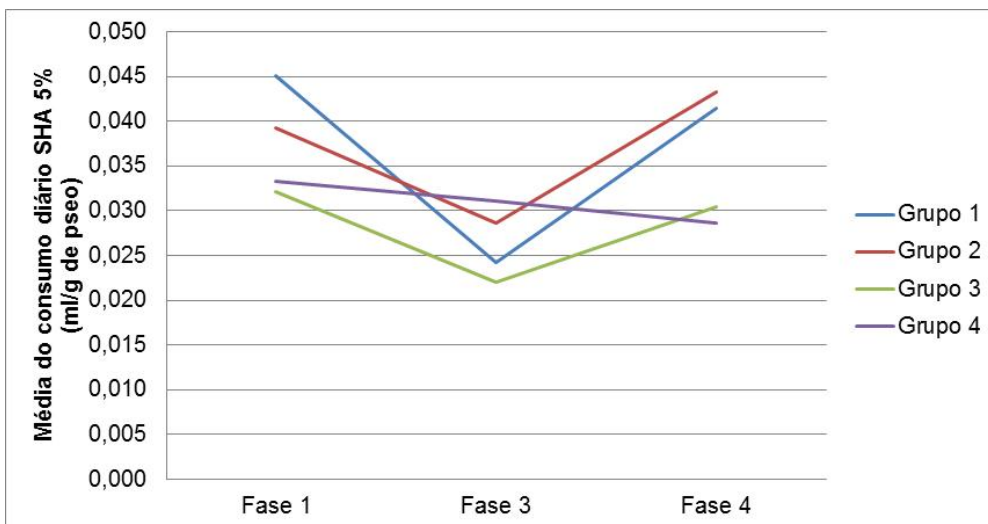
A comparação múltipla demonstrou que os grupos 1, 2 e 3 apresentaram o mesmo padrão de redução no consumo da solução hidroalcoólica na fase III, porém sem significância estatística ($p > 0,05$). A análise dos grupos entre as fases III e IV evidenciou aumento no consumo entre os grupos 1, 2 e 3, novamente sem significância estatística ($p > 0,05$). O grupo 4 divergiu dos anteriores por apresentar queda linear de consumo entre as fases I e IV, também sem significância estatística ($p > 0,05$).

GRÁFICO 1- Consumo médio diário de Solução Hidroalcoólica 5%



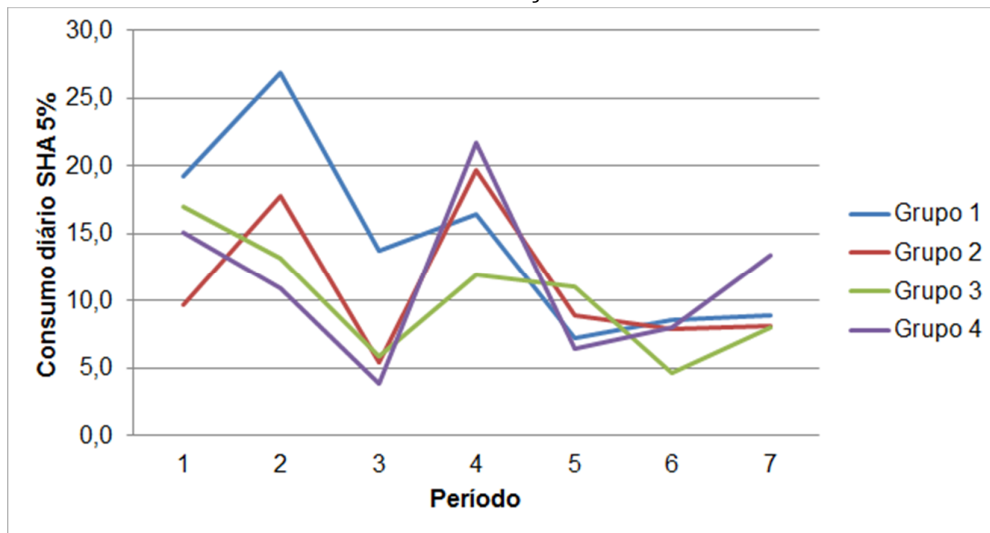
No gráfico 2 evidencia-se a média de consumo diário de solução hidroalcoólica a 5% em mL por peso em gramas, a fim de se eliminar o viés estatístico de maior consumo de um grupo em função de seu maior peso corporal. Novamente o padrão de consumo foi similar entre os grupos com uma redução no consumo da solução hidroalcoólica na fase III nos grupos 1, 2 e 3 ($p>0,05$), seguindo tendência anterior de aumento de consumo entre as fases III e IV ($p>0,05$). Quanto ao grupo 4 seguiu-se a tendência de queda linear ($p>0,05$).

GRÁFICO 2- Consumo médio diário de Solução Hidroalcoólica 5% por kg de peso



O gráfico 3 evidencia o consumo diário de solução hidroalcoólica a 5% nos grupos experimentais 1, 2, 3 e 4 ao longo da fase de exposição, sendo o período compreendido referente a 3 semanas de exposição. Cada intervalo deste período corresponde a 3 dias. Observa-se que este consumo ocorreu de forma variável, não sendo identificado um padrão fixo de ingestão hidroalcoólica. No início desta fase, houve um maior consumo no grupo 1 e um menor no grupo 4, porém observa-se uma inversão desses valores durante a o intervalo 4 na segunda semana, quando o consumo diário do grupo 4 ultrapassa o dos demais, apresentando maior consumo ao final da fase de exposição. Vale ressaltar que os resultados encontrados, novamente, não apresentaram valor estatisticamente significativo ($p>0,05$).

GRÁFICO 3- Consumo médio diário de Solução Hidroalcoólica 5% durante fase de exposição



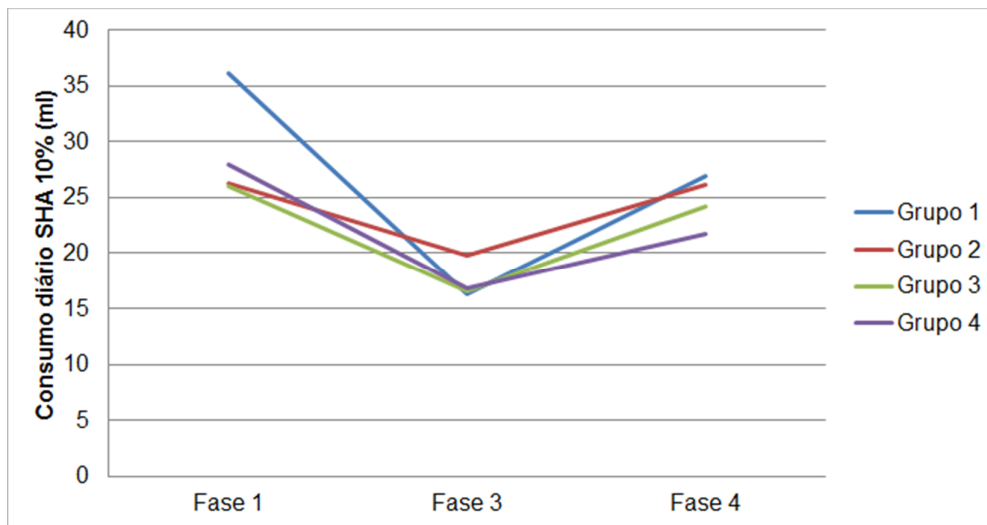
O gráfico 4 exibe comparação múltipla do consumo de solução hidroalcoólica 10% durante as fases I, III e IV, nos grupos 1, 2, 3 e 4. O padrão de consumo estatisticamente relevante foi observado no grupo 1 com diferença de média de consumo entre as fases I e III de 19,77 ml/dia ($p = 0,006$) Neste mesmo grupo houve aumento de consumo médio diário entre as fases III e IV com aumento de 13,62 ($p = 0,04$). Ainda comparando as fases, observou-se queda de consumo médio diário entre as fases I e IV de 9,15ml/dia ($p = 0,032$)

No grupo 2 observamos aumento médio de consumo de 6,3ml/dia ($p=0,027$) entre as fases III e IV, sem significância estatística dentre as outras fases.

O grupo 3 apresentou queda de consumo médio de 9.49ml/dia ($p=0,038$) entre as fases I e III e aumento de consumo médio de 7.73ml/dia entre as fases III e IV ($p=0,024$). Não houve diferença estatística entre as fases I e IV.

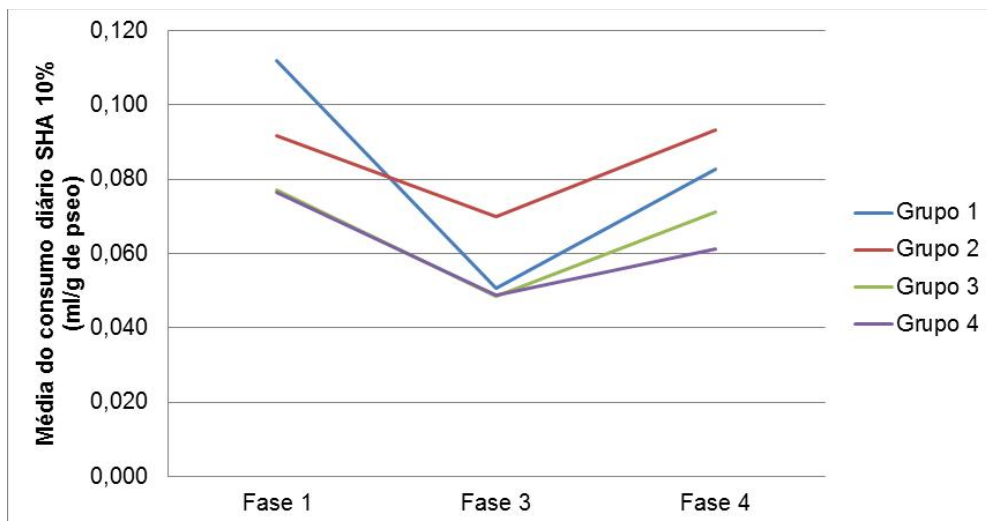
O grupo 4 divergiu dos anteriores por não apresentar tendências de queda ou aumento de consumo de significância estatística.

GRÁFICO 4- Consumo médio diário de Solução Hidroalcoólica 10%



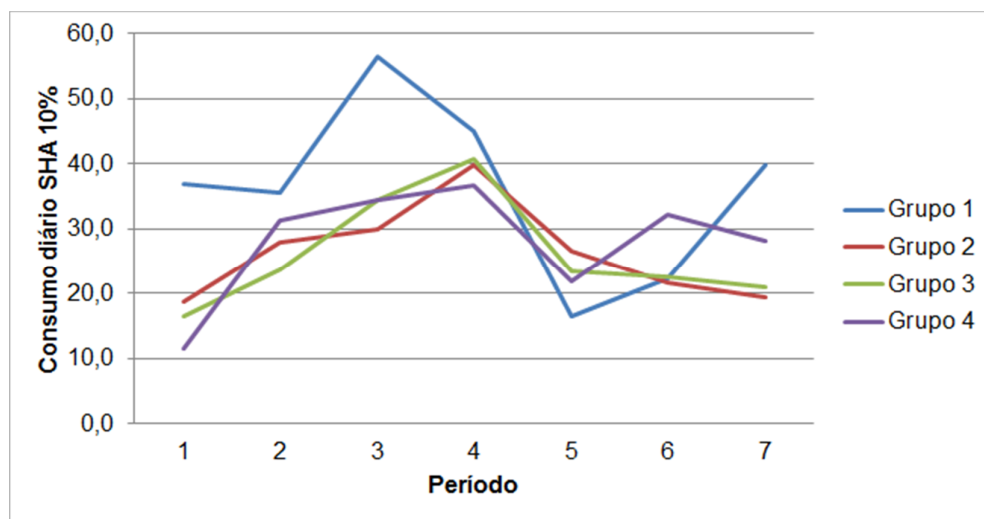
O gráfico 5 evidencia a média de consumo diário de solução hidroalcoólica a 10% em mililitro, por peso em gramas. Em todos os grupos observamos correspondência estatística de aumento e diminuição de consumos observados no gráfico 4, eliminando o viés de divergências de consumo referente ao peso.

GRÁFICO 5- Consumo médio diário de Solução Hidroalcoólica 10% por kg de peso



No gráfico 6, demonstra-se o consumo diário de solução hidroalcoólica a 10% dos mesmos grupos descritos anteriormente (gráfico 5) durante a fase de exposição de 21 dias, sendo cada intervalo de período correspondente a 3 dias. Observa-se que o grupo 1 manteve um maior consumo até o décimo segundo dia, porém no décimo quinto dia foi o grupo com a menor ingestão hidroalcoólica. A partir do décimo oitavo dia, apresentou um incremento de consumo, mantendo-se ao final da fase como o grupo de maior valor de consumo diário. Quanto aos demais grupos, observou-se uma alternância na quantidade de solução ingerida durante todo o período de teste. Em nenhum dos grupos obteve-se um resultado com significância estática, sendo o valor de $p > 0,05$.

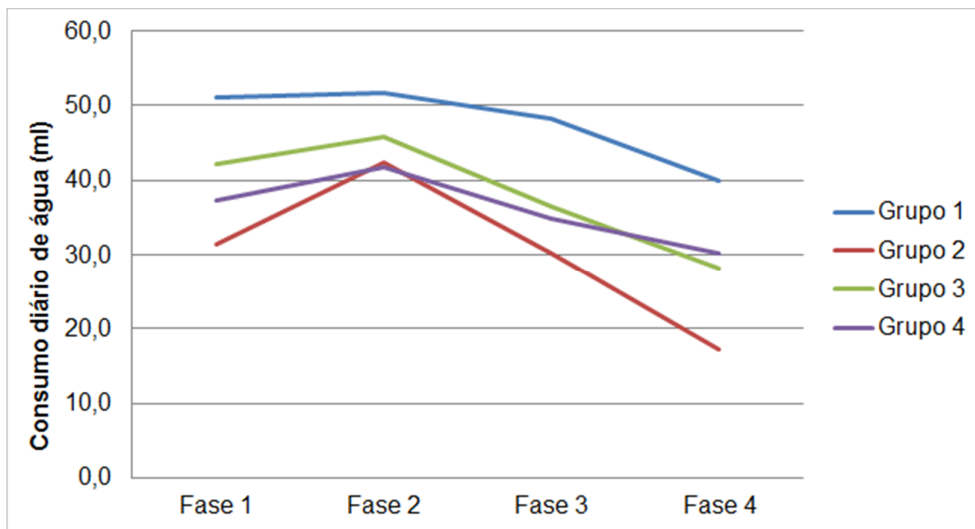
GRÁFICO 6- Consumo médio diário de Solução Hidroalcoólica 10% durante fase de exposição



No gráfico 7 estão expressos os consumos médios diários de água das fases I, II, III, e IV entre os grupos 1, 2, 3 e 4.

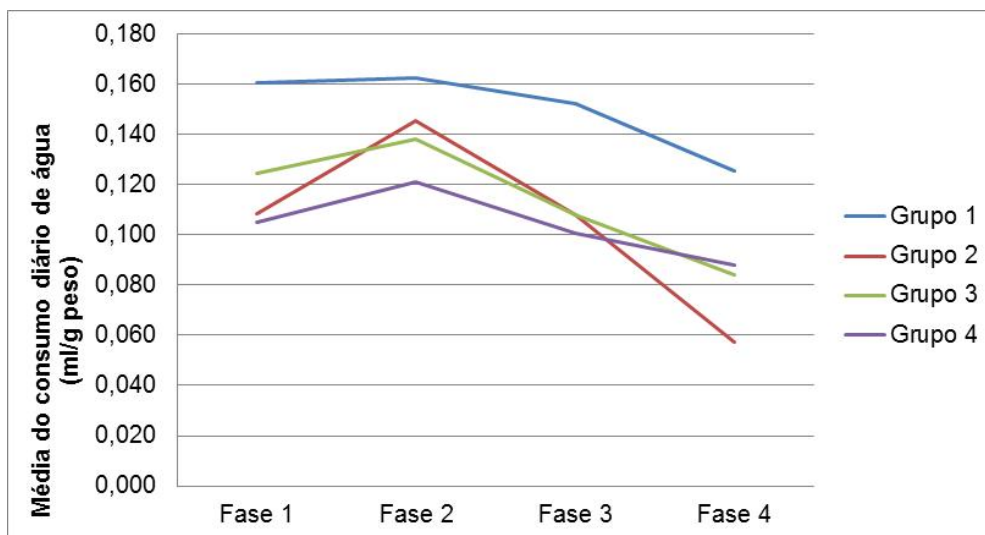
De uma forma geral pode-se observar um padrão de incremento de consumo entre as fases I e II e um decréscimo a partir da fase II até a fase IV. Em nenhum dos grupos, entretanto, observou-se relevância estatística no aumento de consumo médio entre as fases I e II. Nos grupos 1, 2 e 3 pode-se observar declínio de consumo estatisticamente significativo somente entre as fases I e IV com valores de $p = 0,01$. O grupo 4 não apresentou significância estatística em qualquer dos intervalos entre as fases estudadas.

GRÁFICO 7- Consumo médio diário de água



O gráfico 8 no qual se expressa o consumo de água/peso evidencia que os grupos 1, 2 e 3 apresentaram significância estatística com $p < 0,05$, no que diz respeito à redução do consumo médio diário de água entre as fases I e IV, validando os achados do gráfico 7.

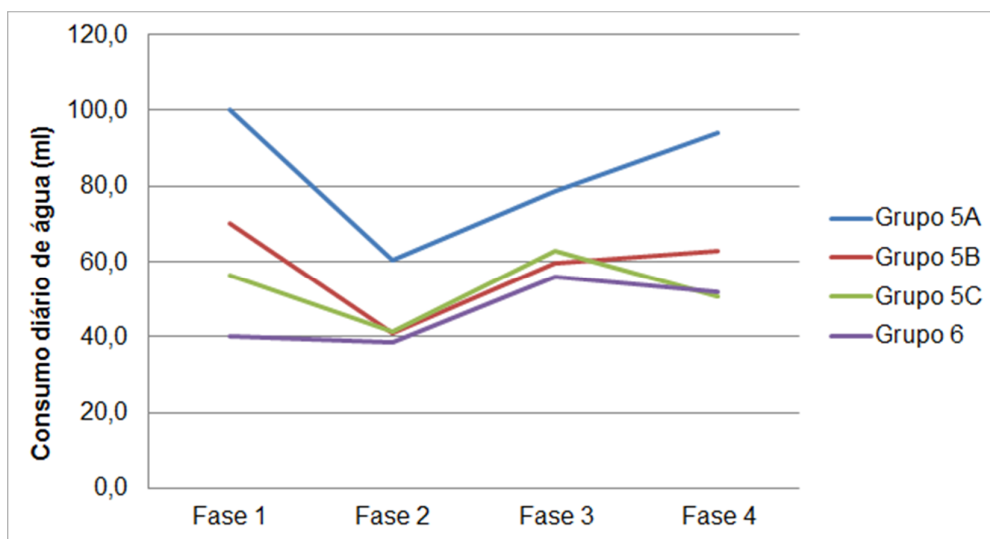
GRÁFICO 8- Consumo médio diário de água por kg de peso



O gráfico 9 evidencia o consumo diário de água nos grupos 5A, 5B, 5C e 6 durante cada fase do experimento. Vale ressaltar que estes grupos não foram expostos à solução hidroalcoólica em nenhum momento.

Observa-se um decréscimo no consumo de água em todos os grupos ao compararmos a fase II com a fase I ($p < 0,05$), sendo essa redução mais discreta no grupo 6 ($p > 0,05$). A partir da fase II, houve um aumento do consumo também em todos os grupos, de forma que no 5A e 5B, esse padrão se manteve até o final do teste. Nos grupos 5C e 6, observou-se uma discreta queda no consumo hídrico após a fase III, mantendo-se este padrão até o final da fase IV.

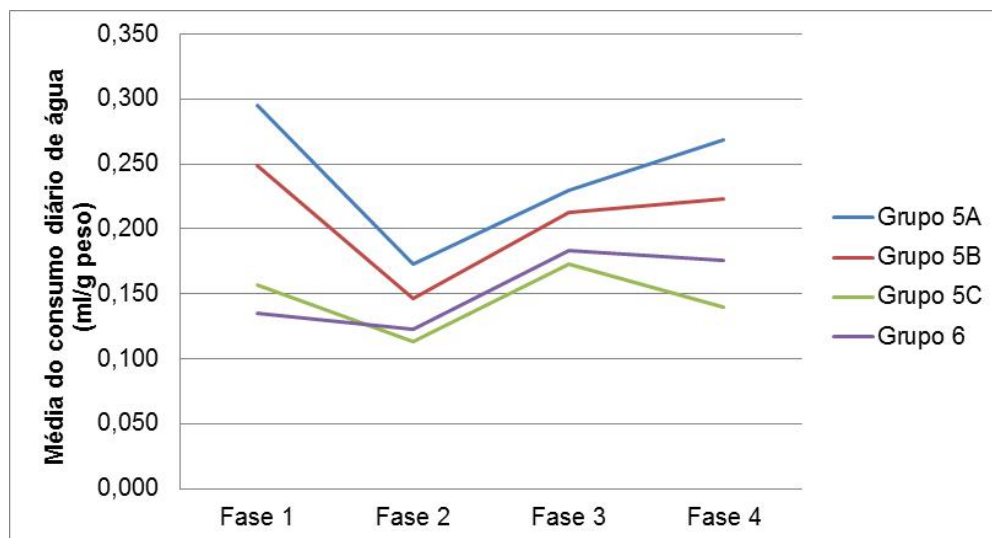
GRÁFICO 9- Consumo médio diário de água em grupos controle



Já no gráfico 10, demonstra-se a média do consumo diário de água relacionando-se ml/g de peso. Observa-se o mesmo padrão descrito no gráfico anterior, porém há uma diferença quanto ao consumo dos grupos 5C e 6 que, ao considerarmos a variável peso, evidenciou-se um menor consumo proporcional no grupo 5C com relação ao grupo 6, o que não foi demonstrado ao avaliarmos apenas o consumo hídrico de forma isolada (gráfico 9).

Observa-se variação estatisticamente significativa entre as fases I e II, e II e IV entre todos os grupos, exceto o grupo 6, cujo único dado significativo foi a alteração evidenciada entre as fases II e III, com $p = 0,001$.

GRÁFICO 10- Consumo médio diário de água por kg de peso em grupos controle



3 DISCUSSÃO

Levando-se em consideração o objetivo principal deste trabalho que foi caracterizar um possível efeito do baclofeno no consumo de álcool por ratos expostos a diferentes concentrações de soluções hidroalcoólicas, o grupo com maior padrão de consumo etílico foi o grupo 1, sendo o único a demonstrar redução de consumo após administração da droga, na concentração de 1mg/Kg.

No manejo dos animais durante a fase de exposição, pode-se observar que o peso não influenciou de maneira significativa o consumo de álcool, não sendo este, um fator determinante de consumo de solução hidroalcoólica 5%. Desprezado este possível viés estatístico, pode-se avaliar o efeito final do consumo de solução hidroalcoólica 5% pelos animais após o tratamento com baclofeno nas diferentes concentrações. Independente de um maior ou menor consumo inicial de álcool pelos animais, ao contrário do esperado, em nenhum grupo experimental observou-se impacto considerável da administração da droga, em qualquer concentração, no consumo final de álcool quando comparado ao consumo inicial. Há ainda grande divergência na literatura quanto ao real efeito desta droga, especialmente quando utilizado em diferentes espécies de roedores, assim como diferentes concentrações de baclofeno, sendo este um ponto de especulação quanto à dose correta a ser utilizada e sua variação de acordo com a genética e susceptibilidade de cada

espécie em estudo (COLOMBO et al., 2000; BECHTHOLT; CUNNINGHAM, 2005; CZACHOWSKI et al., 2006; MOORE; BOEHM, 2009; WALKER; KOOB, 2007;).

Com base na susceptibilidade etílica oriunda de questões envolvendo diferenças genéticas, ao analisar os mesmos animais sob as mesmas condições de manipulação e avaliação de dados, pode-se observar que o grupo 1 manteve um padrão inicial de maior consumo de solução hidroalcoólica 10% em relação aos demais. Porém, ao contrário do ocorrido com a solução hidroalcoólica 5%, na qual não houve diferença estatisticamente significativa na redução de consumo após administração da droga, neste grupo de animais houve uma queda de consumo médio de 9,15 ml/dia de solução hidroalcoólica 10% com $p = 0,032$, o que leva a crer em alguma participação da droga neste resultado, apesar de ser um achado isolado, em apenas um grupo experimental. Tal resultado encontra respaldo novamente ao eliminar o viés estatístico da influência do peso dos animais no consumo. Estudos anteriores demonstraram também que animais considerados como consumidores maiores de álcool têm uma tendência a sofrer maior grau de impactação na redução de consumo etílico após utilização da droga baclofeno (JOHNSON, 2010).

Foi evidenciado que apenas os grupos 1 e 3 demonstraram redução estatisticamente relevante do padrão de consumo da solução hidroalcoólica a 10%, entre as fases de exposição e re-exposição após um período de abstinência. Estes resultados contrariam a expectativa de retomada de consumo maior ao da fase de exposição primária em todos os grupos e nas diferentes concentrações de solução hidroalcoólica. Tal fato pode ser explicado por trabalhos anteriores que descreveram ser o etilismo proveniente de desordens heterogêneas em relação a sua etiologia multifatorial e envolvendo complexas interações entre vários genes e fatores ambientais (MOROZOVA et al., 2012).

Diferentes fatores de risco, tais como traços de personalidade e patologias psiquiátricas relacionadas à impulsividade, estão relacionadas à maior propensão ao etilismo (LEGGIO et al., 2009; LEJUEZ et al., 2010; ARAGUES et al., 2011).

Traços de ansiedade comportamental, demonstrados em estudos anteriores, foram correlacionados a maior ingestão alcoólica em ratos, porém ainda com resultados contrastantes na literatura (SPANAGEL et al., 1995; LANGEN; FINK, 2004; BAHJ, 2013)

Em um recente estudo, foi analisado o consumo etílico voluntário e comportamental de ratos Wistar. Efeitos de abstinência foram observados apenas

naqueles animais considerados como consumidores etílicos ávidos, assim como comportamento sugestivo de pouca ansiedade após a ingesta alcoólica, provavelmente devido às propriedades ansiolíticas do etanol (MOMENI; ROMAN, 2014). Na presente pesquisa o comportamento animal não foi avaliado em qualquer momento, mas fica claro, conforme argumentado previamente, uma maior predileção de animais do grupo 1 por consumo etílico assim como um ganho maior de peso comparado a outros grupos. Tal fato pode ser atribuído a uma maior ingesta alimentar, provavelmente devido a um componente de maior stress ou ansiedade por parte destes animais, que corrobora com o ganho de peso.

Quanto à administração da droga baclofeno, a dose administrada aos animais não seguiu necessariamente uma correspondência de acordo com o padrão de consumo etílico. Ao grupo 1, coube receber a administração da dose de 1 mg/kg/dia de baclofeno, sendo esta a menor das doses, já que os grupos 2 e 3 receberam respectivamente 2 e 3 mg/kg/dia da droga. Os grupos controle 5A, 5B e 5C receberam respectivamente 1, 2 e 3 mg/kg/dia da suspensão de baclofeno, enquanto o grupo 6 recebeu placebo, composto apenas por solução fisiológica à 0,9%.

As concentrações de baclofeno foram determinadas de acordo com dados encontrados na literatura (TANCHUCK et al., 2011). No estudo citado, a dose de baclofeno na concentração de 5 mg/kg/dose administrada por via intraperitoneal, reduziu o consumo etílico em camundongos, como também a ingesta hídrica e consumo alimentar além de afetar a capacidade motora dos mesmos. Decidiu-se por utilizar uma dose mínima de 1mg/kg/dose e uma máxima de 3 mg/kg/dose com o propósito de não afetar a capacidade locomotora dos animais.

Da mesma forma, como evidenciado por Tanchuk et al. (2011), observou-se que o baclofeno exerceu alguma influência na ingestão hídrica dos animais. Nos grupos controle, foi observada alteração estatisticamente significativa nos grupos 5C, apresentando uma redução do consumo, enquanto no 5A e 5B, observou-se o oposto, com o incremento da ingesta hídrica entre as fases de re-exposição e a de administração do medicamento.

Ao avaliarmos os grupos expostos ao etanol, observou-se um declínio no consumo de água em todos os que receberam as diferentes doses de baclofeno, porém essa redução não teve seu início logo após a administração da droga, e sim após a fase de abstinência. Além disso, não se observou relação entre a dose

administrada e a quantidade proporcional de redução, de forma que o grupo com um declínio mais acentuado não foi aquele que recebeu a maior dose da droga.

Tais alterações contribuem para um possível questionamento quanto ao efeito sedativo do baclofeno, especificamente nos resultados apresentados neste estudo, o que leva a cogitar outras justificativas além da sedação. Caso fosse somente este o fator determinante, além de observar um comportamento seguindo um padrão de redução de consumo de água de acordo com a dose da droga, o que não ocorreu, esperar-se-ia também que a redução de consumo etílico também seguisse esta mesma tendência nos grupos experimentais. Contudo, observou-se que apenas no grupo 1, que recebeu a menor dose da droga, houve queda do consumo etílico, fato este não observado nos grupos os quais receberam concentrações maiores da droga, e que mantiveram o mesmo padrão de ingestão alcoólica.

Entretanto, vale ressaltar que os grupos que receberam apenas o placebo, tanto o exposto ao etanol e água (grupo 4), quanto ao exposto apenas à água pura (grupo 6), não demonstraram alterações significativa de consumo de água ou de etanol durante todo o experimento. O que não permite descartar algum efeito que o baclofeno tenha exercido nos demais grupos.

Ainda de acordo com Tanchuck et al. (2011), a efetividade do baclofeno em reduzir o consumo alcoólico se manteria após 8 horas, desaparecendo 10 horas após a primeira injeção intraperitoneal da mesma, sugerindo que o momento da administração da droga e a mensuração do consumo etílico poderia ser crítico na avaliação do efeito da droga sobre o etilismo. No presente estudo, utilizou-se o período de administração e aferição de consumo de 48 horas para todos os grupos, contrastando os dados relatados por este autor, porém corroborados por outro estudo de Boas et al. (2012), no qual camundongos foram utilizados como modelo experimental e foi evidenciado efetiva participação do baclofeno na redução de consumo etílico após 24 horas da administração do mesmo.

A razão pela qual a menor concentração da droga se mostrou exclusivamente efetiva no grupo que teve maior consumo etílico pode encontrar resposta tanto na questão genética individual, quanto no provável mecanismo de ação do baclofeno. Os genes que codificam as subunidades GABA1 e GABA2 são diferentemente expressos em camundongos que demonstram alto padrão de consumo etílico (KALIVAS; VOLKOW, 2005), assim como genes *GABBR1* e *GABBR2* possuem maior grau de transcrição no córtex pré-frontal, com níveis mais baixos de RNAm,

GABBR2 no hipocampo e níveis maiores de transcrição de *GABBR1* no núcleo estriado (RIBEIRO et al., 2010, RIBEIRO et al., 2012).

O que ainda parece permanecer incerto é de que forma estes diferentes padrões de transcrição podem influenciar no padrão de consumo de etanol. Pode-se inferir, a partir de análises genotípicas, que agonistas GABA são efetivos na redução de ingesta alcoólica quando há equilíbrio entre as subunidades GABA_{B1} e GABA_{B2}. Alguns autores tem ainda afirmado que a própria conformação da subunidade GABA1 e conseqüentemente a relação entre GABA1-GABA2 é necessária para ativação do receptor GABA_B (MORISHITA; KATO; ASANO, 1990).

Fato é que além da expressão dos genes *GABBR1* e *GABBR2*, e da conformação de seus produtos, há ainda uma íntima relação de diferentes sistemas neuroquímicos, incluindo sistemas gabaérgicos e opióides, que modulam as áreas da recompensa e do prazer estimuladas pelo consumo de etanol (KOOB; LE MOAL, 2005).

A questão relacionada ao consumo de etanol e o grau de impacto positivo que o baclofeno pode gerar no tratamento em humanos foi também observado por alguns autores. Existem diferentes padrões de resposta ao baclofeno frente a diferentes padrões de etilismo, sendo este fato, inclusive alvo de uma revisão bibliográfica, que propõe avaliar o grau de efetividade do baclofeno em controlar sintomas de abstinência e dependência etílica em indivíduos com diferentes níveis de consumo etílico (MUZYK; RIVELLI; GAGLIARDI, 2012).

5 Conclusão

Apenas a menor concentração da droga baclofeno na posologia de 1mg/kg/dose demonstrou possível efeito na redução do etilismo no grupo com maior padrão de consumo de solução hidroalcoólica. A princípio, o uso de baclofeno parece reduzir o etilismo apenas em grupos de animais que apresentam maior padrão de consumo etílico prévio à administração da droga. O que fica é o questionamento se a dose de baclofeno efetiva no tratamento dos efeitos da privação alcoólica seria a de menor concentração de administração, sendo a encontrada no estudo de 1mg/kg/dose.

Os animais de uma forma geral apresentaram um consumo maior de solução hidroalcoólica em maior concentração de etanol. O peso dos animais não foi fator

determinante tanto no padrão de consumo etílico quanto na resposta ao baclofeno. A metodologia aplicada mostrou-se viável para o estudo de consumo etílico em ratos Wistar, antes e após a administração da droga.

Uma limitação do trabalho repousa no fato de não ter sido avaliado o efeito de diferentes concentrações da droga no grupo o qual demonstrou maior consumo de etanol. Em experimentos futuros, a oferta de uma única concentração alcoólica de 10% v/v reduziria custos operacionais e demanda de trabalho técnico, já que esta foi a solução mais consumida pelos animais. O presente experimento poderia ser ampliado e a metodologia utilizada para estudo comparativo da redução do consumo etílico perante uso de baclofeno e outra droga conhecidamente utilizada no tratamento do etilismo. Ainda referente à metodologia, seria interessante a mensuração de teor alcoólico sanguíneo dos animais antes e após a administração da droga baclofeno de maneira a ter uma certeza maior quanto à redução de consumo etílico após o uso da mesma.

EVIDENCE OF THE INVOLVEMENT OF GABA B RECEPTOR ON ETHYLIC CONSUMPTION MODULATION IN WISTAR RATS

ABSTRACT

Introduction: the alcoholism is a serious public health problem. The World Health Organization (WHO) defines alcoholism as a complex illness whose treatment it is necessary with prophylactic and therapeutic processes of large amplitude. Studies demonstrate the interaction between ethanol and GABA receptor noting a reduction of symptoms of withdrawal syndrome by use of substances that increase the activity of the neurotransmitter. Currently, the alcoholic addiction treatment involves medicines that act on GABA receptors. Recent studies have shown evidence of the involvement of GABA B receptor in this treatment. **Objective:** to evaluate the effect of Baclofen, a GABA B agonist, in the reduction or interruption of ethyl consumption in Wistar rats. **Methods:** the protocol consisted of four phases: exposure, abstinence, re-exposure and treatment. The animals were allocated into six groups: groups 1, 2, 3 and 4 ($n=5$ per group), exposed to pure water, 5% ethanol solution and 10% ethanol solution, Group 5 (subdivided into A, B and C, $n=5$ by subgroup) and Group 6 ($n=5$), exposed to just pure water. The intraperitoneal administration of Baclofen was destined to animals in groups 1, 2, 3 and 5 (A, B and C) in different doses. In the remaining groups was administered saline solution controls. The consumption of the solutions was assessed in all phases for comparative purposes. **Results:** the use of Baclofen, at a dose of 1mg/Kg, reduced the ethyl consumption of the 10% (vv) water-alcohol solution in animals from Group 1, this group also presented greater ethanol consumption during the experiment. The other groups showed a lower consumption of the water-alcohol solutions offered and did not showed a reduction of the ethylic use after the administration of de drug in 2 and 3mg/Kg doses. **Conclusion:** Baclofen only reduces alcoholism in animals with higher ethanol consumption prior to drug administration. The weight of the animals is not a determining factor in the ethyl consumption or in the response to baclofen. The effective dose of baclofen in treating the effects of alcohol deprivation was observed in the lowest concentration, corresponding to 1mg/Kg dose.

Key-words: Wistar Rats. Baclofen. Alcoholism. GABA B Receptor.

REFERÊNCIAS

ARAGUES, M. et al. Laboratory paradigms of impulsivity and alcohol dependence: a review. *Eur Addict Res*, v. 17, n. 2, p.64-71, 2011.

BAHI, A. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 105, p. 83–8, 2013.

BECHTHOLT, A. J; CUNNINGHAM, C. L. Ethanol-induced conditioned place preference is expressed through a ventral tegmental area dependent mechanism. *Behav Neurosci*, v. 119, n.1, p. 213–23, 2005.

BOAS, G. R. V. et al. Gaba_B receptor agonist only reduces ethanol drinking in light-drinking mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 102, n. 2, p. 233-40, 2012.

COLOMBO, G et al. Ability of baclofen in reducing alcohol intake and withdrawal severity: I - Preclinical evidence. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 24, n. 1, p. 58–66, 2000.

CZACHOWSKI, C. L.; LEGG, B. H.; STANSFIELD, K. H. Ethanol and sucrose seeking and consumption following repeated administration of the gabab agonist baclofen in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 30, n. 5, p.812-8, 2006.

HOBBS, W. R.; RALL, T. W.; VERDOORN, T. A. Hipnóticos e sedativos: etanol. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G., eds. *Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica*. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraaw-Hill Interamericana, 1996. p.361-396.

JOHNSON, B. A. Medication treatment of different types of alcoholism. *Am J Psychiatry*, v. 167, n. 6, p. 630–9, 2010.

KALIVAS, P. W; VOLKOW, N. D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am Journal of Psychiatry*, v. 162, n. 8, p. 1403-1413, 2005.

KINJO, A. et al. Evolutionary History of the GABA Transporter (GAT) Group Revealed by Marine Invertebrate GAT-1. *PLoS ONE*, v.8, n.12, p. 25-7, 2013.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. *Neurobiology of addiction*. Academic Press, 2005.

LANGEN, B.; FINK, H. Anxiety as predictor of alcohol preference in rats? *Progneuro-psychoph*, v. 28, p. 961–8, 2004.

LEGGIO, L. et al. Typologies of alcohol dependence. From Jellinek to genetics and beyond. *Neuropsychology Review*, v. 19, n. 1, p. 115-129, 2009.

LEJUEZ, C. W. et al. Behavioral and biological indicators of impulsivity in the development of alcohol use, problems, and disorders. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 34, n. 8, p. 1334-1345, 2010.

MOMENI, S.; ROMAN, E.. Subgroup-dependent effects of voluntary alcohol intake on behavioral profiles in outbred Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, v. 275, p. 288-296, 2014.

MOORE, E. M.; BOEHM II, S. L. Site-specific microinjection of baclofen into the anterior ventral tegmental area reduces binge-like ethanol intake in male C57BL/6J mice. *Behavioral neuroscience*, v. 123, n. 3, p. 555, 2009.

MORISHITA, R.; KATO, K.; ASANO, T. GABA B receptors couple to G proteins G_o, G_q and G_{i1} but not to G_{i2}. *FEBS letters*, v. 271, n. 1, p. 231-235, 1990.

MOROZOVA, T. V. et al. The genetic basis of alcoholism: multiple phenotypes, many genes, complex networks. *Genome Biol*, v. 13, n. 2, p. 239, 2012.

MÜLLER, C. A. et al. Current pharmacological treatment approaches for alcohol dependence. *Expert Opin Pharmacother*, v.15, n.4, p 471-81, 2014.

MUZYK, A.J.; RIVELLI, S. K.; GAGLIARDI, J. P. Defining the role of baclofen for the treatment of alcohol dependence. *CNS drugs*, v. 26, n. 1, p. 69-78, 2012.

RIBEIRO, A. F et al. The *gabbr1* and *gabbr2* genes are involved with addictive behavior: a study in different phenotypes of ethanol consumers. *Alcohol clin exp res*, v. 34, suppl 2 , p. 39a, 2010.

RIBEIRO, A. F. et al. A transcriptional study in mice with different ethanol-drinking profiles: possible involvement of the GABA B receptor. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 102, n. 2, p. 224-232, 2012.

ROBERTO, M; SIGGINGS, G. Nociceptin/orphanin FQ presynaptically decreases GABAergic transmission and blocks the ethanol-induced increase of GABA release in central amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v.103, n.25, p.9715–9720, 2006.

ROOM, R. Healthy is as healthy does: Where will a voluntary code get us on international alcohol control? *Addiction*, v.108, n.3, p.456–457, 2013.

SPANAGEL, R. et al. Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology*, v. 122, n. 4, p. 369-373, 1995.

SUBROTO, G. et al. The GABAB receptor as target for antidepressant drug action. *British Journal of Pharmacology*, v. 162, n.1, p. 1-17, 2011.

TANCHUCK, M. A. et al. Assessment of GABA-B, metabotropic glutamate, and opioid receptor involvement in an animal model of binge drinking. *Alcohol*, v. 45, n. 1, p. 33-44, 2011.

WALKER, B.M.; KOOB, G. F. The γ -Aminobutyric Acid-B Receptor Agonist Baclofen Attenuates Responding for Ethanol in Ethanol-Dependent Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 31, n. 1, p. 11-18, 2007.