RULIAN RICARDO FARIA

***Sensibilidade diferencial aos efeitos
comportamentais induzidos por etanol e sobre a
expressão de c-Fos e Egr-1, entre camundongos
adultos e adolescentes***

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Farmacologia).

Área de Concentração: Farmacologia

São Paulo
2007

RULIAN RICARDO FARIA

***Sensibilidade diferencial aos efeitos comportamentais
induzidos por etanol e sobre a expressão de c-Fos e Egr-1,
entre camundongos adultos e adolescentes***

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Farmacologia).

Área de Concentração: Farmacologia

Laboratório: Laboratório de Neuroquímica e

Farmacologia Comportamental

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Camarini

São Paulo
2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Faria, Rulian Ricardo.

Sensibilidade diferencial aos efeitos comportamentais induzidos por etanol e sobre a expressão de *c-Fos* e *Egr-1*, entre camundongos adultos e adolescentes / Rulian Ricardo Faria. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Rosana Camarini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neuroquímica e Farmacologia Comportamental aplicada a Farmacodependência.

Versão do título para o inglês: Differential sensitivity to ethanol-induced behavioral effects and *c-Fos/Egr-1* expression between adolescent and adult mice.

Descritores: 1. Etanol 2. Adolescentes 3. Comportamento 4. Gene Fos 5. Proteínas nucleares 6. Sistema Límbico I. Camarini, Rosana II. Universidade São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

ICB/SBIB136/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rulian Ricardo Faria.

Título da Dissertação: Sensibilidade diferencial aos efeitos comportamentais induzidos por etanol e sobre a expressão de *c-Fos* e *Egr-1*, entre camundongos adultos e adolescentes.

Orientador(a): Rosana Camarini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **017** nas fls. **16** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Rosana Camarini, Coordenadora da Linha de Pesquisa "**Efeitos comportamentais e neuroquímicos da administração de etanol em camundongos adolescentes**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Rulian Ricardo Faria, Priscila Fernandes Carrara do Nascimento**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **26.04.2005**.

São Paulo, 27 de abril de 2005.

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

“A sabedoria, como uma herança, é coisa boa, e beneficia aqueles que vêem o sol. A sabedoria oferece proteção, como o faz o dinheiro, mas a vantagem do conhecimento é esta: a sabedoria preserva a vida de quem a possui”.

Eclesiastes 07:11-12

*Primeiramente a Deus, pois
sem ele eu não estaria aqui.
Em segundo lugar a meus pais,
João e Elizabete,
a minha irmã Silvia,
a minha sobrinha Raphaela
e meu cunhado Rafael Marcelo,
que participaram de minha batalha
cheia de alegrias, tristezas, vitórias, derrotas
e dificuldades .*

*A Rosana,
pelo investimento,
incentivo, amizade, paciência,
compreensão e por todos os seus
ensinamentos, o muito muitíssimo obrigado
por ter acreditado em mim e por ter sempre
caminhado ao meu lado durante a confecção deste trabalho.*

*Ao Luís Renato,
que por estar ao meu lado
nos momentos mais difíceis
compartilhando de cada tijolinho
no desenvolvimento deste trabalho,
também concluiu uma Tese de Mestrado.*

Gostaria de agradecer...

Aos professores Britto e Cristóforo, por terem proporcionado os recursos necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao André e ao Adilson, pela ajuda técnica indispensável para que este trabalho acontecesse.

Aos amigos de laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental da USP: Priscila, Jaqueline, Cristina, Sabrina, Marília, Cristian, Ana, Daniel, Cecília e Mateus.

Aos amigos do laboratório do professor Cristóforo: Lídia, Larissa, Carolina, Lucília e Elisa.

A Cidinha, por cuidar tão bem e com tanto carinho dos meus animais.

A Selma e a Julieta, por sempre terem me ajudado na parte burocrática deste trabalho.

A Juliana Quadros, amiga de grandes jornadas, lutas, incentivos, sofrimentos e alegrias.

Aos amigos: Isabel Proença, Cibele, Silvio Marinho, Marcelo Venâncio, Isaac, Fabiana, Willian, Stelinha, Nilza, Marcelo Bergamo, Rejane, Claudia, Luciana, Carla, Érika, Fabiola, Adriana L, Teotíla, Christian, Danila, Patrícia Shimono, Márcia, Airtton, Carol, Beatriz, Raquel e André (Splinter).

A meus primos Ivete e Décio, por terem me acolhido no momento mais difícil de minha vida na caminhada por esta grande metrópole. E também pelo grande incentivo, apoio e amizade.

A todos aqueles que fizeram parte de minha vida que não estão aqui mencionados.

Aos animais, que possibilitaram conhecer um pouco mais os mistérios do cérebro, meus sentimentos mais puros de agradecimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro dado ao desenvolvimento deste trabalho.

Este projeto teve apoio financeiro da FAPESP e do CNPq na forma de auxílios à pesquisa. O pós-graduando recebeu bolsa de estudo do CNPq durante o mestrado.

RESUMO

RULIAN, R. F. **Sensibilidade diferencial aos efeitos comportamentais induzidos por etanol e sobre a expressão de *c-Fos* e *Egr-1*, entre camundongos adultos e adolescentes**. 2007. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O uso de drogas de abuso inicia-se geralmente na adolescência, um período em que o encéfalo ainda está em desenvolvimento, incluindo o sistema de recompensa. É sabido que adolescentes (ADOLESC) apresentam diferenças neuroquímicas e neuroanatômicas comparados a adultos (ADULTO). Os fatores de transcrição neuronais *c-Fos* e *Egr-1* estão implicados em vários processos neuronais, como formação de memória no hipocampo, integração de informações no núcleo accumbens, formação de respostas motoras surgidas no córtex motor e até mesmo com respostas a drogas de abuso, entre outros. Assim, o presente estudo investigou os efeitos da administração aguda e repetida de uma dose baixa de etanol (2,0 g/kg) em camundongos ADULTO e ADOLESC, bem como a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* induzida pela administração aguda e crônica de etanol em distintas regiões cerebrais: córtex pré-frontal (CPF), córtex motor (CoM), área da amígdala dorsal (ADA), área da amígdala ventral (AVA), núcleo accumbens (NAc) e hipocampo (HIP). Camundongos Swiss ADULTO (n = 10) (60 dias) e ADOLESC (n = 10) (28 dias) receberam injeções de salina (SAL) por 2 dias. No 3º dia, metade dos animais ADULTO e ADOLESC recebeu SAL e a outra metade, etanol (EtOH) e, 5 min depois, sua atividade locomotora foi quantificada em campo aberto por 5 min. Tanto os animais ADULTO quanto ADOLESC tratados com EtOH apresentaram hiperatividade locomotora. Após 1 h da injeção os animais foram sacrificados e a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* foi avaliada por imuno-histoquímica. A administração aguda de EtOH aumentou a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* nas diferentes estruturas analisadas em ADULTO e ADOLESC comparados aos SAL. Outros grupos de animais ADULTO e ADOLESC foram tratados com EtOH ou SAL por 15 dias consecutivos. Sete dias após, todos os animais receberam uma dose de EtOH. A atividade locomotora foi quantificada e a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* foi avaliada. Os resultados comportamentais revelaram que os ADULTO tratados com EtOH desenvolveram sensibilização, enquanto que os

ADOLESC desenvolveram tolerância. Animais ADULTO tratados com EtOH repetidamente apresentaram diminuição na expressão de *c-Fos* comparados aos SAL no CoM e HIP, enquanto os ADOLESC apresentaram diminuição na expressão de *c-Fos*, comparados aos SAL, na maioria das estruturas: CPF, CoM, NAc, ADA e AVA, mas não no HIP. No entanto, a diminuição observada no CoM foi mais expressiva em ADOLESC do que em ADULTO. Além disso, animais ADULTO apresentaram diminuição na expressão de *Egr-1*, comparados ao SAL, no CPF, CoM, NAc, ADA, AVA e HIP, enquanto que os ADOLESC apresentaram diminuição no CPF, CoM, NAc e HIP, mas não na ADA e AVA, comparados aos SAL. Vale salientar que a diminuição na expressão de *Egr-1*, apresentada pelos ADOLESC, foi mais expressiva do que em ADULTO. O aumento na expressão de *c-Fos* e *Egr-1* após administração aguda de EtOH em ADULTO e em ADOLESC reflete o aumento da excitabilidade neuronal em diferentes regiões encefálicas, sugerindo uma correlação com o aumento da atividade locomotora. Já os resultados obtidos com a administração repetida de EtOH mostraram que, de um modo geral, a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* diminuiu na maioria das estruturas analisadas, sugerindo dessensibilização na indução da expressão dessas proteínas, induzida pelo etanol crônico. Com isso, concluímos que a administração prolongada de etanol induziu alterações adaptativas diferenciadas, dependentes da idade, na expressão de *c-Fos* e *Egr-1*, em várias regiões encefálicas, e que esses fatores de transcrição apresentam importante participação na sensibilização comportamental ao etanol.

Palavras-chave: Etanol. Adolescentes. Sensibilização comportamental. Condicionamento ambiental. *c-Fos*. *Egr-1*. Sistema límbico.

ABSTRACT

RULIAN, R. F. **Differential sensitivity to ethanol-induced behavioral effects and *c-Fos*/*Egr-1* expression between adolescent and adult mice.** 2007. Master thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The use of addiction drugs begins usually in adolescence, a period when the brain is still developing, including the reward system. It is known that adolescents (ADOLESC) present neurochemical and neuroanatomical differences when compared to adults (ADULT). The neuronal transcription factors *c-Fos* and *Egr-1* are involved in several neuronal processes, such as memory formation in the hippocampus, integration of information in the nucleus accumbens, formation of motor responses formed in the motor cortex and even with responses to addiction drugs, among others. Thus, the present study investigated the effects of acute and repeated administration of a low dose of ethanol (2.0g/kg) in ADULT and ADOLESC mice, as well as the *c-Fos* and *Egr-1* expressions induced by the acute and chronic administration of ethanol in distinct brain regions: prefrontal cortex (PFC), motor cortex (MC), nucleus accumbens (NAcc), dorsal amygdala area (DAA), ventral amygdala area (VAA) and hippocampus (HIPPP). ADULT (n = 10) (60 days) and ADOLESC (n = 10) (28 days) Swiss mice received saline injections (SAL) during 2 days. In the third day, half of the ADULT and ADOLESC mice received SAL and, the other half, ethanol (EtOH) and, 5 min later, their locomotor activity was quantified in open field for 5 min. Both ADOLESC and ADULT animals treated with EtOH presented locomotor hyperactivity. One hour after the injection, the animals were sacrificed and the *c-Fos* and *Egr-1* expressions were evaluated by immunohistochemistry. The EtOH acute administration increased the *c-Fos* and *Egr-1* expressions in the different structures analysed in ADULT and ADOLESC when compared to SAL. Other ADULT and ADOLESC animal groups were treated with EtOH or SAL for 15 consecutive days. Seven days later, all animals received an EtOH challenge. The locomotor activity was quantified and the *c-Fos* and *Egr-1* expressions were evaluated. The behavioral results revealed that ADULT treated with EtOH developed sensitization, while ADOLESC developed tolerance. ADULT animals treated repeatedly with EtOH presented *c-Fos* expression decrease

when compared to SAL in the MC and HIPV, while ADOLESC presented *c-Fos* expression decrease when compared to SAL in the majority of the structures: PFC, MC, NAcc, DAA and VAA, but not in HIPV. Nevertheless, the decrease observed in MC was more expressive in ADOLESC than in ADULT. Furthermore, ADULT animals presented *Egr-1* expression decrease when compared to SAL, in PFC, MC, NAcc, DAA, VAA and HIPV, while ADOLESC presented decrease in PFC, MC, NAcc and HIPV, but not in DAA and VAA, compared to SAL. It is important to point out that the *Egr-1* expression decrease, presented by ADOLESC, was more expressive than in ADULT. The *c-Fos* and *Egr-1* expression increase, after EtOH acute administration in ADULT and ADOLESC, reflects a higher neuronal excitability in different brain regions, suggesting a correlation with the locomotor activity increase. Nevertheless, the results obtained with EtOH repeated administrations showed that, in general, the *c-Fos* and *Egr-1* expressions decreased in most of the analysed structures, suggesting desensitization in the induction of the expression of these proteins induced by chronic ethanol. Thus, we concluded that the repeated ethanol administration induced differential adaptative changes, age-dependent, in the *c-Fos* and *Egr-1* expressions, in several brain regions, and that these transcription factors present important participation in the ethanol behavioral sensitization.

Key words: Ethanol. Adolescents. Behavioral sensitization. Environmental conditioning. *c-Fos*. *Egr-1*. Limbic system. Reward system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vias dopaminérgicas.....	36
Figura 2. Organização existente entre as estruturas do sistema mesolímbico/mesocortical e sistema motor	40
Figura 3. Vias de sinalização AMPc-CREB- <i>c-Fos-Egr-1</i>	49
Figura 4. Aparelho de campo aberto.....	61
Figura 5. Esquematização de secções frontais do encéfalo de camundongos mostrando o CPF, CoM, NAc, ADA, AVA e HIP	65
Figura 6. Atividade locomotora – Experimento I	71
Figura 7. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> no CPF – Experimento I.....	73
Figura 8. Fotomicrografias do CPF – Experimento I	74
Figura 9. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> no CoM – Experimento I	76
Figura 10. Fotomicrografias do CoM – Experimento I	77
Figura 11. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> no NAc – Experimento I	79
Figura 12. Fotomicrografias do NAc – Experimento I	80
Figura 13. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> na ADA – Experimento I	82
Figura 14. Fotomicrografias da ADA – Experimento I	83
Figura 15. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> na AVA – Experimento I	85
Figura 16. Fotomicrografias da AVA – Experimento I	86
Figura 17. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> na HIP – Experimento I	88
Figura 18. Fotomicrografias da HIP – Experimento I	89
Figura 19. Distribuição de grupos de animais – Experimento II	97
Figura 20. Esquematização de tratamento – Experimento II	98
Figura 21. Tratamento repetido realizado no experimento II	99
Figura 22. Análise comportamental do 1º ao 17º dias de tratamento – Atividade locomotora – Experimento II	104

Figura 23. Análise comportamental do 18 ^o dia de tratamento – Atividade locomotora – Experimento II	107
Figura 24. Análise comportamental do 24 ^o dia de tratamento – Atividade locomotora – Experimento II	110
Figura 25. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> no CPF – Experimento II	113
Figura 26. Fotomicrografias do CPF – Experimento II	114
Figura 27. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> no CoM – Experimento II	117
Figura 28. Fotomicrografias do CoM – Experimento II	118
Figura 29. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> no NAc – Experimento II	122
Figura 30. Fotomicrografias do NAc – Experimento II	123
Figura 31. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> no ADA – Experimento II	127
Figura 32. Fotomicrografias do ADA – Experimento II	128
Figura 33. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> no AVA – Experimento II	132
Figura 34. Fotomicrografias do AVA – Experimento II	133
Figura 35. Expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> no HIP – Experimento II	136
Figura 36. Fotomicrografias do HIP – Experimento II	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIATÖES	
a.C.	= antes de Cristo
AC	= adenilato ciclase
ADOLESC	= camundongos adolescentes
ADULTO	= camundongos adultos
AMIG	= amígdala
ADA	= área dorsal da amígdala
AVA	= área ventral da amígdala
AMPc	= adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	= Análise de Variância
AP-1	= proteína-1 ativadora de fatores de transcrição
ATP	= adenosina trifosfato
AVTM	= área ventral do tegmento mesencefálico
CA	= campo aberto
CEBRID	= Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
CM	= caixa moradia
CoM	= córtex motor
CPF	= córtex Pré-Frontal
CRE	= elemento de resposta ao AMPc
CREB	= proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc
DA	= dopamina
DAB	= 3-3'-diaminobenzidina
DNA	= ácido desoxirribonucléico
E.P.	= erro padrão
EtOH	= etanol
GABA	= ácido γ-aminobutírico
G_{as}	= proteína G estimulatória
HIP	= hipocampo
HIPt	= hipotálamo
i.p.	= intraperitonealmente / intraperitoneal
NAc	= núcleo accumbens
NCau	= núcleo caudado
OMS	= Organização Mundial da Saúde
PB	= tampão fosfato
PB 0,1M	= tampão fosfato 0,1M
PBS	= solução salina tamponada 0,9%
PFA 4%	= paraformaldeído 4%
PKA	= proteína Kinase A
Proteína G	= proteína ligada à guanina heterodimérica
PV	= pálido ventral
Recep. D1	= receptores dopaminérgicos do tipo I
Recep. D2	= receptores dopaminérgicos do tipo II
RNA_m	= ácido ribonucléico mensageiro
SAL	= solução controle
SC_α	= subunidade catalítica da PKA
SNC	= sistema nervoso central
SR	= subunidade regulatória da PKA

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
1. GENETALIDADES	24
2. DROGAS DE ABUSO: ASPECTOS GERAIS	26
3. DIFERENÇAS COMPORTAMENTAIS, NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS ENTRE ADULTOS E ADOLESCENTES.	29
4. MECANISMO DE AÇÃO DO ETANOL	34
5. SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL	41
6. CONDICIONAMENTO AMBIENTAL	45
7. SINALIZAÇÃO MOLECULAR	47
8. GENE DE RESPOSTA IMEDIATA <i>c-Fos</i>	50
9. GENE DE RESPOSTA IMEDIATA <i>Egr-1</i>	53
OBJETIVOS	55
1. OBJETIVOS GERAIS	56
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
MATERIAIS E MÉTODOS	58
1. SUJEITOS EXPERIMENTAIS	59
2. DROGAS	59
3. MODELO COMPORTAMENTO	60
4. DOSAGEM DA ALCOOLEMIA	61
5. IMUNO-HISTOQUÍMICA	62
6. ANÁLISE DE DADOS	63
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL	67
1. EXPERIMENTO I: a) Estudo dos Efeitos da Administração Aguda de Etanol sobre as Proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> em Camundongos Adultos e Adolescentes; b) Estudo das expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> após administração de etanol em camundongos adultos e adolescentes.	68
1.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	68
1.1.1. Comportamento	68

1.1.2. Imuno-Histoquímica para <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i>	69
1.2. RESULTADOS	70
1.2.1. Comportamento	70
1.2.2. Imuno-Histoquímica para <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i>	72
1.2.2.1. <i>Córtex Pré-Frontal (CPF)</i>	72
1.2.2.2. <i>Córtex Motor (CoM)</i>	75
1.2.2.3. <i>Núcleo Accumbens (NAc)</i>	78
1.2.2.4. <i>Área Dorsal da Amígdala (ADA)</i>	81
1.2.2.5. <i>Área Ventral da Amígdala (AVA)</i>	84
1.2.2.6. <i>Hipocampo (HIP)</i>	87
1.3. DISCUSSÃO PARCIAL	90
2. EXPERIMENTO II: a) Estudo do Desenvolvimento e Expressão da Sensibilização Comportamental aos Efeitos Locomotores do Etanol em Camundongos Adultos e Adolescentes – Influência do Condicionamento Ambiental; b) Estudo das expressões das proteínas <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i> após administração prolongada de etanol em camundongos adultos e adolescente.	94
2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	94
2.1.1. Comportamento	94
2.1.2. Imuno-Histoquímica para <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i>	100
2.1.3. Dosagem da Alcoolemia	101
2.2. RESULTADOS	102
2.2.1. Comportamento	102
2.2.2.1. <i>Análise comportamental do 1º ao 17º dias de tratamento.</i> ..	102
2.2.2.2. <i>Análise comportamental do 18º dia de tratamento.</i>	105
2.2.2.3. <i>Análise comportamental do 24º dia de tratamento.</i>	108
2.2.2. Imuno-Histoquímica para <i>c-Fos</i> e <i>Egr-1</i>	111
2.2.2.1. <i>Córtex Pré-Frontal (CPF)</i>	111
2.2.2.2. <i>Córtex Motor (CoM)</i>	115
2.2.2.3. <i>Núcleo Accumbens (NAc)</i>	119
2.2.2.4. <i>Amígdala Dorsal (ADA)</i>	124
2.2.2.5. <i>Amígdala Ventral (AVA)</i>	129
2.2.2.6. <i>Hipocampo (HIP)</i>	134
2.2.3. Dosagem da Alcoolemia	138

2.3. DISCUSSÃO PARCIAL	140
DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS ...	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167
ANEXO	202

INTRODUÇÃO

1. GENERALIDADES

Há indícios de que o homem utilizava bebidas alcoólicas desde os primórdios da humanidade. Todos os povos antigos da terra, principalmente aqueles que habitaram a superfície do atual oriente médio e Egito, criaram bebidas alcoólicas. Não há uma data precisa comprovando quando o álcool começou a ser usado como bebida. Análises químicas realizadas em depósitos residuais do fundo de um jarro encontrado em um sítio neolítico iraniano datado de 5500 a.C. mostram que o consumo de bebidas alcoólicas já ocorria naquele período (SEIBEL e TOSCANO Jr., 2001). Isso sugere que o ser humano sempre esteve em contato com o álcool, principalmente em festas rituais, religiosas ou não. A partir da Revolução Industrial, registrou-se um grande aumento na oferta deste tipo de bebida, contribuindo para um maior consumo e, conseqüentemente, gerando um grande aumento no número de pessoas que passaram a apresentar algum tipo de problema devido ao uso excessivo do álcool (SEIBEL e TOSCANO Jr., 2001).

Atualmente, a maior parte do álcool consumido está ligado à recreação. Entretanto, desde os primórdios de sua utilização pelos diferentes povos, sabia-se das alterações comportamentais provocadas sobre o indivíduo. Estudos mostram que, em grande parcela da população, a “iniciação”, ou seja, o primeiro contato de uma criança com uma bebida alcoólica, ocorre dentro de casa com o consentimento dos próprios pais.

Muitos estudos já demonstraram que o consumo excessivo de álcool pode levar à dependência. Em 1964, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu a dependência como sendo um “conjunto de fenômenos fisiológicos, comportamentais e cognitivos no qual o uso de uma substância ou uma classe delas alcança uma

prioridade muito maior para um determinado indivíduo do que outros comportamentos que antes tinham maior valor”. Dessa forma, destacamos que a principal característica da dependência é o forte desejo ou a compulsão para consumir uma determinada substância (SAMSON, 2000; KALIVAS e VOLKOW, 2005).

O fenômeno de dependência de drogas é algo que se prende à condição humana. Como uma forma de comportamento adquirido, não se poderia esperar que o alcoolismo tivesse causa única. Evidências recentes sugerem que pode existir um fator predisponente hereditário (SAMSON, 2000; MEZINSKIS et al., 2001; KALIVAS e VOLKOW, 2005; KREEK et al., 2005). Atitudes dos pais e da sociedade em relação ao ato de beber e à embriaguez; conflitos emocionais pessoais; disponibilidade e custo relativo do álcool; amenização de dores, angústias e tristezas; o prazer de beber com os amigos; a busca do prazer por si só e a composição de rituais religiosos estão diretamente ligados à quantidade de álcool consumida pela sociedade como um todo e por qualquer indivíduo que vive nesta sociedade em particular. Sendo assim, enquanto estes fatores estiverem presentes, o homem continuará a fazer uso e abuso do álcool e outras substâncias psicotrópicas.

2. DRAGAS DE ABUSO: ASPECTOS GERAIS

São conhecidas muitas substâncias psicotrópicas, dentre elas: álcool, tabaco, maconha, cocaína, LSD, ecstasy, solventes, ansiolíticos, etc. Dentre todas estas substâncias ilícitas, o etanol recebe grande destaque por ser a droga mais abusivamente consumida.

Muitos estudos epidemiológicos vêm mostrando aumento no índice de uso de drogas nos últimos anos. Este fato é observado tanto no Brasil (GALDUROZ et al., 2004) como em diversas outras regiões do mundo (SCIVOLETTO et al., 2001). O ultimo relatório, lançado em 2004 pelo Escritório das Nações Unidas contra Drogas de Crime (UNODC), mostra que mais de 200 milhões de pessoas consomem drogas ilícitas no mundo (MARQUES, 2004).

Nos Estados Unidos, relata-se que por volta de 80% dos adolescentes experimentam álcool até o último ano do ensino secundário, enquanto que 65% usam tabaco e, 50%, maconha.

Entre os estudantes brasileiros de 1º e 2º graus, o consumo de drogas ilícitas tem-se mantido constante, comparando-se os dados relativos aos anos de 1987, 1989, 1993 e 1997, com índices de “uso na vida” em torno de 23,0% e “uso freqüente” próximo de 3,0%, de acordo com um estudo feito pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) em 2004 (SOLDERA et al., 2004). Em relação ao álcool, o estudo realizado pelo CEBRID entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras mostra que o percentual de adolescentes que consumiram álcool (uso na vida) entre os 10 e 12 anos de idade é altíssimo: 51,2%. Quinze por cento dos estudantes de 1º e 2º graus relataram uso freqüente de álcool, apresentando um aumento na tendência de uso nas principais capitais, comparando-se com levantamentos anteriores (1987, 1989 e 1993). Quanto ao uso pesado de

drogas, isto é, 20 vezes ou mais no mês, também houve um aumento em 8 capitais para o álcool (GALDUROZ et al., 2004). Um levantamento mais recente (2001) sobre o uso de drogas feito pelo CEBRID em 107 cidades com mais de 200 mil habitantes detectou índices de 11,5% para dependência de etanol e 9% para dependência de tabaco na população geral, sendo que as porcentagens de “uso na vida” destas substâncias foram de 68,7% e 41%, respectivamente. Esse estudo mostrou que 48,3% dos entrevistados entre 12 a 17 anos já haviam experimentado álcool e que 5,2% dos entrevistados, dessa mesma faixa etária, eram considerados dependentes (GALDURÓZ et al., 2004).

Relatos brasileiros também demonstram o crescente consumo de drogas, mostrando que uma em cada dez pessoas tem problemas conseqüentes ao uso excessivo do álcool (GALDUROZ e CARLINI, 2007).

De acordo com Galduroz e Carlini (2007), o uso excessivo de substâncias psicoativas entre os adolescentes tem aumentado, como mostram os estudos realizados em 2001 pelo CEBRID. Esses estudos revelaram que 48,3% dos entrevistados entre 12 a 17 anos já haviam experimentado álcool e que 5,2% dos entrevistados, dessa mesma faixa etária, eram considerados dependentes.

A análise dos diversos estudos epidemiológicos apresentados faz-nos concluir que o abuso de drogas pela população (principalmente a população jovem) é uma questão de saúde pública e deve ser tratado mundialmente. Dentre todas as drogas de abuso, devemos destacar o etanol, principalmente devido ao caráter lícito de seu uso.

A dependência ao álcool trás muitas conseqüências à família, à sociedade e ao governo. Aqui, vale a pena incluir as altas taxas de acidentes de trânsito, perda da produtividade de trabalho e do salário, conflitos sociais e familiares, assim como uma alta incidência em várias espécies de moléstias. Além disso, podem-se observar três

consequências farmacológicas: a redução da dieta e do consumo de proteínas e vitaminas, já que o álcool supre as necessidades calóricas do organismo; os efeitos diretos nos hepatócitos e na mucosa do trato gastrointestinal, levando ao comprometimento de vários outros órgãos; e a exposição crônica do cérebro a altas concentrações de álcool, conduzindo a alterações adaptativas.

Dentro desta temática, devemos voltar-nos especialmente para os adolescentes. Existem muitos estudos mostrando que existem diversas diferenças em adolescentes quando comparados com adultos. Dentre estas, podemos incluir o padrão de consumo de drogas de abuso. Geralmente, o primeiro contato de um indivíduo com drogas de abuso ocorre na adolescência (SPEAR, 2000). Além da preocupação relacionada às consequências físicas e psicológicas do consumo pesado de álcool entre adolescentes, há indícios pressupondo que o uso abusivo de drogas possa acelerar o contato com outras drogas ilícitas e mais pesadas, como a cocaína, por exemplo, (SPEAR, 2000).

3. DIFERENÇAS COMPORTAMENTAIS, NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS ENTRE ADULTOS E ADOLESCENTES.

Adolescentes de muitas espécies diferem dos adultos em vários aspectos, incluindo o padrão de consumo de drogas (SPEAR, 2000). Além de haver piores consequências físicas e psicológicas relacionadas ao consumo de álcool entre adolescentes, quando comparados com adultos, foi observado que os adolescentes chegam mais rápido à dependência. Ou seja, para os adolescentes tornarem-se dependentes, precisam de menor número de exposições à droga de abuso e, ainda, há para eles um menor intervalo de tempo entre a primeira e a segunda dependência (CLARCK et al., 1998).

Modelos animais de auto-administração sugerem que ratos adolescentes consomem de 3 a 4 vezes mais etanol, relativo ao peso corpóreo, do que ratos adultos (LANCASTER et al., 1996).

Relatos sobre as consequências neurodegenerativas do uso de etanol mostram que o cérebro de ratos adolescentes apresenta uma sensibilidade diferencial aos efeitos deletérios induzidos por essa droga (CREWS et al., 2000) e que sua administração repetida aumenta a susceptibilidade aos efeitos prejudiciais sobre a memória no período da adolescência (MARKWIESE et al., 1998) e na vida adulta (WHITE et al., 2000).

De acordo com Spear (2000), a adolescência é bem caracterizada por vários e diferentes comportamentos, tais como: altos níveis de exposição a riscos, de exploração, de busca por novidades e sensações, alta interação social, alto nível de atividade e de comportamentos do tipo brincadeiras de “faz-de-conta”, comportamentos estes que são considerados altamente necessários para que os adolescentes possam adquirir maturidade e independência. É nesse período de

busca de novidades e sensações que os adolescentes acabam por se deparar pela primeira vez com uma droga de abuso e experimentá-la, sendo que, dentre elas, o etanol pode ser considerada a mais comum (ESTROFF et al., 1989; O'MALLEY et al., 1998; ARNETT, 1999; CHAMBERS et al., 2003; LENROOT e GIEDD, 2006). Já em adultos, o abuso de álcool e a dependência, por exemplo, estão freqüentemente associados à diminuição da sensibilidade e ao grande desenvolvimento de efeitos tóxicos agudos por tolerância ao etanol ocasionado por diferenças farmacológicas existentes entre adultos e adolescentes (SCHUCKIT, 1985; KELLY et al., 1987; NEWLIN e THOMSON, 1990; BRASSER e SPEAR, 2002; TRUXELL e SPEAR, 2004).

Na literatura, podemos encontrar tanto estudos clínicos como bioquímicos envolvendo animais que mostram a maturação mais tardia do sistema nervoso central, e esta pode estar intimamente ligada ao comportamento típico dos adolescentes. Em particular, respostas comportamentais locomotoras diminuídas quando do uso de cocaína foram encontradas em animais adolescentes quando comparados com animais adultos (CAO et al., 2007). O sistema noradrenérgico e outros sistemas de neurotransmissão central não estão completamente desenvolvidos até a fase mais tardia da adolescência (DEUPREE et al., 2007). Já se sabe que o desenvolvimento do cérebro continua durante a adolescência e vai até o início da idade adulta e, nesta fase, ele é altamente influenciado por alterações plásticas adaptativas dependentes exclusivamente de experiências. Comportamentalmente, este período é também caracterizado por um aumento da busca por novidade e da exposição a riscos. Esta alta plasticidade parece ser importante nos processos de formação do comportamento e da cognição, que contribuirão para compor características que persistirão durante a idade adulta. Entretanto, evidência crescente tem ligado os mesmos mecanismos de aprendizado dependentes de experiências com processos que podem estar subordinados às

drogas de abuso. Assim, o cérebro de adolescentes parece ser particularmente suscetível, no tocante aos processos de aprendizado dependentes de experiências, se houver associação com o consumo de álcool e outras drogas de abuso. Ao nível das sinapses, mudanças homeostáticas durante o consumo de etanol implicam nos efeitos desestabilizantes do etanol sobre a rede de neurônios (CARPENTER-HYLAND e CHANDLER, 2007).

No período da adolescência, uma significativa remodelação neuroquímica e neuroanatômica está acontecendo. Durante este alto desenvolvimento plástico pós-natal de modelação de redes neuronais, ocorre o aprendizado de diversas características comportamentais que persistirão até a idade adulta e mesmo por toda a vida. A alta remodelação em cérebros de adolescentes encontrada em muitos estudos pode ser reflexo do alto nível de plasticidade que existe durante a adolescência (LEUNER et al., 2006; HE and CREWS, 2007), que é representado por uma alta produção de axônios, mielinização de axônios e surgimento de sinapses, processos que sofrem uma rápida supressão no final da adolescência e início da idade adulta (GIEDD et al., 1999; ANDERSEN et al., 2000; ANDERSEN and TEICHER, 2004), os quais contribuem para a maturação do cérebro e para a transição para a idade adulta. Estudos indicam que estes processos de remodelação diminuem drasticamente no prosencéfalo e no hipocampo até o início da idade adulta, refletindo a diminuição da plasticidade (HE and CREWS, 2007). Que ocorre nestas estruturas, que estão intimamente ligadas aos processos de aprendizagem e formação da memória (KEMPERMANN et al., 1997; VAN PRAAG et al., 1999; KEMPERMANN, 2002). Durante a maturação do cérebro, que ocorre na transição da adolescência para a idade adulta tanto em roedores quanto em humanos, há uma supressão de sinapses direcionadas para maior ativação cortical (SPEARS, 2004). Assim, o alto nível de neuromodulação que ocorre em adolescentes, quando

comparados com adultos, pode refletir a alta natureza plástica dos cérebros de adolescentes e sua grande habilidade para aprender (HE e CREWS, 2007).

HE e CREWS (2007) sugerem que o declínio da neuromodulação ocorrida durante a passagem da adolescência para a idade adulta indica uma função extremamente importante para a circuitaria neuronal, que é ainda ajustável para que ocorra uma melhor adaptação no período da adolescência. Eles ainda sugerem que algumas manipulações durante este crítico período poderão acarretar danos que são mais pronunciados do que os que ocorreriam em adultos. Crews e col. (2006) mostram-nos que, em adolescentes, o etanol pode interromper o processo de aprendizado, alterar estados afetivos e outros comportamentos mais intensamente do que em adultos, pois os adolescentes são mais vulneráveis à redução da neuromodulação durante o processo de maturação induzida pelo álcool, principalmente no prosencéfalo e no hipocampo.

Em adolescentes, as vias dopaminérgicas, principalmente no córtex pré-frontal (CPF), encontram-se bastante imaturas, em processo de desenvolvimento. O etanol age, também, em vias dopaminérgicas, ativando a via mesolímbica-cortical (podendo levar à dependência e emissão de comportamentos com base em reforço) e a via nigro-estriatal (podendo levar ao condicionamento sensório-motor baseado em recompensa e a respostas motoras a drogas de abuso) (ROBINSON e BECKER, 1986; KALIVAS e STEWART, 1991; SELF et al., 1995; GRAYBIEL, 1995).

Durante a adolescência aumentam as aferências dopaminérgicas para o CPF para um pico acima daquele observado durante a infância e também durante a vida adulta (KALSBECK et al., 1988; ROSENBERG e LEWIS, 1994). Também é observado, durante a adolescência, aumento na concentração de DA no CPF (LESLIE et al., 1991). Receptores dopaminérgicos no NAc são produzidos em grande quantidade durante a primeira infância, com subsequente supressão de

aproximadamente um terço deles durante a adolescência, sugerindo remodelagem para maturação das vias motoras e da recompensa (TEICHER et al., 1995; TARAZI e BALDESSARINI, 2000; CREWS et al., 2007). Além disso, essa substancial remodelação pós-natal da neurotransmissão dopaminérgica durante a adolescência pode contribuir para a estabilização de comportamentos estabelecidos durante a adolescência (TEICHER et al., 1995; TARAZI e BALDESSARINI, 2000; CREWS et al., 2007). Adicionalmente, foi observado no NAc que os receptores D₁ e D₂ encontram-se em declínio durante a adolescência, idade em que são encontrados entre 30 a 45% mais destes receptores do que em adultos (GELBARD et al., 1989; TEICHER et al., 1995; TARAZI et al., 1998; TARAZI et al., 1999).

4. MECANISMO DE AÇÃO DO ETANOL

Existem muitas pesquisas focando os mecanismos de atuação do etanol e de outras drogas de abuso. Quanto aos estudos sobre as ações do etanol, ainda não se desvendou exatamente qual é seu mecanismo de ação. Sabe-se que ele atua, além de em outras partes do organismo, no sistema nervoso central (SNC). Há muitas investigações científicas mostrando que, na maioria das vezes, baixas doses de etanol levam a efeitos estimulantes (DANIELL e PHILLIPS, 1994; CAMARINI et al, 1995; ARAUJO et al, 2003; TAMBOUR et al., 2006; WALLNER et al., 2006; TU et al., 2007). Estes se caracterizam pela desinibição comportamental, diminuição da atenção, da autocrítica e do nível de preocupação, aumento da afetividade e da fala (EKMAN et al, 1963, 1964; KORNETSKY et al., 1988; SCHNEIDER et al., 2001; MARINKOVIC et al., 2004). No entanto, altas doses de etanol acabam por ocasionar um efeito inverso, ou seja, deprimem o SNC (CAMARINI et al., 1995; ARAUJO et al., 2003; TAMBOUR et al., 2006). Isto é caracterizado pelo aparecimento de cansaço e grande debilidade ocasionada por fadiga (EKMAN et al., 1963; 1964; KORNETSKY et al., 1988; SCHNEIDER et al., 2001; MARINKOVIC et al., 2004).

A exposição prolongada aos efeitos proporcionados pelo etanol pode resultar em sérias conseqüências. Desse modo, os efeitos depressores do etanol, se persistirem, podem resultar no aparecimento do fenômeno da tolerância (o organismo responde cada vez com menor intensidade aos efeitos da droga consumida, necessitando-se aumentar a dosagem para obtenção dos mesmos efeitos). Já a exposição prolongada aos efeitos estimulantes do etanol está relacionada ao surgimento do fenômeno de sensibilização (o organismo responde cada vez com maior intensidade aos efeitos da droga consumida). Embora, neuroquimicamente, envolvam diferentes mecanismos no SNC, tanto a tolerância como a sensibilização

são fenômenos importantes para se caracterizar o desenvolvimento da dependência. Além disso, a sensibilização ao etanol está intimamente relacionada com o desejo compulsivo dos dependentes pela droga de abuso (CAMARINI et al, 1995; VALENZUELA e HARRIS, 1997).

Sabe-se que no SNC não existe um receptor específico para atuação do etanol. Sendo assim, grande parte dos efeitos centrais do etanol é explicada pela interação com diferentes sistemas de neurotransmissão, tais como: sistema catecolaminérgico, opioideérgico, glutamatérgico, serotoninérgico, GABAérgico e colinérgico. Além destes, muitos estudos apontam que o etanol também pode atuar sobre as ações do agente neuromodulador adenosina (FENG e FAINGOLD, 2000), do neuropeptídeo neurotensina (TAJUDDIN e DRUSE, 1998; BAN et al., 2001), do hormônio arginina-vasopressina (CHIU et al., 1998; LASZLO et al, 2001), da enzima adenilato ciclase (YAO et al., 2001; MASS et al., 2005; YOSHIMURA et al., 2006), em canais de cálcio (LIU et al., 2003; KATSURA et al., 2005) e membranas plasmáticas (LACERDA et al, 1996; CAMARINI et al, 1995; VALENZUELA e HARRIS, 1997; WEISS e PORRINO, 2002).

A base neuroquímica da ação estimulante do etanol tem sido estudada com atenção especialmente voltada para o sistema de neurotransmissão catecolaminérgico. Dentro deste contexto, observa-se com especial atenção a neurotransmissão dopaminérgica.

As vias dopaminérgicas (figura 1) são divididas didaticamente em três grandes vias:

- Via nigroestriatal: apresenta os corpos de neurônios localizados na substância negra e com eferências para o corpo estriado;
- Via mesolímbica/mesocortical: apresentam os corpos de neurônios localizados na área ventral do tegmento mesencefálico (AVTM) e com eferências

direcionadas para áreas límbicas (o septo, área paraolfatória, epitálamo, núcleo anterior do tálamo, porções dos núcleos da base, hipocampo e amígdala) e neocórtex (áreas sensoriais e motoras);

- Via túbero-infundibular: apresentam os corpos de neurônios localizados no núcleo arqueado e periventricular emitindo eferências para a eminência média e lobo intermediário da hipófise.

Figura 1. Vias dopaminérgicas

As vias dopaminérgicas, principalmente no córtex pré-frontal (CPF), encontram-se bastante imaturas em adolescentes, em processo de desenvolvimento. O etanol age em vias dopaminérgicas, ativando a via mesolímbica-cortical (podendo levar à dependência e emissão de comportamentos com base em reforço) e a via nigro-estriatal (podendo levar ao condicionamento sensório-motor baseado em recompensa e a respostas motoras a drogas de abuso) (ROBINSON & BECKER, 1986; KALIVAS & STEWART, 1991; SELF et al., 1995; GRAYBIEL, 1995).

A dopamina (DA) mostra suas ações por se ligar a receptores de membrana específicos (GINGRICH e CARON, 1993). Os receptores de DA localizados no SNC fazem parte do grande grupo de receptores que estão acoplados à proteína G (CIVELLI et al., 1993; JARVIE e CARON, 1993; VALLONE et al., 2000). Essa grande família de receptores foi classificada em receptores da subfamília D₁ e receptores da subfamília D₂. A subfamília de receptores D₁ engloba os receptores dopaminérgicos D₁ e D₅, enquanto que a subfamília de receptores D₂ engloba os receptores dopaminérgicos D₂, D₃ e D₄. Esta classificação foi realizada baseando-se nas seqüências homólogas e nos efeitos farmacológicos (CIVELLI et al., 1993; SEEMAN e VAN TOL, 1993; MISSALE et al., 1998). Os receptores da subfamília D₁ estão associados à estimulação da enzima de membrana adenilato ciclase (UNDIE et al., 2000) e estão localizados principalmente no corpo celular e dendritos, sendo chamados de receptores somatodendríticos (SIBLEY et al., 1993; JABER et al., 1996; HARTMAN e LANAU, 1997; CENTONZE et al., 2001; BORDET, 2004). Já os receptores da subfamília D₂ estão associados à inibição ou não dessa enzima de membrana (SIBLEY et al., 1993; TANG et al., 1994; JABER et al., 1996; HARTMAN e LANAU, 1997; RODRIGUES-SANCHEZ et al., 1997; BORDET, 2004; VANGVERAVONG et al., 2006; FAN e HESS, 2007).

Reforços naturais como comida, água e a oportunidade sexual aumentam a atividade da via mesolímbica/mesocortical, e estes efeitos são mediados em parte pela DA no NAc (MURRIN e ZENG, 1986; FIBIGIR et al., 1992; MARK et al., 1992; MITCHELL e GRATTON, 1994; EVERITT e WOLF, 2002). Além disso, muitos estudos mostram que a estimulação central e a euforia induzida pelo etanol estão relacionadas com a ativação do sistema dopaminérgico mesolímbico/mesocortical. Como resposta a este efeito, ocorre aumento da atividade locomotora (WISE e BOZARTH, 1987).

Estudos neuroquímicos mostram que o etanol aumenta a concentração de dopamina (DA) extracelular no núcleo accumbens (NAc) e no núcleo caudado (NCau) de roedores (DI CHIARA e IMPERATO, 1988), promovendo liberação predominantemente no NAc, em roedores (SOUZA-FORMIGONI et al, 1999; BASSAREO et al, 2003, 2006; JONES et al, 2006; MORZORATI e MARUNDE, 2006).

Na AVTM observa-se a existência de interneurônios GABAérgicos que, quando estimulados, inibem os neurônios dopaminérgicos que estão localizados nesta área e que emitem eferências para diversas estruturas do sistema mesolímbico/mesocortical (LI et al., 1994; PEOPLES et al., 1996; MIHIC et al, 1997; DIAMOND e GORDON, 1997; WICK et al., 1998; DAVIES 2003). Sendo assim, sem estímulos exógenos, este sistema encontra-se inibido pela ação do neurotransmissor GABA liberado pelos interneurônios GABAérgicos (LI et al., 1994; PEOPLES et al., 1996; MIHIC et al, 1997; DIAMOND e GORDON, 1997; WICK et al., 1998; DAVIES 2003).

O etanol, quando administrado em baixas doses, estimula a síntese, o metabolismo e a taxa de renovação de dopamina (TUPALA E e TIIHONEN J, 2004) e atua em sítios específicos de ligação localizados nos receptores de GABA do tipo A de interneurônios GABAérgicos presentes na AVTM (DAVIES, 2003). Estes interneurônios, uma vez estimulados, favorecerão a desinibição de neurônios dopaminérgicos da AVTM (DAVIES, 2003), aumentando a taxa de disparos na AVTM, com conseqüente aumento de liberação de DA nas estruturas que recebem aferências dopaminérgicas, principalmente no NAc (DI CHIARA e IMPERATO, 1985; GESSA, 1985; BRODIE, 1990; BLANCHARD, 1993; WEISS et al., 1993).

As principais estruturas que sofrem estimulação direta pelo aumento de liberação de DA são aquelas que compõem o sistema mesolímbico/mesocortical,

como: NAc, HIP, CPF, amígdala (AMIG) e CoM (DAHLSTROM e FUXE, 1964; GONZALES et al., 2004), destacando-se o NAc, estrutura responsável por integrar os processos motivacionais com as respostas motoras (MORGENSON et al., 1980). Da AVTM também partem projeções dopaminérgicas que atingem a AMIG e o CPF.

A AMIG é uma estrutura límbica que está particularmente envolvida em respostas emocionais (CLEMMESSEN et al., 1988; RASSNICK et al., 1993; KNAPP e CREWS, 1999; KOOB et al., 1998; CHANDLER et al., 2006; HILL et al., 2006; HAMLIN, 2007; FENG et al., 2007). Neste trabalho, foram focadas duas áreas da AMIG: Área Dorsal da Amígdala (ADA) e Área Ventral da Amígdala (AVA). Dentro de cada parte da AMIG ainda pode ser observada a existência de diversos núcleos, cada um deles com funções específicas. Dentre outras funções, a AMIG também apresenta o papel de modular parte das informações que atingem o NAc e o CPF, pois, desta estrutura, partem projeções glutamatérgicas que atingem o NAc e o CPF (OADES e HALLIDAY, 1987; HAMLIN 2007, FENG et al., 2007).

O NAc, além de receber projeções dopaminérgicas da AVTM, também recebe projeções glutamatérgicas do CPF, da AMIG e do HIP (FINCH, 1996; MASTERMAN e CUMMINGS, 1997; ROLLS e TREVES, 1998; O'DONNELL et al., 1999; CHAMBERS et al., 2001; 2003). O NAc integrará todas as informações recebidas e as enviará por meio de projeções GABAérgicas ao Pálido Ventral (PV) e, daí, para o Hipotálamo (HIPt) e Córtex Motor (CoM) (PENNARTZ et al., 1994; FINCH, 1996; MASTERMAN e CUMMINGS, 1997; ROLLS e TREVES, 1998; O'DONNELL et al., 1999; SWANSON, 2000; KOLOMIETS et al., 2001; BECHARA, 2001; CHAMBERS et al., 2003). No HIPt e no CoM ocorrerá a formação de respostas motoras frente aos estímulos motivacionais ocorridos no sistema mesolímbico/mesocortical (MORGENSON et al., 1980; FINCH, 1996; ROLLS e TREVES, 1998; EVERITT e WOLF, 2002; CHAMBERS

et al., 2003). Na figura 2, podemos observar um pouco melhor a organização e a integração do sistema mesolímbico/mesocortical.

Figura 2. Resumo esquemático da organização existente entre as estruturas do sistema mesolímbico/mesocortical e sistema motor. Esquema baseado em: Fadda e Rossetti (1998); Spears (2000); Chambers e cols (2003); Chao e Nestler (2004); e Nestler (2004).

5. SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL

A perda do controle da quantidade e duração do consumo de bebidas alcoólicas é um aspecto fundamental da dependência ao álcool. Entretanto, o processo que delimita a transição do beber controlado para a dependência ainda é desconhecido e depende de vários fatores: genéticos, ambientais, psicológicos, dentre outros (BATTJES e BELL 1985; KANDEL et al., 1986; BURKE et al., 1994; PRESCOTT e KENDLER 1999; TARTER et al., 1999; VAN ETEN e ANTHONY 1999; COMPTON et al., 2000; De WIT et al., 2000a, 2000b; McGUE et al., 2001a, 2001b; Zinkernagel et al., 2001). A sensibilização comportamental é considerada um fenômeno intrínseco dessa perda de controle, provavelmente por representar um reforço positivo para o dependente de álcool (LYYERS, 1998). A sensibilização comportamental é um fenômeno duradouro (LESSOV e PHILLIPS, 1998), que pode ser a base da propensão para recaídas a drogas depois de períodos de abstinência (MANLEY e LITTLE, 1997). Os processos de sensibilização também têm sido especulados como a base da transição do beber controlado para o beber descontrolado em indivíduos susceptíveis (HUNT e LANDS 1992).

Diversos são os modelos experimentais desenvolvidos que podem servir-nos como ferramentas de trabalho para simular em laboratório vários aspectos que giram em torno da dependência de drogas de abuso. Dentre elas, podemos destacar o desenvolvimento do fenômeno da sensibilização comportamental em roedores, ferramenta esta utilizada para o desenvolvimento deste trabalho. O fenômeno da sensibilização observado pode ser definido, segundo KALIVAS e STEWART (1991), como um aumento progressivo de respostas comportamentais e neuroquímicas, respostas estas observadas após a administração repetida de drogas psicoestimulantes (WISE e LEEB, 1993; ROBINSON e BERRIDGE, 2003;

ROBINSON e KOLB, 2004). Muitas substâncias são capazes de induzir o fenômeno da sensibilização para os efeitos psicomotores, como: psicoestimulantes, nicotina, morfina e baixas doses de etanol (TRUJILLO e AKIL, 1995; MASUR e BOERNGEN, 1980; CAMARINI, 1995; CRUZ et al., 2005). Em pesquisas de laboratório, podemos visualizar os efeitos psicomotores pelo aumento da atividade locomotora (ROBINSON e BECKER, 1986; HOFFMAM e WISE, 1992; ROBINSON e BERRIDGE, 1993). PHILIPS e colaboradores (1997), em sua revisão, mostram-nos que a maioria das drogas de abuso são capazes de estimular a atividade locomotora em roedores. Muitos pesquisadores sugerem que a estimulação locomotora induzida pelas drogas de abuso em animais pode corresponder ao fenômeno de euforia que ocorre nos humanos quando os mesmo fazem utilização dessas substâncias, e que a sensibilização comportamental corresponde à fissura ou desejo compulsivo pelas drogas de abuso. (ROBINSON e BECKER, 1986; KALIVAS e STEWART, 1991; ROBINSON e BERRIDGE, 1993; DI CHIARA, 1995; ROBINSON e BERRIDGE, 2001; KALIVAS, 2002).

A sensibilização comportamental envolve diversas alterações neurofisiológicas e neuroquímicas, principalmente no sistema dopaminérgico mesoaccumbens (WISE, 1987; VEZINA e STEWART, 1989; KALIVAS e STEWART, 1991; LE MOAL, 1995; WOLF, 1998; ROBINSON e KOLB, 2004). Historicamente, as pesquisas realizadas envolvendo sensibilização comportamental têm sido baseadas na idéia de que adaptações do sistema dopaminérgico desempenhariam o papel primário no desenvolvimento do fenômeno da sensibilização (WOLF, 1998). Muitos estudos envolvendo o fenômeno de sensibilização comportamental dividem-no temporalmente em indução e expressão. Segundo WOLF (1998) e outros autores (KALIVAS e STEWART, 1991; KALIVAS, 1995), a indução ou iniciação da sensibilização comportamental se desenvolve no interior de corpos de neurônios

dopaminérgicos localizados na AVTM, enquanto que a expressão desse fenômeno está relacionada com o aumento da concentração de DA no NAc, liberada por aferências dopaminérgicas da AVTM. KALIVAS (1995) sugere que, além do DA, o aumento da liberação de glutamato e conseqüente estimulação de receptores NMDA na AVTM é importante para a iniciação. Este aumento de glutamato é ocasionado pela estimulação de receptores D1 na AVTM. Além disso, este mesmo pesquisador mostra-nos que, juntamente com a DA presente no NAc, outros sistemas de neurotransmissão, como ativação de receptores glutamatérgicos não-NMDA nesta mesma estrutura, são importantes durante a expressão da sensibilização.

Muitos estudos de sensibilização comportamental foram realizados por meio de microinjeções de anfetamina, morfina ou cocaína diretamente na AVTM, estimulando diretamente os corpos de neurônios dopaminérgicos localizados nesta região, mostrando a indução do fenômeno de sensibilização comportamental (KALIVAS e WEBER, 1988; VEZINA e STEWART, 1990; KALIVAS e STEWART, 1991; HOOKS, 1992; VEZINA, 1996; WOLF, 1998). Contrastando com estes relatos, quando as mesmas drogas de abuso foram administradas agudamente e diretamente, produziram estimulação locomotora no NAc. Porém, quando foram realizadas administrações repetidas destas drogas no NAc, não se observou o desenvolvimento da sensibilização (DOUGHERTY e ELLINWOOD, 1981; KALIVAS e WEBER, 1988; VEZINA e STEWART, 1990; KALIVAS e STEWART, 1991; HOOKS, 1992; WOLF, 1998).

Da mesma forma, muitos pesquisadores têm mostrado que este mesmo processo de iniciação e expressão para o fenômeno da sensibilização comportamental também ocorre quando se fazem administrações repetidas de baixas doses de etanol. Este fenômeno é observado com o aumento progressivo da atividade locomotora de camundongos (MASUR, 1986; HUNT e LANDS, 1992;

CUNNIGHAM e NOBLE, 1992; BROADBENT, 1995; PHILLIPS, 1994; ROBERTS, 1995; BELLOT, 1996; KURTZ, 1996; CAMARINI, 2000; LESSOV, 2001). Nesse sentido, estes mesmos pesquisadores citados anteriormente sugerem que a administração sistêmica de baixas doses de etanol (0,5 – 2,0g/Kg, i.p) favorece um aumento de disparos em corpos de neurônios dopaminérgicos localizados na AVTM, acarretando aumento dos níveis extracelulares de DA no NAc de roedores (GESSA, 1985; IMPERATO, 1986; BRODIE, 1990).

A exposição de animais experimentais a doses repetidas de álcool pode levar ao aumento gradativo da resposta locomotora (MASUR e BOERNGEN, 1980; CAMARINI, 1995). Existem várias evidências relacionadas à variabilidade da resposta aguda e crônica a drogas psicoativas dependentes da idade. Enquanto adolescentes são menos responsivos aos efeitos agudos da anfetamina e cocaína, camundongos adolescentes apresentam uma sensibilização locomotora mais proeminente após administração repetida de anfetamina (SPEAR e BRICK, 1979; LAVIOLA, 1995; ADRIANI, 1998; BOLANOS, 1998; LAVIOLA, 2001) e cocaína (CAMARINI et al, submetido).

6. CONDICIONAMENTO AMBIENTAL

Embora o alcoolismo seja amplamente considerado como uma doença, pode-se considerá-lo como uma forma de comportamento condicionado. Um importante foco nos estudos sobre sensibilização é analisar a influência do aprendizado e do condicionamento nesse fenômeno (STEWART e VEZINA, 1988). Se o álcool for usado repetidamente e em grandes quantidades para conseguir aliviar problemas que a pessoa não sabe como resolver por outros meios, o ato de beber torna-se uma resposta comportamental firmemente estabelecida e automática para toda espécie de dificuldade. Assim, pode-se presumir que a sensibilização comportamental é parcialmente atribuída à aprendizagem de uma associação entre o efeito farmacológico produzido pela droga e o ambiente onde é experimentada, denominado pareamento ambiental, e este pode envolver condicionamento Pavloviano (STEWART, 1984).

A associação de pistas ambientais mostra a disponibilidade de uma recompensa biológica, ou seja, pode ativar comportamentos associados a pistas de seu habitat natural, com óbvios benefícios para o animal. No entanto, o condicionamento ambiental pode ser considerado como um falso benefício quando se associam drogas a este comportamento adaptativo, sugerindo claramente má-adaptação (SCHROEDER et al., 2001).

O papel de pistas ambientais na sensibilização comportamental, tolerância e dependência a drogas de abuso é amplamente estudado e reconhecido (GARCIA-CABRERA e BERGE, 1988; BERGE, 1991). Existem muitos tipos de pistas ambientais que são utilizadas em pesquisa em associação aos efeitos de drogas de abuso. Sendo assim, podemos citar algumas destas pistas, tais como: iluminação, ruído, temperatura, umidade e pressão atmosférica (GARCIA-CABRERA e BERGE,

1988; BERGE, 1991). Entretanto, o grau em que o condicionamento das pistas contextuais influencia na sensibilização comportamental ao etanol é controverso. Enquanto alguns trabalhos concordam que a sensibilização ao etanol seja preferencialmente dependente de condicionamento (CUNNINGHAM & NOBLE, 1992; CAMARINI, 2000a), outros mostram que esse fator pode não ser essencial (PHILLIPS, 1995).

Múltiplos estudos relatam a ativação do comportamento condicionado em resposta a um contexto prévio pareado a uma droga de abuso. Em estudo envolvendo animais de laboratório, observa-se que ocorre aumento da atividade locomotora dos animais pareados contextualmente quando se faz a comparação com aqueles que não foram pareados (BROWN e FIBIGER, 1992; BROWN et al., 1992; CASS e ZAHNISER, 1993). Além disso, alguns desses estudos relatam que ocorrem mudanças na atividade de estruturas cerebrais específicas (NAc e estriado, por exemplo) depois de um prévio pareamento ambiental desses animais com alguns tipos de drogas de abuso (BROWN et al., 1992; CASS e ZAHNISER, 1993) .

Em relação ao etanol, embora alguns estudos experimentais sugiram que a sensibilização comportamental ao etanol possa ser preferencialmente dependente de uma resposta locomotora condicionada Pavloviana (CUNNINGHAM & NOBLE, 1992; CAMARINI et al., 2000), na literatura encontram-se poucos relatos envolvendo o controle com relação às pistas ambientais, número de exposições ao aparato e magnitude da sensibilização aos efeitos estimulantes locomotores do etanol em camundongos adolescentes.

7. SINALIZAÇÃO MOLECULAR

Drogas de abuso provocam perturbação da transmissão sináptica, causando mudanças em numerosas vias de sinalização intracelular em que, muitas vezes, os sinais intracelulares eventualmente acarretam mudanças nucleares, onde provocam a alteração de proteínas específicas chamadas de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição atuam ligando-se a pequenas seqüências de DNA localizados em regiões regulatórias de genes e, por esse meio, controlam a razão de transcrição de genes. No decorrer das últimas décadas, muitos pesquisadores têm mostrado que as drogas de abuso podem alterar muitos tipos de fatores de transcrição em várias regiões cerebrais (O'DONOVAN et al., 1999; BERKE & HYMAN, 2000; NESTLER, 2001a; MACKLER ET AL., 2003).

A via de sinalização utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi a via do AMPc (3', 5' adenosina monofosfato cíclico). Como descrito por Nestler (1994), a DA extracelular atua em receptores metabotrópicos com subsequente ativação da proteína ligada à guanina heterotrimérica dependente de dopamina (proteína G). Quando a DA liga-se a receptores dopaminérgicos do tipo D1 acoplados a proteína G_{as} (proteína G_{α} estimulatória), aumenta a atividade da enzima de membrana adenilato ciclase (AC). Uma vez ativada, a AC ativa a via de segundos mensageiros pela conversão do ATP (adenosina trifosfato) em AMPc, alterando os níveis intracelulares de AMPc (SHAYWITZ e GREENBERG, 1999; MAYR e MONTMINY, 2001). O AMPc ativa várias proteínas quinases, como a PKA (proteína quinase ativada por AMPc). A PKA, uma vez ativada pelo acúmulo de AMPc, se dissociará em suas respectivas subunidades catalíticas (SC_{α}) e subunidades regulatórias (SR) (TAYLOR et al., 1990; WONG e SCOTT, 2004). A SC_{α} apresenta a propriedade de sofrer translocação para o núcleo e regular fatores de transcrição como o CREB

(proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc) (MAYR e MONTMINY, 2001). A SC α , uma vez no núcleo, atua sobre um resíduo de serina simples do CREB, Ser133. O CREB fosforilado forma dímeros de proteínas que se ligam a uma sequência específica do DNA conhecida por CRE (elemento de resposta ao AMPc) que pode interagir com o complexo transcricional basal para regular a transcrição de genes. Alguns dos genes que contêm CREs expressam *c-Fos* (HYMAN e NESTLER, 1996; HERDEGEN e LEAH, 1998) e *Egr-1* (BECKMANN e WILCE, 1997; HERDEGEN e LEAH, 1998), considerados genes de resposta imediata.

O CREB é alvo de distintas vias de sinalização (MATTHEWS et al., 1994; IMPEY et al., 1998). A ativação do CREB é observada em muitas regiões cerebrais, principalmente várias daquelas que compõem o sistema límbico, compreendendo: NAc, AVTM, AMIG, HIP, HIPT, CPF e outras (COLE et al., 1995; CARLEZON et al., 1998; BERKE e HYMAN, 2000; NESTLER, 2001a; SHAW-LUTCHMAN et al., 2002, 2003; WALTERS et al., 2003). Além disso, a sinalização do AMPc e a fosforilação do CREB estão implicadas em comportamentos relacionados a várias drogas de abuso, como opióides, estimulantes, cocaína e etanol (MOORE et al., 1998; THIELE et al., 2000; NESTLER, 2004).

A exposição aguda e repetida ao etanol altera a atividade de vários sistemas de transdução de sinal (DIAMOND e GORDON, 1997) e, sobretudo, o etanol induz a expressão dos genes dependentes de AMPc regulados pelo CREB e PKA, sendo essa via possivelmente mediadora de alguns comportamentos de dependência subjacentes ao alcoolismo (ASHER et al., 2002).

A base genética da dependência afeta múltiplos genes localizados no genoma. Durante períodos de exposição a psicoestimulantes, ocorre um aumento na neurotransmissão dopaminérgica, e isso acarreta a ativação de receptor dentro do sistema dopaminérgico que pode levar à ativação de genes específicos (*c-Fos*)

(Ehrlich et al., 2002).

Via de Sinalização AMPc-CREB-c-Fos-Egr-1

Figura 3. Resumo esquemático da sinalização intracelular envolvendo a via de sinalização do AMPc-CREB-c-Fos-Egr-1. Esquema baseado em: Nestler (2001); Chao e Nestler (2004); Nestler 2004).

8. GENE DE RESPOSTA IMEDIATA *c-Fos*

O *c-Fos* é um fator de transcrição pertencente à família *Fos* (*Δfos B*, *FRA1*, *FRA 2* e *c-Fos*) (MILBRANDT, 1987; LEMAIRE et al., 1988; MUTSCHLER, 2000). Muitos pesquisadores têm mostrado que estes fatores de transcrição estão relacionados com várias formas de plasticidade cerebral (CHEN, 1996; CHAUDHURI, 1997; TURGEON, 1997; CHEN, 1996; MANDELZYS 1997; NESTLER, 1999; KACZMAREK, 2000). As proteínas da família *Fos* formam heterodímeros com um membro da família *Jun* para formar a proteína-1 ativadora de fatores de transcrição (AP-1). Complexos AP-1 ligam-se a locais específicos presentes no interior de regiões regulatórias de muitos genes, incluindo aqueles relacionados com o comportamento e com a plasticidade neural (MORGAN e CURRAN, 1991; HOFFMAN, 1992; MORGAN e CURRAN, 1995; NYE e NESTLER, 1996; CHAUDHURI, 1997; TURGEON, 1997; MANDELZYS, 1997; KACZMAREK, 2000).

Níveis basais desses fatores de transcrição são identificados em células não estimuladas, sujeitos apenas a processos fisiológicos contínuos. No entanto, a expressão de *c-Fos* é rapidamente alterada no SNC por uma grande variedade de estímulos (DUNCAN, 1996; BECKMANN e WILCE, 1997; HERDEGEN e LEAH, 1998; MORROW, 2000), bem como por muitos outros estímulos que parecem fazer parte de componentes associados a novidades (CAMPEAU, 1991; GRAYBIEL, 1990; MACK e MACK 1992).

A expressão de *c-Fos* indica que o neurônio está submetendo-se a um processo de adaptação advindo por meio de estímulos neuronais (MORROW , 2002). Por exemplo, em ratos, estudos mostram que a expressão de *c-Fos* está relacionada aos ritmos circadianos, e altos níveis dessa proteína são encontrados durante a fase de escuro, quando os animais estão em maior atividade (GRASSI-

ZUCCONI, 1993). MESNER e colaboradores (1995) mostraram que a proteína *c-Fos* é expressa em processos apoptóticos em neurônios durante a condensação da cromatina. Observou-se também aumento na expressão de *c-Fos*, em situações de medo, na amígdala (SMITH, 1992). No entanto, situações de condicionamento podem reduzir a expressão de *c-Fos* (IRWIN, 1992). Além disso, pesquisadores mostraram que ocorre aumento na expressão de *c-Fos* em camundongos fêmeas durante a formação da memória para os feromônios liberados pelo macho (BRENNAN, 1992).

Estudos prévios têm demonstrado que ocorre um rápido e transitório aumento na expressão de *c-Fos* no estriado, CPF e NAc de animais tratados agudamente com cocaína (GRAYBIEL, 1990; TORRES e RIVIER, 1992; DALIA e WALLACE, 1995; CURRAN, 1996). No entanto, foi demonstrado que, em animais sensibilizados pela cocaína em tratamento repetido, a expressão da proteína *c-Fos* diminuiu nestas mesmas estruturas (MORATALLA, 1996a, b; TODTENKOPF et al., 2002). Neste contexto, a indução da proteína *c-Fos* têm sido usada como um marcador de ativação pós-sináptica (SAGAR et al., 1988; MORGAN e CURRAN, 1991). Uma indução diferencial em *c-Fos* no NAc foi identificada em camundongos pré-expostos à cocaína durante a adolescência, comparados com aqueles que haviam recebido salina (CAMARINI et al., submetido). Além disso, observou-se que a administração aguda de nicotina induz a rápida expressão de *c-Fos* em várias estruturas cerebrais de ratos (SALMINEN, 1996; SEPPÄ, 2001). No entanto, durante a administração contínua, foi observada uma indução atenuada de *c-Fos* (SALMINEN, 1999). Adicionalmente, injeções repetidas de nicotina induziram sensibilização comportamental em ratos, os quais apresentaram diminuição da expressão de *c-Fos* no NAc (SHIM, 2001).

BADIANI e colaboradores (1998) têm demonstrado que a expressão de *c-Fos* no CPF, NCau, NAc e em outras estruturas subcorticais é marcadamente diferente quando injeções de anfetamina são administradas envolvendo contextos ambientais,

em comparação com o que ocorreu em animais que receberam a mesma dose de anfetamina na caixa moradia. Contextos ambientais podem modular o estágio inicial que leva à expressão de genes imediatamente precoces (CROMBAG, 2001). Corroborando estes resultados, USLANER e colaboradores (2001) mostraram que a administração de anfetamina e cocaína associadas com pistas ambientais aumentou a expressão de RNAm para *c-Fos* em relação ao que ocorreu com animais que receberam o mesmo tratamento em suas caixas moradias.

9. GENE DE RESPOSTA IMEDIATA *Egr-1*

O fator de transcrição *Egr-1* (também conhecido como *NGFI-A*, *Krox-24*, *zif268* e *TIS8*) é um membro da família *Egr* que inclui outros fatores de transcrição (*Egr-2*, *Egr-3*, *Egr-4*, *WT-1* e *Zenk*) (MILBRANDT, 1987; LEMAIRE et al., 1988; MUTSCHLER, 2000). As proteínas da família *Egr* pertencem a uma subclasse de proteínas que contêm zinco em sua parte principal, capaz de interagir com os ácidos nucléicos (CHRISTY et al., 1988).

O RNAm para *Egr-1* é detectado no cérebro como um transcrito cerebral de 3.3 kb (MILBRANDT, 1987; SUKHATME, 1988; LEMAIRE et al., 1988; CHRISTY, 1988). A expressão de RNAm para *Egr-1* foi detectada primeiramente no córtex e hipocampo de camundongos (CHRISTY, 1988). No entanto, posteriormente, encontraram-se expressões basais desta proteína no neocórtex, córtex olfatório primário, amígdala, núcleo accumbens, estriado e córtex cerebelar (SCHLINGENSIEPEN, 1991).

O *Egr-1* é expresso em baixos níveis no SNC em células não estimuladas. Estes níveis basais deste fator de transcrição detectados no SNC podem refletir processos fisiológicos contínuos que ocorrem nos animais. Estudos indicam que os níveis basais da expressão de *Egr-1* são mantidos pela plasticidade sináptica que ocorre em resposta a estímulos fisiológicos (LEAH, 1993). No entanto, a expressão de *Egr-1* é rapidamente alterada por uma grande variedade de estímulos (BECKMANN e WILCE, 1997; HERDEGEN e LEAH, 1998).

COPANI e colaboradores (1995) sugerem que a expressão da proteína *Egr-1* esteja envolvida com a indução de apoptose. Como mostrado para *c-Fos*, o *Egr-1* também está alterado em situações de medo, mediadas pela amígdala (SMITH, 1992), e na formação da memória em fêmeas para os feromônios liberados pelo

macho (BRENNAN, 1992). Muitos pesquisadores mostram que a indução, duração e estabilização da LTP (potencialização a longo prazo) também causam a expressão de *Egr-1*, principalmente na região CA1 do HIP (ABRAHAM, 1991; ABRAHAM, 1993; IZQUIERDO e CAMMAROTA, 2004). Além disso, supõe-se que a expressão do *Egr-1* em neurônios hipocampais pode estar relacionada com a consolidação e a reconsolidação da memória em ratos (LEE, 2004).

Tem sido mostrado que administração aguda de cocaína, anfetamina e morfina aumentam a expressão de *Egr-1* no NAc, HIP, NCau, AMIG, estriado, tálamo ventromedial e córtex (BHAT, 1992; COLE et al., 1992; MORATALLA, 1992, 1993; AZNAR, 1995). Já MUTSCHLER e colaboradores (2000) mostraram diminuição na expressão de RNAm para *Egr-1* no NAc, CPF e HIP quando os animais foram submetidos a auto-administração prolongada de cocaína (HAMMER e COOKE, 1996). Além disso, têm-se observado aumento da expressão de *Egr-1* na AMIG e HIP seguido da apresentação de medo discreto e associado a pistas ambientais, sugerindo que a expressão deste fator de transcrição nestas estruturas esteja relacionada com recuperação da memória de medo (HALL, 2001).

VALJENT e colaboradores (2006) sugerem que o condicionamento ambiental requer a participação do *Egr-1* para que ocorra a associação do contexto ambiental com as respostas comportamentais específicas, expressas pela exposição à cocaína.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GERAIS

Psicoestimulantes induzem a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* em várias regiões cerebrais. Estudos de nosso laboratório mostraram uma indução diferencial em *c-Fos* no núcleo accumbens e córtex pré-frontal de camundongos adultos pré-expostos à cocaína durante a adolescência comparados com aqueles que haviam recebido salina (CAMARINI et al., submetido). Não existem estudos que se tenham proposto analisar o possível desenvolvimento de uma resposta condicionada aos efeitos do etanol durante a adolescência na expressão de *c-Fos* e *Egr-1*. Portanto, considerando as inúmeras evidências indicativas da importância do envolvimento da expressão das proteínas *c-Fos* e *Egr-1* e do condicionamento ambiental no desenvolvimento na dependência, o presente trabalho teve como proposição estudar a indução de *c-Fos* e *Egr-1* em várias regiões cerebrais envolvidas no circuito da recompensa em adolescentes expostos agudamente e cronicamente ao etanol. Dado que a sensibilização comportamental ao etanol pode ser fortemente influenciada pelo pareamento da droga com as pistas ambientais (sensibilização dependente de contexto) e que o condicionamento Pavloviano pode ser mais importante no desenvolvimento da sensibilização em adolescentes do que em adultos, estudaremos também a influência do condicionamento ambiental na expressão de *c-Fos* e *Egr-1* induzida pela administração repetida de etanol em adolescentes e adultos.

2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Estudar os efeitos da administração aguda e prolongada de etanol, em baixas doses, em camundongos adultos e adolescentes;
- Verificar a influência do condicionamento ambiental na sensibilização comportamental induzida pelo etanol em camundongos adultos e adolescentes;
- Estudar a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* induzida pela administração aguda de etanol nas regiões do córtex pré-frontal, córtex motor, núcleo accumbens, área dorsal da amígdala, área ventral da amígdala e hipocampo de cérebro de camundongos adultos e adolescentes.
- Estudar a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* induzida pela administração prolongada de etanol nas regiões do córtex pré-frontal, córtex motor, núcleo accumbens, área dorsal da amígdala, área ventral da amígdala e hipocampo de cérebro de camundongos adultos e adolescentes, submetidos ou não a condicionamento ambiental.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. SUJEITOS EXPERIMENTAIS

Para a realização desta dissertação foram utilizados camundongos Swiss Webster machos adolescentes (ADOLESC) de 27-30 dias e adultos (ADULTO) de 56-60 dias. Os sujeitos experimentais foram obtidos no biotério do CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia) localizado no Instituto Biológico do Estado e pertencente à Universidade Federal de São Paulo. Os animais foram alojados em grupos de 5 em caixas de policarbonato (30 x 20 x 12,5 cm) com tampas em inox no biotério do laboratório de Farmacologia Comportamental da USP, por pelo menos 6 dias, antes do início do experimento, sob temperatura constante ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e foram mantidos sob um ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 6:00h e apagadas às 18:00h). Água e comida foram fornecidas *ad libitum*.

2. DROGAS

O etanol (EtOH) (Merck do Brasil, S.A.) foi administrado em uma solução de 12% (v/v), preparada com solução salina (NaCl 0,9%) na dose de 2,0g/kg. A solução salina também foi usada como solução controle (SAL). Todas as injeções foram administradas intraperitonalmente (i.p.).

3. MODELO COMPORTAMENTAL

Registro da atividade geral de camundongos em campo aberto

O campo aberto (CA) utilizado para os testes comportamentais deste trabalho consiste em uma arena de polietileno opaco com formato cilíndrico. O corpo do cilindro tem 50 cm de altura e sua base é um cilindro de madeira com 40 cm de diâmetro e 2 cm de altura. Desse modo, o corpo do cilindro (paredes da arena) apresenta um encaixe justo à sua base (chão da arena), podendo corpo e base serem separados para limpeza. O chão da arena é subdividido em 19 regiões aproximadamente iguais demarcadas por três circunferências concêntricas de raios diferentes (4, 12 e 20 cm), intersectadas por segmentos de retas radiais, como demonstrado na figura 4.

Todos os animais foram observados sempre entre 8 e 11 horas da manhã para evitar efeitos circadianos no comportamento dos animais. Cada animal foi observado individualmente no CA por 5 minutos, 5 minutos após a injeção de salina ou etanol. A atividade geral dos animais foi avaliada por meio de observação direta. O parâmetro comportamental observado foi a medida da frequência de locomoção. Assim, cada unidade de locomoção corresponde ao ato de o animal penetrar com as 4 patas em um dos quadrantes centrais ou periféricos (contíguos à parede) do CA.

Após cada uma das observações, o CA era limpo com uma solução de álcool-água a 5%, imediatamente antes da introdução de um novo animal. Este procedimento foi realizado para evitar possíveis rastros de odor deixados pelo animal anterior.

Figura 4. Mostra um animal em um aparelho de campo aberto.

4. DOSAGEM DA ALCOOLEMIA

Imediatamente após o teste de atividade locomotora, uma amostra de aproximadamente 0,5mL de sangue foi coletada de cada camundongo pelo plexo axilar para determinação da concentração de álcool no sangue (CAS). Em um frasco de vidro de 10 mL, uma alíquota de 0,5mL de sangue foi adicionada a 1,0mL de uma solução de 0,6g/L de n-butanol (padrão interno). O frasco foi selado e incubado por 30 min a 70° C. Em seguida, uma alíquota de 0,25mL do vapor foi retirada (“headspace procedure”) e analisada por cromatografia gasosa (Agilent) com um detector de ionização de chama. Essa análise foi feita pelo Prof. Dr. Maurício Yonamine, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após uma hora do último dia do experimento comportamental, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (0,05ml/100g) e xilazina (0,05ml/100g) i.p. e perfundidos transcardialmente com solução salina tamponada 0,9% (PBS; pH 7,4) contendo 0,01% de heparina, seguida por solução de fixação contendo paraformaldeído a 4% (PFA 4%) em tampão fosfato 0,1M (PB 0,1M). Os encéfalos foram removidos da caixa craniana e mantidos por um período de 4 h no mesmo fixador a 4°C. Em seguida, foram imersos em solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,1M (BP 0,1M) a 4°C por 72 horas. Os encéfalos foram congelados, fatiados em secções coronais de 40 µm de espessura e colocados, imediatamente, em solução de PBS 0,1M em flutuação livre em placas de cultura.

As placas com os cortes foram submetidas à metodologia de imunohistoquímica para a detecção da expressão de *c-Fos* e *Egr-1*. Essas placas foram incubadas com o anticorpo anti-*c-Fos* (Calbiochem/Oncogene) e anti-*Egr-1* (Santa Cruz) diluídos, respectivamente, a 1:5000 e 1:3000 em PB 0,1M contendo 0,3% de Triton X-100, por um período de 14 a 18 horas a 22°C. Após 3 lavagens (10 minutos cada) em PB, os cortes foram incubados com um anticorpo secundário anti-coelho biotinilado feito em “donkey” (asno) (Jackson Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA), diluído a 1:200 em PB 0,1M, por duas horas, à temperatura ambiente. Então, os cortes foram novamente lavados, como anteriormente, em PB 0,1M e incubados com uma solução avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite, Vector Labs.) por duas horas. Seguiu-se uma reação com 0,05% de 3-3'-diaminobenzidina (DAB) e solução 0,01% de peróxido de hidrogênio em PB 0,1M para posterior intensificação da imunorreatividade com uma solução de 0,05% de tetróxido de ósmio, e desidratação em uma série de álcoois e hemo-de (d-limonene e bupylated

hydroxanisole). Após esses procedimentos, as lâminas contendo os cortes reagidos foram cobertas com lamínula para uma análise posterior. O protocolo utilizado para a imuno-histoquímica segue em anexo no final deste trabalho (ANEXO I).

6. ANÁLISE DE DADOS

A imunorreatividade foi analisada por observação em microscópio óptico (Leitz) acoplado a um sistema de imagens composto de câmera de vídeo e computador (utilizando sistema operacional Machintosh) com placa de aquisição de vídeo e com o programa IMAGE (NIH). Com auxílio deste programa, foram realizadas as quantificações após captura da imagem e delimitação do CPF, CM, NAc, ADA, AVA e HIP que continham núcleos *c-Fos*-positivo e *Egr-1*-positivo. Foram considerados positivos apenas os núcleos que se destacavam bastante do ruído de fundo produzido pelo método da imunoperoxidase. Realizamos as contagens em cinco cortes para cada estrutura inserida neste estudo do encéfalo de cada animal.

Os resultados estão expressos em densidade relativa, que correspondem à quantidade de núcleos marcados por milímetro quadrado.

Para fazer a análise semi-quantitativa da expressão de *c-Fos* e *Egr-1* no córtex pré-frontal, córtex motor, núcleo accumbens, área dorsal da amígdala, área ventral da amígdala e hipocampo, a densidade óptica média das áreas de interesse foi avaliada com a rotina “density slice”. Resumidamente, essa rotina marca em vermelho os locais mais intensamente reagidos, ou seja, quanto mais intensa a reação de um núcleo, mais fortemente marcado em vermelho ele estará. Em seguida, foi determinada uma área de $4,8 \times 10^{-1} \text{ mm}^2$ (600 μm de altura e 800 μm de largura) para o córtex pré-frontal, $5,6 \times 10^{-1} \text{ mm}^2$ (700 μm de altura e 800 μm de largura) para o córtex motor, $3,6 \times 10^{-1} \text{ mm}^2$ (600 μm de altura e 600 μm de largura) para o núcleo accumbens,

$250 \times 10^{-1} \text{ mm}^2$ ($500 \mu\text{m}$ de altura e $500 \mu\text{m}$ de largura) para a área dorsal da amígdala e a área ventral da amígdala e $3,2 \times 10^{-1} \text{ mm}^2$ ($400 \mu\text{m}$ de altura e $800 \mu\text{m}$ de largura) para o hipocampo. Nestas áreas, eram obtidas as densidades ópticas correspondentes às regiões marcadas em vermelho. Para cada animal analisado foram feitas medidas em cinco cortes diferentes para cada uma das estruturas, sendo que estes cortes eram das seguintes regiões: córtex pré-frontal (córtex associativo frontal), córtex motor (córtex motor primário e córtex motor secundário), núcleo accumbens (cerne do núcleo accumbens e concha do núcleo accumbens), área dorsal da amígdala, área ventral da amígdala e hipocampo (campo CA1 do hipocampo). Com os números obtidos, fizeram-se médias para cada animal analisado. Posteriormente, fizeram-se as médias de cada grupo. Este número representa, dependendo do resultado, o aumento ou não, em número de núcleos marcados por mm^2 , a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* nas diferentes estruturas, quando comparada à do grupo controle. Na figura 5, estão esquematizadas todas as estruturas analisadas neste trabalho.

Fig 5. Esquematização de secções frontais do encéfalo de camundongos mostrando o CPF, CoM, NAc, ADA, AVA e HIP (esquemas baseados em Paxinus & Franklin, 2001) analisadas neste estudo. No CPF (a), foi analisada a área FrA (FrA = córtex frontal associativo); no CoM (b), foram analisadas as áreas motoras M1 e M2 (M1 = córtex motor primário; M2 = córtex motor secundário); no NAc (c), foram analisadas as áreas AcbC e AcbSh (AcbC = cerne do núcleo accumbens; AcbSh = concha do núcleo accumbens); na amígdala, foram analisadas duas regiões: (d) área da amígdala dorsal (ADA) e (e) área da amígdala ventral (AVA); e no HIP (f), foi analisada a área CA1 (CA1 = campo CA1 do HIP).

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados comportamentais e da densidade das imuno-histoquímicas foi utilizada a análise de variância (ANOVA), proposta por Snedecor (1946), sendo as variáveis independentes: o tratamento (salina ou etanol) e a idade (adolescentes ou adultos), e sendo as variáveis dependentes: a atividade locomotora e a densidade da marcação. A análise da atividade locomotora medida em vários dias foi realizada pela ANOVA de medidas repetidas. De acordo com os resultados destes, realizou-se o teste post-hoc de múltiplas comparações de Tukey com o auxílio do programa STATISTIC 7.0. A probabilidade de $p < 0,05$ é considerada suficiente para rejeitar a hipótese nula, ou seja, para revelar as diferenças estatisticamente significantes entre os vários grupos comparados.

**DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS,
RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL**

1. EXPERIMENTO I:

- a) Efeitos comportamentais da administração aguda de etanol em camundongos adultos e adolescentes;**
- b) Expressões das proteínas *c-Fos* e *Egr-1* após administração aguda de etanol em camundongos adultos e adolescentes.**

1.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

1.1.1. Comportamento

Camundongos machos foram distribuídos em 4 grupos com 12 animais cada, os quais foram submetidos ao seguinte tratamento:

Grupos ADULTO-SAL, ADULTO-EtOH, ADOLESC-SAL e ADOLESC-EtOH:

no primeiro e segundo dias, animais adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) receberam injeções i.p. de solução controle (SAL) e, 5 minutos depois, foram submetidos a 5 minutos de exposição ao campo aberto para quantificação da atividade geral. Essa habituação é necessária para diminuir o estresse do animal à novidade, ao ser exposto pela primeira vez a um ambiente estranho. No terceiro dia, os animais adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) foram tratados agudamente com injeção i.p. de solução controle (SAL) ou etanol (EtOH) e a atividade geral foi quantificada.

1.1.2. Imuno-histoquímica para *c-Fos* e *Egr-1*

Uma hora depois, os animais foram anestesiados, perfundidos e os encéfalos retirados para as reações de imuno-histoquímica, para análise da expressão das proteínas *c-Fos* e *Egr-1*.

1.2. RESULTADOS

1.2.1. Comportamento

A figura 6 mostra a frequência de locomoção de camundongos adultos e adolescentes tratados agudamente com etanol. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade. No entanto, revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,44) = 90.08$, $p < 0,05$] e para a interação [$F(3,44) = 5,63$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior revelou que a administração aguda de etanol aumentou a frequência de locomoção dos animais adultos e adolescentes, revelando um efeito estimulante com a dose de 2,0g/kg de etanol. A estimulação locomotora induzida pelo etanol foi menor nos adolescentes, comparados aos adultos (Tukey, $p < 0.05$).

Figura 6. Efeitos do tratamento agudo de etanol 2g/kg (EtOH) ou solução controle (SAL) sobre a frequência de locomoção em camundongos adultos (ADULTO) (n = 12/grupo) ou adolescentes (ADOLESC) (n = 12/grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média ± E.P. (erro padrão).

□ p < 0,05 em relação aos animais tratados com solução controle (SAL), do mesmo grupo de idade.

○ p < 0,05 em relação aos animais adultos (ADULTO) tratados com etanol (EtOH).

1.2.2. Imuno-histoquímica para *c-Fos* e *Egr-1*

1.2.2.1. Córtex Pré-Frontal (CPF)

A figura 7A mostra a expressão da proteína *c-Fos* no CPF. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade e para o fator interação (idade X tratamento) no CPF. No entanto, este teste estatístico revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,16) = 19,89$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior revelou que tanto animais adultos quanto animais adolescentes apresentaram aumento no número de núcleos marcados para a proteína *c-Fos* quando comparados aos animais tratados agudamente com SAL.

A figura 7B mostra a expressão da proteína *Egr-1* no CPF. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade e para o fator interação. No entanto, revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,16) = 19,89$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior para a expressão da proteína *Egr-1* no CPF revelou que animais adultos e adolescentes tratados agudamente com EtOH apresentaram diferenças semelhantes àsquelas descritas para a expressão de *c-Fos*.

A figura 8 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* no CPF, referentes às análises dos gráficos 7A e 7B.

A

Córtex Pré-frontal (*c-Fos*)

B

Córtex Pré-frontal (*Egr-1*)

Figura 7. Efeitos do tratamento agudo de etanol 2g/kg (EtOH) ou solução controle (SAL) sobre as expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) no CPF de camundongos adultos (ADULTO) ($n = 5/\text{grupo}$) ou adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação aos animais tratados com solução controle (SAL), do mesmo grupo de idade.

Figura 8. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro de camundongos adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) tratados agudamente com solução controle (SAL) ou etanol (EtOH) mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no CPF. As expressões de *c-Fos* e *Egr-1* aumentaram no CPF de animais adultos e adolescentes tratados agudamente com uma injeção de EtOH quando comparados aos animais tratados com SAL. Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 μ m.

1.2.2.2. *Córtex Motor (CoM)*

Já na figura 9A está representada a expressão da proteína *c-Fos* no CoM. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade no CoM. No entanto, este teste estatístico revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,16) = 349,07$, $p < 0,05$] e para o fator interação (idade X tratamento) [$F(3,16) = 4.74$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior para a expressão da proteína *c-Fos* no CoM revelou que tanto animais adultos quanto adolescentes tratados agudamente com EtOH apresentaram aumento no número de núcleos marcados para a proteína *c-Fos*, quando comparados aos animais tratados agudamente com SAL.

A figura 9B mostra a expressão da proteína *Egr-1* no CoM. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade e para o fator interação. No entanto, revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,16) = 349,07$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior para a expressão da proteína *Egr-1* no CoM revelou que animais adultos e adolescentes tratados agudamente com SAL ou EtOH apresentaram diferenças semelhantes àquelas descritas para a expressão de *c-Fos*.

A figura 10 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* no CoM, referentes às análises dos gráficos 9A e 9B.

Figura 9. Efeitos do tratamento agudo de etanol 2g/kg (EtOH) ou solução controle (SAL) sobre as expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) no CoM de camundongos adultos (ADULTO) (n = 5/grupo) ou adolescentes (ADOLESC) (n = 5/grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação aos animais tratados com solução controle (SAL), do mesmo grupo de idade.

Figura 10. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro de camundongos adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) tratados agudamente com solução controle (SAL) ou etanol (EtOH) mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no CoM. As expressões de *c-Fos* e *Egr-1* aumentaram no CoM de animais adultos e adolescentes tratados agudamente com uma injeção de EtOH quando comparado aos animais tratados com SAL. Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 μ m.

1.2.2.3. Núcleo Accumbens (NAc)

A expressão da proteína *c-Fos* no NAc está representada na figura 11A. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade e para o fator interação no NAc. No entanto, este teste estatístico revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,16) = 27,26$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior para a expressão da proteína *c-Fos* no NAc revelou que animais adultos e adolescentes tratados agudamente com EtOH apresentaram aumento no número de núcleos marcados para a proteína *c-Fos*, quando comparado aos animais tratados agudamente com SAL.

A figura 11B mostra a expressão da proteína *Egr-1* no NAc. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade e para o fator interação. No entanto, revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,16) = 27,26$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior para a expressão da proteína *Egr-1* no NAc revelou que animais adultos e adolescentes tratados agudamente com SAL ou EtOH apresentaram diferenças semelhantes àquelas descritas para a expressão de *c-Fos*.

A figura 12 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* no NAc, referentes às análises dos gráficos 11A e 11B.

Figura 11. Efeitos do tratamento agudo de etanol 2g/kg (EtOH) ou solução controle (SAL) sobre as expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) no NAc de camundongos adultos (ADULTO) ($n = 5/\text{grupo}$) ou adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação aos animais tratados com solução controle (SAL), do mesmo grupo de idade.

Figura 12. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro de camundongos adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) tratados agudamente com solução controle (SAL) ou etanol (EtOH) mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no NAc. As expressões de *c-Fos* e *Egr-1* aumentaram no NAc de animais adultos e adolescentes tratados agudamente com uma injeção de EtOH quando comparado com animais tratados com SAL. Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 μ m.

1.2.2.4. Área Dorsal da Amígdala (ADA)

Na figura 13A está a representação da expressão da proteína *c-Fos* na ADA. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou haver diferenças para o fator idade [$F(3,16) = 26,09$, $p < 0,05$], para o fator tratamento [$F(3,16) = 106,4$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(3,16) = 27,87$, $p < 0,05$]. Tanto os animais adultos quanto os animais adolescentes apresentaram aumento no número de núcleos marcados para a proteína *c-Fos* quando comparados aos animais tratados agudamente com SAL. Não foram encontradas diferenças entre os animais adultos e adolescentes tratados agudamente com EtOH. Por outro lado, revelou-se diferença entre os animais adultos e adolescentes tratados agudamente com SAL, onde os animais adolescentes apresentaram menor número de núcleos marcados para *c-Fos* na ADA quando comparados com os animais adultos que receberam o mesmo tratamento.

A figura 13B mostra a expressão da proteína *Egr-1* na ADA. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade e para o fator interação. No entanto, revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,16) = 14,16$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior revelou que animais adultos e adolescentes tratados agudamente com EtOH apresentaram aumento no número de núcleos marcados para a proteína *Egr-1*.

A figura 14 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* no ADA, referentes às análises dos gráficos 13A e 13B.

Figura 13. Efeitos do tratamento agudo de etanol 2g/kg (EtOH) ou solução controle (SAL) sobre as expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) na ADA de camundongos adultos (ADULTO) ($n = 5/\text{grupo}$) ou adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação aos animais tratados com solução controle (SAL), do mesmo grupo de idade.

○ $p < 0,05$ em relação aos animais adultos (ADULTO) tratados com etanol (SAL).

Figura 14. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro de camundongos adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) tratados agudamente com solução controle (SAL) ou etanol (EtOH) mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* na ADA. As expressões de *c-Fos* e *Egr-1* aumentaram na ADA de animais adultos e adolescentes tratados agudamente com uma injeção de EtOH quando comparado com os animais tratados com SAL. Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 μ m.

1.2.2.5. Área Ventral da Amígdala (AVA)

A representação da expressão da proteína *c-Fos* na AVA pode ser observada na figura 15A. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou haver diferenças para o fator idade [$F(3,16) = 9,81$, $p < 0,05$], para o fator tratamento [$F(3,16) = 129,63$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(3,16) = 15,30$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior revelou que animais adultos e adolescentes tratados agudamente com EtOH ou SAL apresentaram diferenças semelhantes às aquelas descritas para a expressão da proteína *c-Fos* na ADA.

A figura 15B mostra a expressão da proteína *Egr-1* na AVA. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade e para o fator interação. No entanto, revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,16) = 12,13$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior revelou que animais adultos e adolescentes tratados agudamente com SAL ou EtOH apresentaram diferenças semelhantes às aquelas descritas para a expressão de *c-Fos* na ADA.

A figura 16 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* no AVA, referentes às análises dos gráficos 15A e 15B.

Figura 15. Efeitos do tratamento agudo de etanol 2g/kg (EtOH) ou solução controle (SAL) sobre as expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) na AVA de camundongos adultos (ADULTO) (n = 5/grupo) ou adolescentes (ADOLESC) (n = 5/grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação aos animais tratados com solução controle (SAL), do mesmo grupo de idade.

○ $p < 0,05$ em relação aos animais adultos (ADULTO) tratados com etanol (SAL).

Figura 16. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro de camundongos adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) tratados agudamente com solução controle (SAL) ou etanol (EtOH) mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* na AVA. As expressões de *c-Fos* e *Egr-1* aumentaram na AVA de animais adultos e adolescentes tratados agudamente com uma injeção de EtOH quando comparado com animais tratados com SAL. Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 μ m.

1.2.2.6. Hipocampo (HIP)

A expressão da proteína *c-Fos* no HIP está representado na figura 17A. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade e para o fator interação no HIP. No entanto, este teste estatístico revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,20) = 139,26$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior revelou que tanto os animais adultos quanto os animais adolescentes apresentaram aumento no número de núcleos marcados para a proteína *c-Fos* no HIP quando comparados aos animais tratados agudamente com SAL.

A figura 17B mostra a expressão da proteína *Egr-1* na HIP. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não haver diferenças para o fator idade e para o fator interação. No entanto, revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(3,20) = 139,26$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior para a expressão da proteína *Egr-1* no HIP revelou que animais adultos e adolescentes tratados agudamente com EtOH apresentaram diferenças semelhantes àquelas descritas para a expressão de *c-Fos*.

A figura 18 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* no HIP, referentes às análises dos gráficos 17A e 17B.

Figura 17. Efeitos do tratamento agudo de etanol 2g/kg (EtOH) ou solução controle (SAL) sobre as expressões das proteínas *c-Fos* (a) e *Egr-1* (B) no HIP de camundongos adultos (ADULTO) (n = 6/grupo) ou adolescentes (ADOLESC) (n = 6/grupo). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação aos animais tratados com solução controle (SAL), do mesmo grupo de idade.

Figura 18. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro de camundongos adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) tratados agudamente com solução controle (SAL) ou etanol (EtOH) mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no HIP. As expressões de *c-Fos* e *Egr-1* aumentaram no HIP de animais adultos e adolescentes tratados agudamente com uma injeção de EtOH quando comparado com animais tratados com SAL. Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 μ m.

1.3. DISCUSSÃO PARCIAL

Os resultados comportamentais obtidos com o Experimento 1 confirmaram que a dose usada de etanol (2,0 g/kg) é uma dose capaz de estimular a atividade locomotora de camundongos Swiss (GOELDNER et al., 2005; BROADBENT et al., 2005; MEYER et al., 2005; CAMARINI et al., 2000a, 2000b; CUNNINGHAM & NOBLE, 1992; MASUR & BOERNING, 1980). Entretanto, a hiperatividade locomotora promovida pela injeção única de 2,0 g/kg de etanol apresentou características específicas: os animais adultos (ADULTO-EtOH) tiveram uma frequência significativamente maior que os adolescentes (ADOLESC-EtOH).

Os resultados imuno-histoquímicos mostraram aumento na expressão de *c-Fos* e *Egr-1* após o tratamento com uma única injeção de etanol tanto em adultos (ADULTO-EtOH) quanto em adolescentes (ADOLESC-EtOH) no CPF, CoM, NAc, ADA, AVA e HIP quando comparados com seus respectivos controles (ADULTO-SAL e ADOLESC-SAL).

Analisando os resultados da imuno-histoquímica para *c-Fos* e *Egr-1* e comparando-os com os dados comportamentais obtidos, sugerimos que o número de neurônios expressando *c-Fos* e *Egr-1* refletem o aumento da excitabilidade neuronal ocorrida nas regiões analisadas neste trabalho. Apesar de o etanol agir no sistema GABAérgico, relatos mostram que a administração aguda de etanol, em baixas doses, aumenta a liberação de dopamina na via mesolímbica (PIERCE & KUMARESAN, 2006; DI CHIARA et al, 2004). A superestimulação de receptores D1 pode ativar a via do AMP cíclico e, conseqüentemente, ativar proteínas quinases responsáveis por regularem fatores de transcrição tipo CREB, o qual se liga à seqüência específica do DNA conhecida por elemento de resposta ao AMPc (CRE). Alguns dos genes que contêm CREs expressam fatores de transcrição de resposta

imediate como *c-Fos* e *Egr-1* (HYMAN e NESTLER, 1996). Assim, uma superestimulação desta via de sinalização intracelular poderia aumentar a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* evidenciada nos resultados obtidos com o experimento 1. De fato, a sinalização do AMPc-PKA tem sido implicada nos efeitos centrais do etanol. O etanol ativa a expressão de genes mediados pelo CREB em várias regiões encefálicas do cérebro de camundongos, incluindo o córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (ASYIED et al., 2006).

Podemos observar que uma única dose de etanol também foi suficiente para alterar as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no CPF, CoM, NAc, ADA, AVA e HIP de animais adultos (ADULTO-EtOH) e adolescentes (ADOLESC-EtOH), mostrando mais uma vez que estas estruturas têm uma possível função dentro da circuitaria da recompensa cerebral, além de sugerir uma importante participação destes fatores de transcrição nos efeitos comportamentais ocasionados por um tratamento agudo com etanol.

Na primeira vez que um indivíduo experimenta o efeito farmacológico de uma droga, no nosso caso o etanol, observa-se uma comum propriedade a todas as drogas de abuso, que é a euforia. Em animais, a euforia é visualizada pelo aumento da atividade locomotora. Nesse momento, pode existir o início da associação do ato de consumir a droga com os efeitos neurofarmacológicos. Esse tipo de aprendizado é conhecido como memória associativa, sendo apontada por pesquisadores como sendo o início da dependência (GONZALES et al., 2004).

Tem-se demonstrado que uma única exposição ao etanol é capaz de induzir tanto alterações comportamentais quanto neurofisiológicas. A administração de uma única dose de etanol foi capaz de induzir potencialização de sinapses GABAérgicas, via mecanismo dependente de PKA, na AVTM, associada a um aumento no consumo de álcool (MELIS et al., 2002).

Em nosso estudo, tanto animais adultos quanto adolescentes que receberam etanol agudamente apresentaram aumento da atividade locomotora e também tiveram aumento na expressão de *c-Fos* e *Egr-1* nas estruturas relacionadas à memória, como o HIP, a AMIG e o CPF, e também na estrutura responsável por fazer a associação e integração de informações, o NAc. O aumento na locomoção nos animais tratados agudamente com etanol pode estar relacionado com a integração exploratória do contexto com os efeitos do etanol sobre o sistema locomotor. Este acontecimento requer a utilização de algumas estruturas cerebrais, principalmente aquelas relacionadas ao sistema límbico (CPF, NAC, AMIG e HIP) e ao sistema motor (CoM). Desse modo, foi visto que a administração aguda de etanol induz igualmente a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* tanto em animais adultos quanto em animais adolescentes em todas as estruturas cerebrais analisadas, levando-se a supor que as mesmas estejam envolvidas com a expressão do comportamento analisado neste trabalho, no caso a hiperatividade locomotora. Para os adolescentes, caso a administração continue, segundo alguns pesquisadores, poderão ocorrer consequências que persistirão por toda a vida, pois muitos estudos mostram várias formas de plasticidade sináptica durante alguns estados patológicos, como a dependência, em muitas estruturas encefálicas, principalmente naquelas analisadas neste trabalho (KOMBIAN e MALENKA, 1994; BONCI e MALENKA, 1999; THOMAS et al., 2000; LI e KAUER, 2004).

Em conclusão, os dados do Experimento I mostraram que uma única injeção i.p. de 2,0 g/kg de etanol é capaz de promover hiperatividade locomotora e aumentar a expressão tanto da proteína *c-Fos* quanto da proteína *Egr-1* no CPF, CoM, NAc, ADA, AVA e HIP de camundongos adultos e adolescentes. Assim, podemos sugerir que o aumento na expressão de *c-Fos* e *Egr-1* nas estruturas analisadas, estruturas

estas participantes do sistema mesolímbico/mesocortical, possui importante papel nos efeitos reforçadores do etanol.

2. EXPERIMENTO II:

- a) Efeitos comportamentais da administração prolongada de etanol em camundongos adultos e adolescentes – Influência do condicionamento ambiental;**
- b) Expressões das proteínas *c-Fos* e *Egr-1* após administração prolongada de etanol em camundongos adultos e adolescentes.**

2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.1.1. Comportamento

Camundongos machos adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) foram distribuídos em dois grandes grupos: i) não-expostos ao campo aberto; ii) expostos ao campo aberto.

No caso da não-exposição ao campo aberto (CA), os animais recebiam uma injeção de solução controle (SAL) e, duas horas depois, recebiam SAL (grupos ADULTO-SAL-CM-SAL e ADOLESC-SAL-CM-SAL) ou EtOH (grupos ADULTO-SAL-CM-EtOH e ADOLESC-SAL-CM-EtOH), ambos na caixa moradia (CM), como mostram as figuras 19 e 20. O número de animais por grupo foi igual a 10. No caso da exposição ao campo aberto (CA), os animais recebiam SAL ou EtOH e, cinco minutos depois, eram colocados no campo aberto por cinco minutos e, duas horas depois da primeira injeção, eles recebiam uma segunda injeção de SAL ou EtOH no CA. Este procedimento foi repetido durante todo o tratamento. O grupo de animais expostos ao CA foi subdividido em três grupos com 10 animais cada:

- SAL (pareado, grupos ADULTO-SAL-CA-SAL e ADOLESC-SAL-CA-SAL);

- EtOH (não-pareado, grupos ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-SAL-CA-EtOH);
- EtOH (pareado, grupos ADULTO-EtOH-CA-SAL e ADOLESC-EtOH-CA-SAL).

Estes grupos recebiam injeção i.p. de SAL (grupos ADULTO-SAL-CA-SAL, ADULTO-SAL-CA-EtOH, ADOLESC-SAL-CA-SAL e ADOLESC-SAL-CA-EtOH) ou EtOH (grupos ADULTO-EtOH-CA-SAL e ADOLESC-EtOH-CA-SAL). Cinco minutos depois das respectivas injeções, os animais eram expostos ao CA durante cinco minutos. Duas horas depois da saída do CA, os animais receberam uma segunda injeção i.p. de SAL (grupos ADULTO-SAL-CA-SAL, ADULTO-EtOH-CA-SAL, ADOLESC-SAL-CA-SAL e ADOLESC-EtOH-CA-SAL) ou EtOH (grupos ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-SAL-CA-EtOH), como mostram as figuras 19 e 20.

Antes do início do experimento, os animais foram pesados e manipulados por cinco dias para diminuir o estresse do contato com o experimentador.

Habituação: como mostra a figura 21, no primeiro e segundo dias, todos os animais dos grupos expostos ao CA receberam uma injeção de SAL e a atividade locomotora foi registrada, enquanto que os animais não expostos ao CA receberam somente injeções de SAL na CM.

Tratamento: ocorreu do 3º ao 17º dias. Os grupos expostos ao CA receberam injeções diárias de EtOH ou SAL, de acordo com o protocolo descrito acima. Cinco minutos depois, eram expostos ao CA durante cinco minutos. A atividade locomotora foi mensurada no 3º, 10º e 17º dias. Os grupos não expostos ao CA receberam duas injeções (SAL ou EtOH) com intervalo de duas horas, ambas na CM.

Desafio com salina: ocorreu no 18º dia, onde todos os grupos (expostos e não expostos ao CA) foram desafiados com SAL e, cinco minutos depois, a atividade locomotora foi registrada por 5 minutos.

Período de abstinência: compreendido do 19º ao 23º dias, período em que os grupos não receberam qualquer tratamento.

Desafio com etanol: ocorreu no 24º dia, onde todos os grupos (expostos e não expostos ao CA) foram desafiados com EtOH e, cinco minutos depois, a atividade locomotora foi registrada por 5 minutos.

Distribuição de Grupos			
GRUPOS	Não Exposto	Controle (SAL)	ADULTO
			ADOLESC
		EtOH	ADULTO
			ADOLESC
	Exposto	Controle (SAL)	ADULTO
			ADOLESC
		Não Pareado (EtOH)	ADULTO
			ADOLESC
		Pareado (EtOH)	ADULTO
			ADOLESC

Figura 19. Esquema de distribuição de camundongos adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) em grupos específicos para avaliar o desenvolvimento e expressão da sensibilização comportamental aos efeitos locomotores do etanol em camundongos adolescentes e adultos – Influência do condicionamento ambiental.

Tratamento	
(3º ao 17º dias do experimento)	
I - Animais Não Expostos ao Campo Aberto	
SAL (CM) ————— 2 h —————> SAL / EtOH (CM)	
ADULTO ou ADOLESC	Grupo Controle SAL (SAL-CM-SAL)
	Grupo EtOH (SAL-CM-EtOH)
II - Animais Expostos ao Campo Aberto	
SAL / EtOH ————— 5 min —————> CA ————— 2 h —————> SAL / EtOH (CM)	
ADULTO ou ADOLESC	Grupo Controle SAL (SAL-CA-SAL)
	Grupo Não-Pareado EtOH (SAL-CA-EtOH)
ADOLESC	Grupo Pareado EtOH (EtOH-CA-SAL)

CA: medida da atividade locomotora no campo aberto por 5 minutos imediatamente 5 minutos após a 1ª injeção.

Figura 20. Esquema de tratamento dos diferentes grupos de camundongos adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) realizados entre os dias 3 e 17 de tratamento para avaliar o desenvolvimento e expressão da sensibilização comportamental aos efeitos locomotores do etanol em camundongos adolescentes e adultos – Influência do condicionamento ambiental.

Tratamento Repetido (24 dias)

Figura 21. Tratamento repetido realizado nos diferentes grupos de camundongos adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) durante os 24 dias de experimento para avaliar o desenvolvimento e expressão da sensibilização comportamental aos efeitos locomotores do etanol em camundongos adolescentes e adultos – influência do condicionamento ambiental - observando que os animais expostos passaram no campo aberto todos os 15 dias de tratamento, porém somente foram quantificados no 3º, 10º e 17º dias, enquanto que os animais não expostos passaram pela primeira vez no campo aberto no 18º dia de tratamento e, posteriormente, no 24º. dia.

2.1.2. Imuno-histoquímica para *c-Fos* e *Egr-1*

Uma hora depois da avaliação comportamental, os animais foram anestesiados, perfundidos e os encéfalos retirados para as reações imuno-histoquímica, para análise da expressão das proteínas *c-Fos* e *Egr-1*.

2.1.3. Dosagem da Alcoolemia

Imediatamente após o teste de atividade locomotora, uma amostra de aproximadamente 0,5mL de sangue foi coletada de cada camundongo pelo plexo axilar para determinação da concentração de álcool no sangue (CAS).

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Comportamento

2.2.1.1. Análise comportamental do 1º ao 17º dias de tratamento

A figura 22 mostra os resultados da atividade locomotora induzida pelo tratamento repetido com 2,0 g/kg de EtOH durante 15 dias de tratamento pareado ao CA em camundongos adultos e adolescentes. O teste estatístico ANOVA de três vias (idade X tratamento X tempo) revelou existirem significantes diferenças para o fator idade [$F(1,54) = 33,19$, $p < 0,01$], para o fator tratamento [$F(2,54) = 115,06$, $p < 0,01$], para o fator tempo [$F(2,108) = 3,73$, $p < 0,05$], para as interações idade X tratamento [$F(2,54) = 15,28$, $p < 0,01$], idade X tempo [$F(2,108) = 6,34$, $p < 0,01$], tratamento X tempo [$F(4,108) = 4,43$, $p < 0,05$], e para a interação idade X tratamento X tempo [$F(4,108) = 6,33$, $p < 0,01$]. Uma análise posterior, realizada para a interação idade X tratamento X tempo, revelou que, no 3º dia (primeira injeção de etanol ou salina), os animais que receberam etanol antes de passar pelo campo aberto apresentaram uma maior atividade locomotora do que aqueles que receberam salina, independente da idade. Isso mostra que a dose de etanol usada induziu estimulação locomotora em ambas idades. Nesse dia, animais adolescentes e adultos tratados com etanol não diferiram entre si. Entretanto, passaram a diferir no 10º e 17º dias de tratamento, com adultos apresentando maior atividade locomotora do que os adolescentes.

Com o decorrer do tratamento, animais adultos pré-tratados com EtOH, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL) apresentaram locomoção total maior no 10º e 17º dias em relação ao 3º dia, indicando sensibilização comportamental aos efeitos do EtOH. No entanto, os animais

adolescentes (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram diminuição da atividade locomotora no 17º dia do experimento, comparado ao 3º dia, sugerindo tolerância aos efeitos do EtOH.

Com relação aos dois primeiros dias de exposição ao campo aberto, sob efeito de salina, a ANOVA de 3 vias (idade X tratamento X tempo) revelou um efeito de tempo [$F(1,54) = 336,2$, $p < 0,01$]. A atividade locomotora do 2º. dia de exposição ao campo aberto foi menor do que aquela observada no 1º. dia, mostrando ter ocorrido habituação.

Atividade locomotora

Figura 22. Frequência de locomoção de animais adultos (ADULTO) e adolescentes (ADOLESC) expostos ao CA (pareados e não-pareados). Nos dias 1 e 2 de tratamento, os animais receberam salina. Os animais foram submetidos aos respectivos tratamentos do 3º ao 17º dias do experimento. A quantificação da atividade locomotora dos animais foi realizada nos 1º., 2º., 3º., 10º. e 17º. dias do experimento. Os animais adultos expostos ao CA após a administração de EtOH (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL) desenvolveram sensibilização comportamental ao EtOH. Os animais adolescentes expostos ao CA após a administração de EtOH (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) desenvolveram tolerância.

difere do dia 1

* difere do dia 3

+ difere dos grupos tratados com salina antes da exposição ao campo aberto

□ difere do respectivo grupo de adolescentes, dentro do mesmo dia de tratamento

2.2.1.2. Análise comportamental do 18º dia de tratamento

No 18º dia (figura 23), todos os animais, expostos e não-expostos ao CA, receberam uma injeção de SAL e, cinco minutos depois, foram observados em CA por cinco minutos para se fazer o registro da frequência de locomoção. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou existirem significantes diferenças para o fator idade [$F(9,90) = 22,48$, $p < 0,05$], para o fator tratamento [$F(9,90) = 37,44$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,90) = 22,16$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior revelou que o grupo de camundongos adultos tratados repetidamente com EtOH, pareado e exposto ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), apresentou frequência de locomoção significativamente maior que os grupos não-expostos ao CA (grupos ADULTO-SAL-CM-EtOH e ADULTO-SAL-CM-SAL) e os grupos tratados repetidamente com SAL e expostos ao CA (grupos ADULTO-SAL-CA-SAL e ADULTO-SAL-CA-EtOH), quando desafiados com uma injeção de SAL. Este resultado reflete um efeito de condicionamento dos efeitos do etanol com as pistas ambientais nos animais que recebiam etanol e logo eram expostos ao campo aberto. O grupo de camundongos adolescentes pré-tratados com EtOH e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) também apresentou frequência locomotora maior do que aqueles que recebiam salina antes da exposição ao campo aberto, porém de menor amplitude. Além disso, apresentou frequência de locomoção significativamente menor que os grupos não-expostos ao CA (grupos ADOLESC-SAL-CM-SAL e ADOLESC-SAL-CM-EtOH). Deste modo, é possível visualizar uma expressiva diferença na frequência de locomoção entre os adolescentes tratados repetidamente com EtOH e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) e os adultos igualmente tratados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), onde os animais adolescentes tiveram frequência de locomoção inferior do aquela apresenta pelos animais adultos. Neste dia, pudemos analisar o efeito da novidade nos grupos que não eram expostos ao

CA, pois estes animais passaram pela primeira vez pelo aparato. Deste modo, camundongos adultos e adolescentes que não tinham sido expostos ao CA apresentaram frequências de locomoção maiores do que os animais adultos e adolescentes expostos a ele, tratados repetidamente com SAL durante o experimento (grupo SAL-CM-SAL > grupo SAL-CA-SAL). Esta diferença decorre de dois fatores: a) efeito da novidade: roedores expostos pela primeira vez a um ambiente novo tendem a explorar mais o local; b) efeito da habituação: animais expostos a um ambiente mais de uma vez tendem a diminuir a exploração ao local, o que tem sido usado para investigar processos de memória.

Atividade Locomotora - Desafio Solução Controle

Figura 23. Frequência de locomoção de todos os grupos de animais adultos (ADULTO) (n=10/grupo) e adolescentes (ADOLESC) (n=10/grupo) expostos e não-expostos ao CA, desafiados com uma injeção de solução controle (SAL) no 18º dia do experimento. Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL não-exposto ao campo aberto (grupo SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

○ $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-expostos ao campo aberto (grupo SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

$p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-pareado ao campo aberto (grupo SAL-CA-SAL), do mesmo grupo de idade.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-pareado ao campo aberto (grupo SAL-CA-EtOH), do mesmo grupo de idade.

♦ $p < 0,05$ em relação aos grupos de diferente idade e igualmente tratamento.

2.2.1.3. Análise comportamental do 24º dia de tratamento

Na figura 24, encontram-se os resultados referentes ao 24º dia, quando os animais de todos os grupos, expostos e não-expostos ao CA, foram desafiados com 2g/kg de EtOH. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não existirem significantes diferenças para o fator tratamento. No entanto, este mesmo teste revelou existirem significantes diferenças para o fator idade [$F(9,90) = 47,43$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,90) = 15,82$, $p < 0,05$]. Uma análise posterior revelou que os camundongos adultos tratados repetidamente com EtOH e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL) apresentaram frequência de locomoção maior que os demais grupos de camundongos adultos, indicando expressão da sensibilização comportamental ao EtOH. No entanto, os camundongos adolescentes tratados repetidamente com EtOH, pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram frequência de locomoção menor que os camundongos adolescentes dos demais grupos, sugerindo tolerância. Além disso, os animais adolescentes tratados com EtOH, não-pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CA-EtOH) apresentaram frequência de locomoção significativamente maior do que os animais adolescentes não-expostos ao CA durante o tratamento (grupos ADOLESC-SAL-CM-SAL e ADOLESC-SAL-CM-EtOH). Quando realizamos as comparações dos adolescentes com os adultos, pudemos constatar que os animais adolescentes tratados com SAL e expostos ao CA (grupo ADOLEC-SAL-CA-SAL) apresentaram frequência de locomoção relativamente menor do que aquela apresentada pelos animais adultos que receberam o mesmo tratamento e foram expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL). Outra observação que pôde ser feita foi em relação aos animais adolescentes tratados repetidamente com EtOH, não-pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CA-EtOH), os quais apresentaram frequência de locomoção maior do que a dos animais adultos que

receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-EtOH).

Atividade Locomotora - Desafio Etanol

Figura 24. Frequência de locomoção de todos os grupos de animais adultos (ADULTO) (n=10/grupo) e adolescentes (ADOLESC) (n=10/grupo) expostos e não-expostos ao CA, desafiados com uma injeção de etanol 2,0g/kg (EtOH) no 24º dia do experimento. Os animais adultos tratados repetidamente com EtOH pareados e expostos ao CA, (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL) desenvolveram sensibilização comportamental ao EtOH, enquanto que os animais adolescentes que passaram por igual tratamento (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) desenvolveram tolerância. Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL não-exposto ao campo aberto (grupo SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

○ $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-expostos ao campo aberto (grupo SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

$p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-pareado ao campo aberto (grupo SAL-CA-SAL), do mesmo grupo de idade.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-pareado ao campo aberto (grupo SAL-CA-EtOH), do mesmo grupo de idade.

◆ $p < 0,05$ em relação aos grupos de diferente idade e igual tratamento.

2.2.2. Imuno-histoquímica para *c-Fos* e *Egr-1*

2.2.2.1. Córtex Pré-Frontal (CPF)

No 24º dia, depois de uma hora que os animais haviam recebido EtOH e sido expostos ao CA, realizaram-se os procedimentos para as reações de imuno-histoquímica. A figura 25A mostra a expressão de *c-Fos* no CPF. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou significantes diferenças para o fator idade [$F(9,40) = 16,61$, $p < 0,05$], para o fator tratamento [$F(9,40) = 18,09$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,40) = 10,31$, $p < 0,05$].

A análise estatística dos grupos de animais adultos revelou que a administração repetida de EtOH diminuiu a expressão de *c-Fos* no CPF no grupo de animais não-pareado e não-expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), quando comparados aos demais grupos.

Em relação aos animais adolescentes, os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADOLESC-SAL-CM-EtOH, ADOLESC-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram diminuição na expressão de *c-Fos* no CPF quando comparados aos grupos de animais tratados com SAL (grupos ADOLESC-SAL-CM-SAL e ADOLESC-SAL-CA-SAL), sendo que os camundongos tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram uma diminuição mais expressiva, ou seja, o número de núcleos marcados nesse grupo foi menor do que em todos os demais grupos de animais adolescentes.

As diferenças dependentes do fator idade mostraram que os animais tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram significativa diminuição na expressão de *c-Fos* quando comparados aos animais adultos que receberam o mesmo tratamento e

foram igualmente expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL). Diferenças semelhantes foram encontradas entre os animais dos grupos pré-tratados com EtOH, não-pareados e expostos ao CA (ADOLESC-SAL-CA-EtOH vs ADULTO-SAL-CA-EtOH).

A figura 25B mostra a expressão de *Egr-1* no CPF. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou significantes diferenças para o fator idade [$F(9,40) = 179,17$, $p < 0,05$], para o fato tratamento [$F(9,40) = 308,6$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,40) = 59,34$, $p < 0,05$].

A análise estatística dos grupos de animais adultos revelou que a administração repetida de EtOH (grupos ADULTO-SAL-CM-EtOH, ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADULTO-EtOH-CA-SAL) no CPF diminuiu a expressão de *Egr-1* quando da comparação com o ocorrido nos grupos de animais tratados repetidamente com SAL (grupos ADULTO-SAL-CM-SAL e ADULTO-SAL-CA-SAL).

Em relação aos grupos de animais tratados repetidamente durante a adolescência, a mesma análise estatística revelou que as diferenças intra-idade dos animais tratados com SAL ou EtOH durante adolescência foram semelhantes àquelas descritas para a expressão de *c-Fos*. No entanto, uma comparação inter-idade (adolescentes X adultos) mostrou que os grupos de animais tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência (tanto o grupo pareado e exposto ao CA - grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL, quanto o grupo não-pareado e exposto ao CA - grupo ADOLESC-SAL-CA-EtOH) apresentaram um menor número de núcleos marcados quando comparados aos grupos de animais adultos que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupos ADULTO-EtOH-CA-SAL e ADULTO-SAL-CA-EtOH).

A figura 26 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* no CPF, referentes às análises dos gráficos 25A e 25B.

Figura 25. Expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) no CPF de camundongos adultos (ADULTOS) ($n = 5/\text{grupo}$) e adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$) tratados durante 15 dias com o pré-tratamento específico designado para cada grupo e desafiados, no 24º dia, com etanol (2,0 g/kg). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL não-exposto ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

○ $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-expostos ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

$p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-pareado ao campo aberto (SAL-CA-SAL), do mesmo grupo de idade.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-pareado ao campo aberto (SAL-CA-EtOH), do mesmo grupo de idade.

◆ $p < 0,05$ em relação aos grupos de diferente idade e igual tratamento.

Figura 26. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no CPF de camundongos adultos (ADULTO) ($n = 5/\text{grupo}$) e adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$) tratados repetidamente durante 15 dias com tratamento específico designado para cada grupo. Os animais receberam uma injeção de etanol (2,0 g/kg) e, 6 dias após o tratamento repetido, foram sacrificados para posterior realização das reações de imuno-histoquímica para análise das expressões das proteínas *c-Fos* e *Egr-1*. A expressão de *c-Fos* e *Egr-1* diminuiu de animais adolescentes expostos ao CA após a administração de etanol (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) comparados ao respectivo grupo controle (grupo ADOLESC-SAL-CA-SAL). Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 μm .

2.2.2.2. *Córtex Motor (CoM)*

A figura 27A mostra a expressão de *c-Fos* no CoM. O teste estatístico ANOVA de duas vias também revelou existirem significantes diferenças para o fator idade [$F(9,40) = 35,35$, $p < 0,05$], para o fator tratamento [$F(9,40) = 120,98$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,40) = 14,21$, $p < 0,05$].

A análise estatística dos grupos de animais adultos revelou que a administração repetida de EtOH diminuiu a expressão de *c-Fos* no CoM no grupo de animais não-pareados e não-expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL) quando comparados aos demais grupos.

Em relação aos grupos de animais adolescentes, os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADOLESC-SAL-CM-EtOH, ADOLESC-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram diminuição na expressão de *c-Fos* no CoM quando comparados aos grupos de animais tratados repetidamente com SAL (grupos ADOLESC-SAL-CM-SAL e ADOLESC-SAL-CA-SAL), sendo que os camundongos tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência, pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL), apresentaram diminuição mais expressiva. O número de núcleos marcados nesse grupo foi menor do que nos demais grupos de animais adolescentes.

As diferenças dependentes do fator idade mostraram que os animais tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram significativa diminuição na expressão de *c-Fos* no CoM, quando comparados aos animais adultos que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL). Diferenças semelhantes foram encontradas entre os animais dos grupos pré-tratados com EtOH, não-pareados e expostos ao CA (grupos ADOLESC-SAL-CA-EtOH e ADULTO-SAL-CA-EtOH).

A figura 27B mostra a expressão de *Egr-1* no CoM. O teste estatístico ANOVA de duas vias também revelou existirem significantes diferenças para o fator idade [$F(9,40) = 7,20$, $p < 0,05$], para o fator tratamento [$F(9,40) = 73,41$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,40) = 7,57$, $p < 0,05$].

A análise estatística dos grupos de animais adultos revelou que a administração repetida de EtOH diminuiu a expressão de *Egr-1* no CoM no grupo de animais não-pareado e não-expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), quando comparados aos demais grupos.

Esta mesma análise revelou que as diferenças intra-idade, para a expressão da proteína *Egr-1* no CoM em relação aos animais tratados repetidamente com SAL ou EtOH durante a adolescência foram semelhantes àquelas descritas para a expressão de *c-Fos*. No entanto, uma comparação inter-idades (adolescentes X adultos) mostrou que os grupos de animais tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência, pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram menor número de núcleos marcados, quando comparados ao grupo de animais adultos que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupos ADULTO-EtOH-CA-SAL).

A figura 28 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* no CoM, referentes às análises dos gráficos 27A e 27B.

Figura 27. Expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) no CoM de camundongos adultos (ADULTOS) ($n = 5/\text{grupo}$) e adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$) tratados durante 15 dias com o pré-tratamento específico designado para cada grupo e desafiados, no 24º dia, com etanol (2,0 g/kg). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL não-exposto ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

○ $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-expostos ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

$p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-pareado ao campo aberto (SAL-CA-SAL), do mesmo grupo de idade.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-pareado ao campo aberto (SAL-CA-EtOH), do mesmo grupo de idade.

◆ $p < 0,05$ em relação aos grupos de diferente idade e igual tratamento.

Figura 28. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no CoM de camundongos adultos (ADULTO) (n = 5/grupo) e adolescentes (ADOLESC) (n = 5/grupo) tratados repetidamente durante 15 dias com tratamento específico designado para cada grupo. Os animais receberam uma injeção de etanol (2,0 g/kg) e, 6 dias após o tratamento repetido, foram sacrificados para posterior realização das reações de imunohistoquímica para análise das expressões das proteínas *c-Fos* e *Egr-1*. A expressão de *c-Fos* e *Egr-1* diminuiu de animais adolescentes expostos ao CA após a administração de etanol (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) quando comparados ao respectivo grupo controle (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL). Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 µm.

2.2.2.3. Núcleo Accumbens (NAc)

A expressão de *c-Fos* no NAc pode ser observada na figura 29A. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou significantes diferenças para o fator idade [$F(9,40) = 12,48$, $p < 0,05$], para o fator tratamento [$F(9,40) = 5,43$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,40) = 6,43$, $p < 0,05$].

A análise estatística referente aos grupos de animais adultos revelou que o efeito do EtOH sobre a expressão de *c-Fos* no NAc não apresentou alteração quando comparado ao ocorrido nos demais grupos. No entanto, apenas os animais adultos tratados repetidamente com SAL e expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL) apresentaram diminuição na expressão de *c-Fos* no NAc em relação aos animais adultos dos demais grupos.

Em relação aos grupos de animais tratados repetidamente durante a adolescência, os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADOLESC-SAL-CM-EtOH, ADOLESC-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram diminuição na expressão de *c-Fos* no NAc quando comparados aos grupos de animais tratados repetidamente com SAL (grupos ADOLESC-SAL-CM-SAL e ADOLESC-SAL-CA-SAL), sendo que os camundongos tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência, pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram uma diminuição mais expressiva, ou seja, o número de núcleos marcados para a proteína *c-Fos* nesse grupo foi menor do que nos demais grupos de animais adolescentes.

As diferenças dependentes do fator idade mostraram que os grupos de animais tratados repetidamente durante a adolescência com EtOH (tanto o grupo pareado e exposto ao CA – grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL, quanto o grupo não-pareado e exposto ao CA - grupo ADOLESC-SAL-CA-EtOH) apresentaram significativa diminuição na expressão de *c-Fos* no NAc quando comparados aos grupos de

animais adultos que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupos ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADULTO-EtOH-CA-SAL). Efeito oposto foi encontrado entre os animais dos grupos pré-tratados com SAL e expostos ao CA (grupos ADOLESC-SAL-CA-SAL e ADULTO-SAL-CA-EtOH), caso em que o grupo de animais adultos apresentou menor número de núcleos marcados para *c-Fos* em relação ao mesmo grupo de animais adolescentes.

A expressão de *Egr-1* no NAc pode ser observada na figura 29B. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou significantes diferenças para o fator idade [$F(9,40) = 62,38$, $p < 0,05$], para o fator tratamento [$F(9,40) = 140,16$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,40) = 32,21$, $p < 0,05$].

A análise estatística dos grupos de animais adultos revelou que a administração repetida de EtOH (grupos ADULTO-SAL-CM-EtOH, ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADULTO-EtOH-CA-SAL) no NAc diminuiu a expressão de *Egr-1* quando da comparação com o ocorrido nos grupos de animais tratados repetidamente com SAL (grupos ADULTO-SAL-CM-SAL e ADULTO-SAL-CA-SAL).

Em relação aos grupos de animais tratados repetidamente durante a adolescência, a mesma análise estatística revelou que as diferenças intra-idade dos animais tratados com SAL ou EtOH foram semelhantes àsquelas descritas para a expressão de *c-Fos* no NAc. No entanto, uma comparação inter-idade (adolescentes X adultos) mostrou que os grupos de animais tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência (tanto o grupo pareado e exposto ao CA - grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL quanto o grupo não-pareado e exposto ao CA - grupo ADOLESC-SAL-CA-EtOH) apresentaram um menor número de núcleos marcados quando comparados aos grupos de animais adultos que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupos ADULTO-EtOH-CA-SAL e ADULTO-SAL-CA-EtOH).

A figura 30 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* no NAc, referente às análises dos gráficos 29A e 29B.

Figura 29. Expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) no NAc de camundongos adultos (ADULTOS) ($n = 5/\text{grupo}$) e adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$) tratados durante 15 dias com o pré-tratamento específico designado para cada grupo e desafiados, no 24º dia, com etanol (2,0 g/kg). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL não-exposto ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

○ $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-expostos ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

$p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-pareado ao campo aberto (SAL-CA-SAL), do mesmo grupo de idade.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-pareado ao campo aberto (SAL-CA-EtOH), do mesmo grupo de idade.

◆ $p < 0,05$ em relação aos grupos de diferente idade e igualmente tratamento.

Figura 30. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no NAc de camundongos adultos (ADULTO) (n = 5/grupo) e adolescentes (ADOLESC) (n = 5/grupo) tratados repetidamente durante 15 dias com tratamento específico designado para cada grupo. Os animais receberam uma injeção de etanol (2,0 g/kg) e, 6 dias após o tratamento repetido, foram sacrificados para posterior realização das reações de imuno-histoquímica para análise das expressões das proteínas *c-Fos* e *Egr-1*. A expressão de *c-Fos* e *Egr-1* diminuiu de animais adolescentes expostos ao CA após a administração de etanol (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) quando comparado ao respectivo grupo controle (grupo ADOLESC-SAL-CA-SAL). Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 µm.

2.2.2.4. Área Dorsal da Amígdala (ADA)

Na figura 31A, podemos observar a expressão de *c-Fos* na ADA. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não existirem diferenças significantes para o fator idade. No entanto, revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(9,40) = 33,96$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,40) = 5,25$, $p < 0,05$].

Uma análise posterior dos dados estatísticos referentes aos grupos de animais adultos revelou que os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADULTO-SAL-CM-EtOH, ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADULTO-EtOH-CA-SAL) e o grupo tratado com SAL e exposto ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL) apresentaram diminuição no número de núcleos marcados para a proteína *c-Fos* na ADA quando comparados ao grupo de animais tratados repetidamente com SAL e não-expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CM-SAL).

Em relação à análise realizada para os grupos de animais adolescentes, os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADOLESC-SAL-CM-EtOH, ADOLESC-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-EtOH-CA-SAL) e o grupo tratado com SAL e exposto ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CA-SAL) apresentaram diminuição na expressão de *c-Fos* na ADA quando comparados ao grupo de animais tratados repetidamente com SAL e não-expostos ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CM-SAL). No entanto, o grupo de camundongos tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência, pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentou diminuição mais expressiva, ou seja, com menor número de núcleos marcados em relação aos demais grupos de animais adolescentes.

Em relação às diferenças inter-idade, esta mesma análise estatística revelou que o grupo de animais tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentou significativa diminuição na expressão de *c-Fos* na ADA quando comparado ao grupo de animais adultos que

receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL).

Na figura 31B, podemos observar a expressão de *Egr-1* na ADA. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não existirem significantes diferenças para o fator interação. No entanto, este mesmo teste revelou existirem significantes diferenças para o fator idade [$F(9,40) = 12,38$, $p < 0,05$] e para o fato tratamento [$F(9,40) = 11,1$, $p < 0,05$].

Uma análise posterior dos grupos de animais adultos revelou que os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADULTO-SAL-CM-EtOH, ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADULTO-EtOH-CA-SAL) apresentaram diminuição na expressão de *Egr-1* no ADA quando comparados aos grupos de animais tratados repetidamente com SAL (grupos ADULTO-SAL-CM-SAL e ADULTO-SAL-CA-SAL). No entanto, o grupo de camundongos adultos tratados repetidamente com EtOH, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), apresentaram diminuição mais expressiva, sendo que este grupo apresentou menor número de núcleos marcados do que os demais grupos de animais adultos.

A análise dos grupos de animais adolescentes também revelou que os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADOLESC-SAL-CM-EtOH, ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram diminuição na expressão de *Egr-1* no ADA quando comparados aos grupos de animais tratados repetidamente com SAL (grupos ADOLESC-SAL-CM-SAL e ADOLESC-SAL-CA-SAL).

As diferenças inter-idade, para a expressão da proteína *Egr-1* na ADA, mostraram que os grupos de animais adultos tratados repetidamente com EtOH (tanto o grupo pareado e exposto ao CA – grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL quanto o grupo não-pareado e exposto ao CA - ADULTO-EtOH-CA-SAL) apresentaram menor número de núcleos marcados para a proteína *Egr-1* quando comparados aos grupos

de animais adolescentes que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-EtOH-CA-SAL).

A figura 32 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* na ADA, referente às análises dos gráficos 31A e 31B.

A

Área Dorsal da Amígdala (*c-Fos*)

B

Área Dorsal da Amígdala (*Egr-1*)

Figura 31. Expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) na ADA de camundongos adultos (ADULTOS) ($n = 5/\text{grupo}$) e adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$) tratados durante 15 dias com o pré-tratamento específico designado para cada grupo e desafiados, no 24º dia, com etanol (2,0 g/kg). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL não-exposto ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

○ $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-expostos ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

$p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-pareado ao campo aberto (SAL-CA-SAL), do mesmo grupo de idade.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-pareado ao campo aberto (SAL-CA-EtOH), do mesmo grupo de idade.

◆ $p < 0,05$ em relação aos grupos de diferente idade e igual tratamento.

Figura 32. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no ADA de camundongos adultos (ADULTO) (n = 5/grupo) e adolescentes (ADOLESC) (n = 5/grupo) tratados repetidamente durante 15 dias com tratamento específico designado para cada grupo. Os animais receberam uma injeção de etanol (2,0 g/kg) e, 6 dias após o tratamento repetido, foram sacrificados para posterior realização das reações de imunohistoquímica para análise das expressões das proteínas *c-Fos* e *Egr-1*. A expressão de *c-Fos* e *Egr-1* diminuiu de animais adolescentes expostos ao CA após a administração de etanol (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) quando comparado ao respectivo controle (grupo ADOLESC-SAL-CA-SAL). Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 µm.

2.2.2.5. Área Ventral da Amígdala (AVA)

Já na figura 33A, pode ser observada a expressão de *c-Fos* na AVA. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não existirem diferenças significantes para o fator idade. No entanto, revelou significantes diferenças para o fator tratamento [$F(9,40) = 18,69$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,40) = 3,65$, $p < 0,05$].

Uma análise posterior dos dados estatísticos referentes aos grupos de animais adultos revelou que os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADULTO-SAL-CM-EtOH, ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADULTO-EtOH-CA-SAL) e o grupo tratado com SAL e exposto ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL) apresentaram diminuição no número de núcleos marcados para a proteína *c-Fos* na AVA quando comparados ao grupo de animais tratados repetidamente com SAL e não expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CM-SAL).

Em relação à análise realizada para os grupos de animais adolescentes, os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADOLESC-SAL-CM-EtOH, ADOLESC-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-EtOH-CA-SAL) e o grupo tratado com SAL e exposto ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CA-SAL) apresentaram diminuição no número de núcleos marcados para a proteína *c-Fos* na AVA, quando comparados ao grupo de animais tratados repetidamente com SAL e não-expostos ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CM-SAL). No entanto, o grupo de camundongos tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência, pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL), apresentaram diminuição mais expressiva, ou seja, com menor número de núcleos marcados em relação aos demais grupos de animais adolescentes.

Em relação às diferenças inter-idade, esta mesma análise estatística revelou que o grupo de animais tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentou significativa diminuição

na expressão de *c-Fos* na AVA quando comparado ao grupo de animais adultos que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL).

Já na figura 33B, observamos a expressão de *Egr-1* na AVA. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não existirem significantes diferenças para o fator interação. No entanto, este mesmo teste relevou existirem significantes diferenças para o fator idade [$F(9,40) = 9,02$, $p < 0,05$] e para o fator tratamento [$F(9,40) = 7,53$, $p < 0,05$].

Em relação à análise realizada para os grupos de animais adultos, os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADULTO-SAL-CM-EtOH, ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADULTO-EtOH-CA-SAL) e o grupo tratado com SAL e exposto ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL) apresentaram diminuição no número de núcleos marcados para a proteína *Egr-1* na AVA quando comparados ao grupo de animais tratados repetidamente com SAL e não expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CM-SAL). No entanto, o grupo de animais adultos tratados repetidamente com EtOH, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), apresentaram diminuição mais expressiva, ou seja, com menor número de núcleos marcados para a proteína *Egr-1* em relação aos demais grupos de animais adultos.

A análise dos grupos de animais adolescentes também revelou que os grupos tratados repetidamente com EtOH (grupos ADOLESC-SAL-CM-EtOH, ADULTO-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-EtOH-CA-SAL) e o grupo tratado repetidamente com SAL e exposto ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL) apresentaram diminuição na expressão de *Egr-1* na AVA quando comparados ao grupo de animais tratados repetidamente com SAL e não-expostos ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CM-SAL). O grupo de animais tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência (grupo

ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentou menor número de núcleos marcados para *Egr-1* na AVA quando comparado aos demais grupos de animais adolescentes.

Os dados estatísticos também revelaram diferenças inter-idade para a expressão da proteína *Egr-1* na AVA, mostrando que o grupo de animais adultos tratados repetidamente com EtOH, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL) apresentou significativa diminuição na expressão de *Egr-1* na ADA quando comparado ao grupo de animais adolescentes que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL).

Em relação às diferenças inter-idade, esta mesma análise estatística revelou que o grupo de animais adultos tratados repetidamente com EtOH, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), apresentou significativa diminuição na expressão de *Egr-1* na AVA quando comparado ao grupo de animais adolescentes que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL).

A figura 34 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* na AVA, referentes às análises dos gráficos 33A e 33B.

Figura 33. Expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) na AVA de camundongos adultos (ADULTOS) ($n = 5/\text{grupo}$) e adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$) tratados durante 15 dias com o pré-tratamento específico designado para cada grupo e desafiados, no 24º dia, com etanol (2,0 g/kg). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL não-exposto ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

○ $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-expostos ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

$p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-pareado ao campo aberto (SAL-CA-SAL), do mesmo grupo de idade.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-pareado ao campo aberto (SAL-CA-EtOH), do mesmo grupo de idade.

◆ $p < 0,05$ em relação aos grupos de diferente idade e igual tratamento.

Figura 34. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no AVA de camundongos adultos (ADULTO) ($n = 5/\text{grupo}$) e adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$) tratados repetidamente durante 15 dias com tratamento específico designado para cada grupo. Os animais receberam uma injeção de etanol (2,0 g/kg) e, 6 dias após o tratamento repetido, foram sacrificados para posterior realização das reações de imuno-histoquímica para análise das expressões das proteínas *c-Fos* e *Egr-1*. A expressão de *c-Fos* e *Egr-1* diminuiu de animais adolescentes expostos ao CA após a administração de etanol (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) quando comparado ao respectivo controle (grupo ADOLESC-SAL-CA-SAL). Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 μm .

2.2.2.6. Hipocampo (HIP)

A expressão de *c-Fos* no HIP está representada na figura 35A. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não existirem significantes diferenças para o fator idade. No entanto, este mesmo teste estatístico revelou existirem significantes diferenças para o fator tratamento [$F(9,40) = 5,55$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,40) = 7,47$, $p < 0,05$].

A análise estatística dos grupos de animais adultos revelou que a administração repetida de EtOH diminuiu a expressão de *c-Fos* no HIP no grupo de animais não-pareados e não expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL) quando comparados aos demais grupos.

No entanto, a análise realizada para os grupos de animais tratados repetidamente com SAL ou EtOH durante a adolescência revelou não existirem diferenças significativas na expressão de *c-Fos* no HIP.

Em relação às diferenças inter-idade, a análise mostrou que os grupos de animais adultos tratados repetidamente com EtOH, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), apresentaram significativa diminuição na expressão de *c-Fos* no HIP quando comparados ao grupo de animais adolescentes que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL).

Finalmente, na figura 35B, está representada a expressão de *Egr-1* no HIP. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou significantes diferenças para o fator idade [$F(9,40) = 10,07$, $p < 0,05$], para o fator tratamento [$F(9,40) = 202,43$, $p < 0,05$] e para o fator interação [$F(9,40) = 54,95$, $p < 0,05$].

A análise estatística dos grupos de animais adultos revelou que a administração repetida de EtOH (grupos ADULTO-SAL-CM-EtOH, ADULTO-SAL-CA-

EtOH e ADULTO-EtOH-CA-SAL) no HIP diminuiu a expressão de *Egr-1* quando da comparação ao ocorrido nos grupos de animais tratados repetidamente com SAL (grupos ADULTO-SAL-CM-SAL e ADULTO-SAL-CA-SAL).

A mesma análise estatística revelou que as diferenças intra-idade dos animais tratados repetidamente durante a adolescência com EtOH foram semelhantes às descritas para expressão *c-Fos* no HIP de animais adultos.

Uma comparação inter-idade (adolescentes X adultos) mostrou que os grupos de animais tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência, pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL), apresentaram menor número de núcleos marcados, quando comparados ao grupo de animais adultos que receberam o mesmo tratamento e foram igualmente expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL).

A figura 36 mostra as imagens de *c-Fos* e *Egr-1* no HIP referentes às análises dos gráficos 35A e 35B.

Figura 35. Expressões das proteínas *c-Fos* (A) e *Egr-1* (B) no HIP de camundongos adultos (ADULTOS) ($n = 5/\text{grupo}$) e adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$) tratados durante 15 dias com o pré-tratamento específico designado para cada grupo e desafiados, no 24º dia, com etanol (2,0 g/kg). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

□ $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL não-exposto ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

○ $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-expostos ao campo aberto (SAL-CM-SAL), do mesmo grupo de idade.

$p < 0,05$ em relação ao grupo SAL-pareado ao campo aberto (SAL-CA-SAL), do mesmo grupo de idade.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH não-pareado ao campo aberto (SAL-CA-EtOH), do mesmo grupo de idade.

◆ $p < 0,05$ em relação aos grupos de diferente idade e igual tratamento.

Figura 36. Fotomicrografias de secções coronais do cérebro mostrando as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* no HIP de camundongos adultos (ADULTO) (n = 5/grupo) e adolescentes (ADOLESC) (n = 5/grupo) tratados repetidamente durante 15 dias com tratamento específico designado para cada grupo. Os animais receberam uma injeção de etanol (2,0 g/kg) e, 6 dias após o tratamento repetido, foram sacrificados para posterior realização das reações de imunohistoquímica para análise das expressões das proteínas *c-Fos* e *Egr-1*. A expressão de *c-Fos* e *Egr-1* diminuiu de animais adolescentes expostos ao CA após a administração de etanol (grupo ADOLESC-*EtOH*-CA-SAL) quando comparado ao respectivo controle (grupo ADOLESC-SAL-CA-SAL). Todas as imagens apresentam aumento de 100 vezes. A escala da barra é de 250 μ m.

2.2.3. Dosagem da Alcoolemia

A dosagem da alcoolemia está representada na figura 33. A alcoolemia foi realizada no 24^o. dia nos grupos de animais tratados com SAL ou EtOH entre os dias 3 e 17 do experimento, após uma injeção de etanol. O teste estatístico ANOVA de duas vias revelou não existir significantes diferenças para o fator idade [$F(3,20) = 2,867$, $p > 0,05$], para o fator tratamento [$F(3,20) = 0,874$, $p > 0,05$] e para o fator interação [$F(3,20) = 0,3114$, $p > 0,05$]. Os resultados sugerem que as diferenças comportamentais ou neuroquímicas observadas após administração de etanol, no 24^o. dia de tratamento, não são devidas a diferenças metabólicas do tratamento repetido com etanol durante a adolescência ou vida adulta.

Figura 33. Concentração de etanol no sangue de camundongos adultos (ADULTOS) ($n = 5/\text{grupo}$) e adolescentes (ADOLESC) ($n = 5/\text{grupo}$) tratados durante 15 dias com o pré-tratamento específico designado para cada grupo e desafiados, no 24º dia, com etanol (2,0 g/kg). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.

2.3. DISCUSSÃO PARCIAL

O objetivo da segunda série de experimentos foi estudar a influência do condicionamento ambiental na sensibilização comportamental induzida pelo etanol em camundongos adolescentes e adultos, e as possíveis regiões cerebrais envolvidas nesse processo. Foram medidas as expressões dos genes precoces: *c-Fos* e *Egr-1*.

A sensibilização comportamental a uma droga pode ser fortemente influenciada pelo pareamento da droga com as pistas ambientais (sensibilização dependente de contexto). De acordo com Schramm-Sapota e colaboradores (2004), podem existir diferenças na sensibilização comportamental à cocaína associada a pistas ambientais para adultos e adolescentes. Dessa forma, foi observado pelos pesquisadores citados acima que existe um comportamento de aversão não-específica em adolescentes quando expostos aos aparatos de testes comportamentais, que é aliviado quando estes animais recebem um pré-tratamento de cocaína no aparato. Porém, isso não acontece com animais adolescentes que receberam a cocaína na caixa moradia e depois foram expostos ao aparato.

Grande diversidade de estudos envolvendo condicionamento Pavloviano mostram a importância das pistas ambientais no desenvolvimento dos efeitos das drogas de abuso, incluindo o etanol. Dessa maneira, alguns estímulos ambientais poderiam ganhar um poderoso controle sobre as alterações neurais já ocorridas pela administração da droga e influir no comportamento. Entretanto, o mecanismo pelo qual o condicionamento interfere na sensibilização condicionada ainda é obscuro (RUNKORG et al., 2006; TODTENKOPF e CARLEZON, 2006; CHINEN et al., 2006; SCHROEDER et al., 2001; CAREY GUI, 1998).

Tem-se mostrado que pistas e sinalizações ambientais podem promover estímulos condicionados que resultam em respostas condicionadas semelhantes aos efeitos das drogas quando estas estão pareadas ao ambiente, provocando a potencialização no desenvolvimento da sensibilização comportamental (CAMARINI et al., 2000; COSTA et al., 2001; CHINEN et al., 2005). O pareamento de drogas de abuso com o aparelho de condicionamento ambiental, no nosso caso o campo aberto, parece ser de alta importância para o desenvolvimento da sensibilização comportamental (FRUSSA-FILHO et al., 2004). Muitos autores vêm demonstrando que a administração de drogas de abuso desassociada de pistas ambientais leva muito mais tempo para promover a sensibilização comportamental. Em muitos casos, nem mesmo chega a ocorrer o desenvolvimento deste fenômeno (ARAUJO et al., 2005; CHINEN et al., 2006; ARAUJO et al., 2006).

Dentre tantos estudos, podemos exemplificar um realizado por Alleweireldt e colaboradores (2001), em que animais foram submetidos a várias sessões de auto-administração de cocaína ou salina. Tais soluções (cocaína e salina) eram indistinguíveis pela cor, porém em cada ambiente havia um aroma bastante característico que estava sinalizando a presença da droga ou não. Depois de alguns dias de tratamento, estes animais foram submetidos a ambientes de aroma neutro em que o reforço não estava disponível em nenhum momento. No ambiente neutro, o comportamento em busca da droga foi diminuindo e até mesmo extinto com o passar dos dias. No entanto, quando estes animais eram novamente apresentados ao ambiente com o aroma característico da presença da droga, porém sem a droga, permitiu o reaparecimento daquele comportamento estereotipado em busca pela droga.

O desenvolvimento dessa atividade condicionada, ou seja, associada às pistas ambientais, também traz embasamentos explicativos para ajudar-nos a elucidar o

fenômeno de sensibilização comportamental associada à administração repetida de psicoestimulantes (PERT et al., 1990). Sendo assim, muitos estudos clínicos envolvendo dependentes revelam que a exposição destes indivíduos a pistas ambientais estritamente relacionadas com o uso de drogas de abuso pode resultar no aumento pelo desejo em consumir a droga. Esses condicionamentos estão relacionados às recaídas.

Dessa maneira, em uma primeira análise de nossos resultados nos focamos em discutir a participação do condicionamento ambiental no desenvolvimento da sensibilização comportamental. Nesse sentido, os resultados mostraram que os animais adultos tratados repetidamente com etanol, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), desenvolveram sensibilização comportamental, uma vez que a atividade locomotora desses animais aumentou gradativamente com o decorrer do tratamento. Já aqueles tratados repetidamente com etanol, não-pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-EtOH), ou mesmo os não-pareados e não-expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CM-EtOH), não desenvolveram sensibilização.

Fenômeno oposto foi observado no grupo de animais adolescentes. Ou seja, os animais adolescentes tratados repetidamente com etanol, pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL), desenvolveram tolerância comportamental, enquanto que aqueles tratados com etanol, não pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CA-EtOH), desenvolveram sensibilização quando comparados ao grupo tratado repetidamente com salina e exposto ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CA-SAL).

É interessante observar que os animais adolescentes tratados repetidamente com salina, expostos ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CA-SAL), apresentaram diminuição significativa na atividade locomotora quando comparados aos animais do

grupo tratado com salina e não-exposto ao CA (grupo ADOLESC-SAL-CM-SAL), sugerindo um acentuado efeito da habituação nesses animais. O contexto ambiental parece não exercer influência sobre a indução do fenômeno de tolerância comportamental em camundongos adolescentes. Essa diferença entre os grupos controles-salina não foi detectada no grupo de adultos. Além disso, quando comparamos adolescentes com adultos, constatamos que os animais adolescentes tratados com salina e expostos ao CA (grupo ADOLEC-SAL-CA-SAL) apresentaram frequência de locomoção menor comparada com a dos animais adultos que receberam o mesmo tratamento (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL). Esses resultados sugerem que os animais adolescentes apresentaram uma habituação ao ambiente mais acentuada do que os adultos. É provável que a não observância da sensibilização nos animais adolescentes seja decorrente de uma habituação pronunciada desses animais ao ambiente e não de um fenômeno de tolerância. Os resultados comportamentais obtidos no teste de condicionamento, quando os animais receberam uma injeção de salina no 17º dia e foram expostos ao campo aberto, comprovam essa hipótese. De fato, os animais adolescentes tratados com etanol e expostos ao campo aberto apresentaram menor atividade locomotora comparados aos adultos do mesmo grupo. Entretanto, a locomoção desses animais foi significativamente superior àquela dos animais tratados com salina (SAL-CA-SAL). Ou seja, o grupo de adolescentes EtOH-CA-SAL apresentou um efeito de condicionamento dos efeitos estimulantes do etanol às pistas ambientais, assim como os adultos, mas de menor magnitude. Sabe-se que no SNC não existe um receptor específico para atuação do etanol. Sendo assim, grande parte dos efeitos centrais do etanol é explicada pela interação com diferentes sistemas de neurotransmissão, incluindo o dopaminérgico e o gabaérgico.

A depressão central induzida pelo etanol está associada com mecanismos gabaérgicos (ALLAN e HARRIS, 1987). O etanol interage com um número de canais iônicos dependentes de ligante, como o GABA, particularmente em áreas cerebrais específicas envolvidas com reforço (LILJEQUIST e ENGEL, 1982). Especificamente, o etanol modula o complexo receptor GABA alostericamente e abre os canais de cloreto, hiperpolarizando a membrana ou, pelo menos, potencializando a hiperpolarização induzida pelo GABA. Os sítios envolvidos nos componentes gabaérgicos responsáveis pelas propriedades reforçadoras do etanol são a AVTM, a AMIG, o NAc e o globo pálido. A administração crônica de etanol suficiente para produzir dependência e aumento do consumo de etanol está associada com um aumento da liberação de GABA na amígdala e aumento da sensibilidade a agonistas gabaérgicos. Um dos aspectos motivacionais da dependência ao álcool reside nas propriedades reforçadoras negativas relacionados com alívio de um estado afetivo negativo associado com a dependência e com a retirada da droga.

Já a base neuroquímica da ação estimulante do etanol é voltada para o sistema de neurotransmissão catecolaminérgico. Um grande número de estudos mostram que o etanol sistêmico aumenta a liberação de DA no Nac (DI CHIARA e IMPERATO, 1985; IMPERATO e DI CHIARA, 1986; YIM e GONZÁLES, 2000; YIM et al., 2000; YOSHIMOTO et al., 1992, 1996). Injetado localmente no NAc, o etanol causa uma liberação dose-dependente de DA. Sugere-se que a liberação de DA no Nac seja mediada via AVTM (SAMSON et al., 1997). Esse aumento seria ocasionado por uma ação indireta via receptores gabaérgicos da AVTM (COWEN e LAWRENCE, 1999). O etanol facilita a liberação de DA no NAc, aumentando a taxa de disparo de neurônios dopaminérgicos na AVTM (GESSA et al., 1985). As evidências mostram que a excitação de neurônios dopaminérgicos na AVTM pelo etanol parece ser devida à redução de correntes de potássio, levando a uma atenuação da pós-

hiperpolarização após potenciais de ação espontâneos (BRODIE et al., 1999). Além disso, a estimulação de receptores gabaérgicos encontrados em interneurônios gabaérgicos na AVTM por baixas doses de etanol desinibem a atividade dopaminérgica neuronal (MEREU e GESSA, 1985).

A interface entre o efeito estimulante e depressor do etanol parece ser bastante tênue e depende de vários fatores, como: dose, via de administração, sexo, taxa metabólica, etc. Dessa forma, o efeito depressor observado nos animais adolescentes tratados repetidamente com doses baixas de etanol, pareados ao CA, pode estar relacionado com as diferenças neuroquímicas e neuroanatômicas dos sistemas gabaérgico e dopaminérgico entre adolescentes e adultos.

Inclusive, receptores GABA que contêm a subunidade δ são mais sensíveis ao etanol do que outros subtipos (WALLNER et al., 2003). Esse subtipo tem um papel importante nos efeitos amnésicos e de incoordenação motora mediados pelo etanol (HANCHAR et al., 2005). Adolescentes são mais sensíveis aos efeitos do etanol sobre a memória do que adultos (WHITE e AWARTZWELDER, 2005). Experimentos *in vitro* têm demonstrado que o etanol inibe a LTP mais acentuadamente em slices hipocâmpais de adolescentes (PYAPALI et al. 1999). Recentemente, Fleming e cols (2007) mostraram, em slices hipocâmpais, que a corrente tônica mediada por receptores gabaérgicos extrasinápticos é maior em células granulares do giro denteado de animais adultos do que naquelas de adolescentes, e que 30mM de etanol aumentam a corrente tônica inibitória mais pronunciadamente em células de adolescentes do que de adultos. É possível que esse aumento mais poderoso na corrente tônica inibitória, verificada no giro denteado de ratos adolescentes, contribua para uma maior vulnerabilidade dos adolescentes ao prejuízo de memória induzido pelo etanol. Dessa forma, poderíamos sugerir que a ausência de sensibilização comportamental ao etanol nos adolescentes expostos de forma pareada ao CA tenha

sido devida a um prejuízo de memória induzido pelo etanol, se considerarmos a importância da aprendizagem associativa para o desenvolvimento do fenômeno.

O fenômeno de condicionamento foi bastante expressivo para os animais adultos que eram expostos de forma pareada ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL). Isso ficou evidente quando os camundongos adultos tratados com etanol, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), apresentaram, após a injeção desafio de salina, uma atividade locomotora maior do que aquela apresentada por camundongos igualmente tratados com etanol, porém não pareados ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-EtOH) e aqueles tratados com salina (grupo ADULTO SAL-CA-SAL). Esses resultados mostram que ocorreu a associação entre a estimulação locomotora provocada pela droga e o CA onde fazíamos a administração da droga.

Em resumo, os dados sugerem o desenvolvimento de condicionamento Pavloviano tanto para adultos quanto para adolescentes.

Esses dados são consistentes com relatos que mostram que animais adolescentes exibem sensibilização à cocaína bastante reduzida ou até mesmo tolerância quando comparados com adultos (LAVIOLA et al., 1995; COLLINS e IZENWASSER 2002). Duas hipóteses poderiam explicar esses achados. A primeira seria o prejuízo orgânico geral causado pelo tratamento repetido nestes animais, também observado em indivíduos alcoólicos (VALLES et al., 2004; KOVACS e JERRELLS, 2004; URBANO e FERNANDEZ, 2004; OTANI et al., 2005). Tal debilidade orgânica talvez possa ser mais severa no animal adolescente, fazendo com que ele se locomova menos.

Uma outra hipótese seria com relação aos efeitos ocasionados pela administração repetida de EtOH na atividade de enzimas microssomais. Animais tratados repetidamente com EtOH durante a adolescência poderiam ter uma atividade enzimática diferenciada dos animais adultos. No entanto, essa hipótese foi

descartada, uma vez que não houve diferença na concentração de etanol sangüínea entre animais adultos e adolescentes desafiados com EtOH no 24º dia nos grupos de animais pré-tratados com SAL ou EtOH. A diminuição da atividade locomotora observada nos adolescentes pode ser decorrente da imaturidade do SNC desses animais. Nos adolescentes, o CPF ainda está em desenvolvimento e esta região está envolvida no desenvolvimento da sensibilização (QUADROS et al., 2002; TZSCHENTKE, 2001). Por exemplo, tanto antagonistas dopaminérgicos quanto lesões no CPF são capazes de inibir a sensibilização a drogas de abuso em animais adultos (CORNISH et al., 2001).

Nesse trabalho, procuramos abordar tanto a indução quanto a expressão da sensibilização comportamental.

A indução da sensibilização está ligada a uma subsensibilidade de auto-receptores dopaminérgicos do tipo D2 localizados nos corpos celulares dopaminérgicos da AVTM, enquanto que a expressão (mudanças comportamentais duradouras) estaria envolvida com o aumento da liberação de DA no NAc com conseqüente superestimulação de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos D1 (WOLF et al., 1993; KALIVAS e STEWART, 1991). A região dopaminérgica mesolímbica-cortical está associada à circuitaria implicada nos processos de recompensa (SOMMER et al., 2006; VOLLM et al., 2004; BRODIE, 2002; ROSSETTI et al., 1993a), atribuindo valores adaptativos (BEVINS e PALMATIER, 2004; Di CHIARA, 1999) ou salientando incentivos para vários tipos de estímulos (FRANKEN et al., 2005; KALIVAS e VOLKOW, 2005) que se traduzem em estímulos motivacionais dentro de comportamentos adaptativos (MATTHEWS et al., 1999). O circuito da recompensa também relaciona-se com os sistemas sensoriais e motores para facilitar a flexibilidade de uma resposta (DURSTEWITZ et al., 1999; DERRYBERRY e TUCKER, 1990). Foi sugerido que o NAc apresenta,

particularmente, importante função na constituição de um componente central envolvido no “circuito da motivação”, servindo para integrar o estado motivacional de recompensa de diversas estruturas límbicas e convergir estas informações para o sistema motor (McFARLAND et al., 2004; SHIPPENBERG et al., 2001; JOHNSON et al., 1996). Sendo assim, o NAc é considerado uma estrutura de interface entre o sistema límbico e o sistema motor (DAVID et al., 2005; McFARLAND et al., 2004; McFARLAND e KALIVAS, 2001; JOHNSON et al., 1996), podendo influenciar no processamento cortical de muitos estímulos sensoriais (FLATSCHER-BADER et al., 2006). O NAc recebe uma grande quantidade de estímulos excitatórios, muitos dos quais são derivados do CPF e de várias regiões límbicas do cérebro que modulam a maquinaria básica biológica e os estados motivacionais (PEPER et al., 2006). Aferências límbicas glutamatérgicas de regiões como AMIG, HIP e CPF convergem para o NAc, de onde partem eferências para o PV, núcleo mediodorsal do tálamo e CPF (STEKETEE, 2003). Além disso, o NAc recebe densas vias inibitórias dopaminérgicas da AVTM que podem também influenciar as informações límbicas que chegam a ele (WOLF et al., 1993; KALIVAS & STEWART, 1991), com aumento da transmissão dopaminérgica que, presumivelmente, aumenta o ganho de informação através do “circuito da motivação”. Toda essa atividade do NAc, se deduz, é objeto de controle do CPF (DAVID et al., 2005; McFARLAND et al., 2004; McFARLAND e KALIVAS, 2001; JOHNSON et al., 1996), estrutura que ainda está em processo de maturação durante a adolescência.

Dessa forma, as drogas de abuso podem induzir, no adolescente, respostas neuroquímicas diferenciadas, que podem alterar a resposta comportamental à droga.

É claro que muitos processos neuronais são de grande importância em respostas a drogas de abuso. Desse modo, no NAc (SCHRAMM et al., 2002) e no estriado dorsal (PARTRIDGE et al., 2000), pelo menos uma forma de plasticidade

sináptica, a potencialização a longo prazo, é mais facilmente observada em cérebro de roedores adolescentes do que em adultos.

A principal evidência relacionada ao experimento 2 vem a ser a comprovação de que interações ambientais, de características associativas ou não, podem modificar substancialmente o comportamento de animais tratados repetidamente com etanol. Nossos resultados demonstraram que o pareamento entre os efeitos farmacológicos do etanol e um ambiente específico promoveu uma resposta estimulante motora condicionada bastante evidente em camundongos adultos. Já em adolescentes, esse efeito foi mais modesto. Assim, nós demonstramos que a administração repetida de EtOH em adolescentes pode apresentar propriedades comportamentais diferentes daquelas observadas em adultos.

As principais evidências comportamentais podem ser resumidas nos seguintes itens:

- A administração repetida de etanol pareada ao campo aberto induziu um aumento progressivo da atividade locomotora em animais adultos, conhecido por sensibilização comportamental. O fenômeno não foi evidenciado em animais adultos tratados repetidamente com etanol na ausência de pareamento da droga com o ambiente.

- A administração repetida de etanol pareada ao campo aberto diminuiu a atividade locomotora em animais adolescentes, não sendo observada sensibilização comportamental. Esse efeito pode ser decorrente de a) tolerância aos efeitos locomotores induzidos pelo etanol, b) efeito depressor do etanol induzido pela ação gabaérgica, c) prejuízo na aprendizagem associativa dos efeitos do etanol ao ambiente.

A expressão de alguns fatores de transcrição vem sendo utilizada para mapear o desenvolvimento da sensibilização comportamental a várias drogas de abuso.

Assim, este trabalho analisou a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* em várias regiões cerebrais envolvidas no circuito da recompensa em adultos e adolescentes expostos agudamente e repetidamente ao etanol. É sabido que a exposição repetida a drogas de abuso ativam o CREB em muitas regiões encefálicas (NESTLER, 2004).

O *c-Fos* apresenta uma expressão basal relacionada aos processos fisiológicos que ocorrem constantemente (CURRAN e MORGAN, 1985; DRAGNOW e ROBERTSON, 1987; MORGAN e CURRAN, 1988). No tratamento agudo com EtOH ocorreu um aumento na expressão de *c-Fos* e *Egr-1* em CPF, CoM, NAc, ADA, AVA e HIP, indistintamente em adultos e adolescentes. No que concerne à sensibilização comportamental ao efeito estimulante locomotor do EtOH pareado a pistas ambientais, constatamos um importante envolvimento das pistas ambientais na expressão das proteínas *c-Fos* e *Egr-1*.

Enquanto que os animais adultos tratados repetidamente com etanol, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), não apresentaram alteração na expressão de *c-Fos* no CPF quando comparados aos animais que foram tratados repetidamente com salina e igualmente expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL), os animais adolescentes, desse mesmo grupo, tiveram uma diminuição na expressão da proteína *c-Fos* nessa região, sugerindo tolerância a esse efeito. Um resultado semelhante foi observado no NAc, sistema neuronal de integração de informações que guia respostas comportamentais baseadas no estímulo condicionado Pavloviano (BAXTER et al., 2000). Grande parte da atividade do NAc está sujeita ao controle do CPF (DAVID et al., 2005; McFARLAND et al., 2004; McFARLAND e KALIVAS, 2001; JOHNSON et al., 1996). Ainda mais, o NAc recebe muitas aferências excitatórias do CPF, bem como de muitas regiões cerebrais límbicas (STEKETEE, 2003; WOLF al., 1993; KALIVAS e STEWART, 1991). Esses resultados confirmam outros da literatura, que mostram que a estimulação da via

mesolímbica é essencial para o desenvolvimento da sensibilização. A ausência do efeito de sensibilização nos adolescentes pode ser devida a uma subsensibilidade dessa via.

Os cérebros de adolescentes sofrem grandes transições de desenvolvimento e o CPF é uma das regiões que amadurecem mais tardiamente, não se encontrando completamente desenvolvido nesta fase, como já exposto anteriormente (PHILPOT e KIRSTEIN, 2004; DAHL, 2001; SPEAR, 2000).

A indução de *Egr-1* no NAc está diminuída depois do pré-tratamento repetido com injeções de etanol em animais adolescentes (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) e adultos (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), sugerindo a participação dessa proteína na indução da neuroplasticidade inicial induzida pelo etanol. Mutschler e colaboradores (2000) demonstraram que um tratamento repetido com cocaína poderia induzir repressão na expressão da proteína *Egr-1* no NAc e CPF. Nossos dados corroboram os de Mutschler e colaboradores (2000) e nos levam a supor que o etanol levou à repressão na expressão do *Egr-1* no NAc dos animais adolescentes pré-tratados repetidamente com etanol e expostos ao CA, porém, de forma mais acentuada no grupo de animais adolescentes (ADOLESC-EtOH-CA-SAL).

Por receber uma grande quantidade de aferências do NAc, a diminuição na expressão de *Egr-1* observada no CPF pode ser consequência da diminuição prévia ocorrida no NAc.

O córtex motor é uma região cortical do encéfalo de grande importância na formulação de respostas locomotoras induzidas por diferentes estímulos (FINCH, 1996; EVERITT e WOLF, 2002; CHAMBERS et al., 2003). Grande parte da atividade do CoM está sujeita ao controle do NAc (PENNARTZ et al., 1994; BECHARA, 2001; KOLOMIETS et al., 2001; CHAMBERS et al., 2003). O NAc recebe informações de diversas estruturas (AVTM, AMIG, HIP e CPF, principalmente) e as analisa e integra.

Do NAc, todas as informações recebidas são enviadas por meio de projeções GABAérgicas ao Pálido Ventral (PV) e, daí, para o Hipotálamo (HIPt) e CoM (PENNARTZ et al., 1994; FINCH, 1996; MASTERMAN e CUMMINGS, 1997; ROLLS e TREVES, 1998; O'DONNELL et al., 1999; SWANSON, 2000; KOLOMIETS et al., 2001; BECHARA, 2001; CHAMBERS et al., 2003). Este circuito faz uma diferencial interconexão entre o sistema límbico e o sistema motor no cérebro (KALIVAS et al., 1999). No CoM ocorrerá a formação de respostas motoras frente aos estímulos motivacionais ocorridos no sistema mesolímbico/mesocortical (MORGENSON et al., 1980; FINCH, 1996; ROLLS e TREVES, 1998; EVERITT e WOLF, 2002; CHAMBERS et al., 2003). Essa conexão entre o sistema límbico e o sistema motor é de grande importância para a expressão do comportamento motor induzido pelos efeitos do EtOH.

Dessa forma, as expressões tanto de *c-Fos* quanto de *Egr-1* encontram-se diminuídas no CoM de animais adolescentes tratados repetidamente com EtOH (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL) e adultos (ADULTO-EtOH-CA-SAL). Porém, os animais adolescentes que não desenvolveram sensibilização comportamental apresentaram diminuição mais proeminente, ou seja, menor número de núcleos marcados para ambas as proteínas estudadas. Estes resultados nos mostram que as participações destas proteínas também estão implicadas no desenvolvimento da resposta locomotora induzida pelo tratamento repetido com EtOH. Wang e colaboradores (1995) mostraram que injeções de anfetamina e metanfetamina alteram tanto a expressão de *c-Fos* quanto a expressão de *Egr-1* em diferentes estruturas cerebrais, inclusive no córtex motor. Dentro deste aspecto, Bami-Cherrier e colaboradores (2005) observaram a existência de indução da proteína *c-Fos* no CoM durante o desenvolvimento da sensibilização locomotora. Além disso, Valjent e colaboradores (2006) observaram que a associação de contexto ambiental com

respostas comportamentais específicas induzidas pela cocaína requer o envolvimento da proteína *Egr-1*.

Assim, como o CoM recebe aferências do NAc, a diminuição na expressão de *c-Fos* e *Egr-1* observada pode ser consequência da diminuição na expressão dessas proteínas observadas no CPF e NAc.

A amígdala é um importante mediador de respostas ao estresse, medo, ansiedade e de recompensa e aversão a drogas de abuso (HERMAN e CULLINAN, 1997; DAVIS e SHI, 1999; KOOB, 1999). Além disso, tem uma participação importante no prejuízo de memória induzido pelo etanol (NAYLOR et al., 2001). A exposição dos animais adolescentes ao CA atenuou a expressão da proteína *c-Fos*, uma vez que os animais expostos ao CA (grupos ADULTO-SAL-CA-SAL, ADULTO-SAL-CA-EtOH, ADULTO-EtOH-CA-SAL, ADOLESC-SAL-CA-SAL, ADOLESC-SAL-CA-EtOH e ADOLESC-EtOH-CA-SAL) apresentaram uma menor expressão de *c-Fos* comparados aos animais controles não-expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CM-SAL e ADOLESC-SAL-CM-SAL) tanto na ADA quanto na AVA.

A exposição repetida do animal a um ambiente atenua os efeitos do estresse da ansiedade. Nossos dados vão de encontro aos de Badowska-Szalewska e colaboradores (2006) que mostraram que animais expostos repetidamente ao estresse do campo aberto apresentaram diminuição na expressão de *c-Fos* quando comparados aos animais que foram expostos uma única vez. Esse relato sugere que a proteína *c-Fos* está envolvida no processamento de novas informações, bem como no processo de habituação, apesar destes apresentarem diferentes mecanismos.

Os dados da ADA e da AVA mostram claramente que tanto o tratamento repetido com etanol, independente do pareamento (SAL-CM-EtOH, SAL-CA-EtOH, EtOH-CA-SAL), quanto a exposição repetida dos animais ao aparato (SAL-CA-SAL) atenuou a expressão da proteína *c-Fos* quando se compara o que ocorre com

animais tratados com salina e não-expostos ao CA (SAL-CM-SAL). Isso sugere que a exposição repetida ao aparato podem ter atenuado os efeitos do estresse da novidade. De fato, baixas doses de EtOH aliviam os efeitos de alguns fatores estressores (KALANT, 1990).

Adicionalmente, a diminuição da expressão de *c-Fos* nos camundongos adolescentes do grupo EtOH-CA-SAL foi mais acentuada. A amígdala é uma estrutura límbica também importante nos processos de memória (IZQUIERDO et al., 1993). Dentre as várias teorias sobre os mecanismos neurais do abuso de drogas, uma delas foca-se nos sistemas de aprendizagem e memória, em que as funções normais desses circuitos neuronais complexos tornam-se subvertidos, levando a comportamentos compulsivos de procura pela droga (EVERITT et al., 2001). Neste modelo, as drogas de abuso iniciam mecanismos de plasticidade em diferentes sistemas de aprendizagem e memória que começam a controlar o comportamento do indivíduo com base em outras memórias pré-existentes. White (1996) sugere que experiências com drogas de abuso são igualmente armazenadas como outras experiências quaisquer, exceto que as drogas mimetizam ações de reforçadores naturais no cérebro. Seriam esses efeitos reforçadores diferenciais, combinados com essas ações sobre os sistemas de aprendizagem e memória, que produziriam comportamentos de dependência. Nesse modelo, a amígdala adquire informações que promovem a aproximação e interação com os estímulos associados à droga. O estriado dorsal promove a aquisição dos hábitos de resposta-estímulo e o hipocampo adquire a informação sobre o contexto em que o estímulo da droga foi obtido.

Dessa forma, a ausência de expressão da sensibilização comportamental nos animais adolescentes que receberam etanol pareado ao campo aberto pode estar associada à diminuição da atividade neuronal na amígdala, evidenciada pela marcante diminuição da expressão de *c-Fos* nessa estrutura.

Nossos resultados mostram que os animais adultos tratados repetidamente com etanol, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), não apresentaram diferenças para a expressão da proteína *c-Fos* nas diferentes regiões da AMIG em relação ao seu grupo controle pré-tratado com salina e exposto ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL). No entanto, quando fizemos a análise da expressão da proteína *Egr-1*, observamos expressiva diminuição dessa proteína nos animais adultos tratados repetidamente com etanol, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), quando comparados com seu respectivo grupo controle (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL). Já os animais adolescentes tratados repetidamente com etanol, pareados e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL), não apresentaram essa alteração. Esses dados vão de encontro aos de Covington e colaboradores (2005), que observaram uma atenuação na expressão de *Egr-1*, em animais sensibilizados por um regime de estresse repetido e desafiados com uma injeção de anfetamina.

A AMIG basolateral, integrante da AVA, modula a liberação de dopamina no NAc, induzida por estresse, via projeção ao CPF (STEVENSON e GRATTON, 2003). A interação entre o CPF e a AMIG é importante no processamento cognitivo de informações emocionais, processos estes que estão em desenvolvimento durante a adolescência (CUNNINGHAM et al., 2002). Dessa forma, a ativação de aferências dopaminérgicas que chegam à AMIG é essencial para mediar muitas das ações das drogas de abuso (CAINE et al., 1995; HURD et al., 1997; EPPING-JORDAN et al., 1998). A contribuição do CPF e AMIG na expressão da sensibilização foi demonstrada por meio de lesões dos terminais dopaminérgicos no CPFm (córtex pré-frontal médio) e na AMIG, as quais preveniram a expressão da sensibilização comportamental à anfetamina (BJIJOU et al., 2002).

De grande importância para nossos achados, encontramos uma inversão dos resultados relativos à expressão de *c-Fos* no HIP quando comparado com o CPF, CoM e com o NAc. Como descrito por muitos pesquisadores, o HIP é uma estrutura límbica que faz parte do sistema dopaminérgico mesolímbico-cortical (EVERITT et al., 1999) relacionada com os processos de aprendizado e memória (KNIERIM, 2006). Os processos de aprendizagem e memória exigem a ativação de vários fatores de transcrição expressos por genes de resposta imediata. Em nosso estudo, animais adultos tratados repetidamente com EtOH, pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL), apresentaram diminuição na expressão da proteína *c-Fos*, quando comparados aos animais tratados repetidamente com SAL e igualmente expostos ao CA (grupo ADULTO-SAL-CA-SAL), enquanto que os animais adolescentes igualmente tratados e expostos ao CA não demonstraram essa alteração.

Processos associativos e discriminativos, que envolvem aprendizagem e memória, estão associados à ativação neural de várias regiões encefálicas (GRUART e DELGADO-GRCÍA, 2007; GILL et al., 2007). Inclusive, Nakajima e colaboradores (2004) mostraram que a AVTM e o NAc são potenciais substratos neurais para os efeitos de estímulos discriminativos da metanfetamina. A expressão de *c-Fos* nessas duas regiões encefálicas de ratos que aprenderam a discriminar a metanfetamina da salina estava significativamente aumentada. Entretanto, os autores não encontraram qualquer alteração no HIP, sugerindo que o HIP possa não ser essencial em processos de discriminação de drogas. Além disso, têm-se relatado que a destruição de células granulares do giro denteado no HIP potencializa a hiperlocomoção induzida pela metanfetamina e a expressão da proteína *c-Fos* no NAc (TANI et al., 2001).

Existem algumas evidências de que certas ações comportamentais ao EtOH, tais como os efeitos debilitadores da memória, estão aumentadas em ratos adolescentes (PHILPOT et al., 2003; WHITE e AWARTZWELDER 2005).

Muitos relatos da literatura sugerem que administração de doses moderadas de etanol leva à supressão no processo de indução do *c-Fos* em HIP de camundongos adultos (MELIA et al., 1996). Além disso, animais adolescentes expostos à “novidade” apresentam aumento na ativação de *c-Fos* (SPEAR, 2000).

O HIP é uma região cerebral particularmente sensível ao EtOH (RYABININ, 1998), onde receptores dopaminérgicos estão envolvidos na modulação da memória (OTMAKHOVA e LISMAN, 1996; BOUFFARD, 2003) e nos processos de aprendizagem (PREDIGER e TAKAHASHI, 2003). Além disso, existem fortes indícios na participação do fator de transcrição *Egr-1* no processo de modulação da memória e aprendizagem (IZQUIERDO e CAMMAROTA, 2004). Dessa forma, observamos que existem alterações de expressão de *Egr-1* em animais adultos e adolescentes, em que os animais adolescentes pré-tratados com EtOH e expostos ao CA (grupo ADOLESC-EtOH-CA-SAL), os quais não se sensibilizaram, apresentaram expressiva diminuição na expressão de *Egr-1* quando comparados com os animais adultos que receberam o mesmo tratamento.

Hall e colaboradores (2001) e Thomas e colaboradores (2002) demonstraram aumento da expressão de *Egr-1* na amígdala e hipocampo durante a recuperação de memória associada ao medo. A expressão de *Egr-1* aumentou em neurônios CA1 do hipocampo durante a recuperação de memórias contextuais formadas recentemente, mas não após a recuperação de memória antiga. Mudanças na expressão de *Egr-1* na amígdala e no HIP podem estar relacionadas tanto à presença da novidade, que traz estresse e medo quando o animal é colocado em um ambiente totalmente

diferente daquele em que está habituado, quanto com o resgate de memórias consolidadas de estresse e medo.

Tem sido mostrado que a expressão da proteína *Egr-1* é necessária para a retenção da memória de longo prazo e que primariamente envolve a AMIG e o HIP (JONES et al., 2001; BOZON et al., 2002). Os estudos de Malkani e Rosen (2000a,b) mostram que a proteína *Egr-1* tem um papel importante no condicionamento de medo. Mais especificamente, a expressão da proteína *Egr-1* apresenta-se aumentada na porção dorsolateral do núcleo lateral da amígdala, mas não no hipocampo, em modelos de condicionamento contextual de medo. Nesse modelo, os ratos recebem um choque nas patas. O comportamento de “congelamento” (“freezing”) é usado como medida de medo em roedores. Os resultados mostraram um aumento na expressão de *Egr-1* nessa região da amígdala em ratos que mostraram reação de “congelamento” após o choque, comparados com aqueles que não apresentaram esse comportamento. Outros estudos mostram que o *c-Fos* não está elevado em vários núcleos amigdalóides em situações de condicionamento contextual de medo (PEZZONE et al., 1992).

Hall e cols. (2000) relataram um aumento na expressão de *Egr-1* no núcleo lateral da amígdala e na área CA1 após condicionamento contextual de medo, mas sugeriram que esse aumento possa estar mais relacionado à exposição à novidade do que à aprendizagem. Por outro lado, Hall e cols. (2001) mostraram uma “up-regulation” de *Egr-1* na área CA1 do hipocampo durante a recuperação de memória associada a medo (choque nas patas). Estes dados mostram que a expressão de *Egr-1* em populações neuronais específicas pode estar associada com a recuperação de memória e sugerem que esse gene possa contribuir para a plasticidade e reconsolidação de memória.

Como visto por Hall e colaboradores (2001), a exposição do animal a contextos ambientais associados à reação de medo pode alterar a expressão da proteína *Egr-1* principalmente no CPF, NAc, ADA, AVA e HIP (principalmente na região CA1, que foi analisada neste trabalho).

Dessa forma, os trabalhos acima nos levam às seguintes hipóteses:

a) a maior expressão de *Egr-1* nos animais que recebiam as injeções na caixa moradia (SAL-CM-SAL) comparada à expressão protéica dos demais grupos pode ser um efeito de estresse à novidade, o qual foi atenuado pelo etanol. Essa atenuação do estresse à novidade pelo etanol foi mais evidente nos camundongos sensibilizados aos efeitos do álcool (conforme resultados da AVA e ADA).

b) Os processos neuroadaptativos envolvidos na aprendizagem são particularmente importantes nos modelos de dependência a drogas de abuso. O presente trabalho revelou a importância da aprendizagem associativa e do condicionamento Pavloviano na sensibilização comportamental ao etanol. Dessa forma, os animais que não desenvolveram sensibilização comportamental associada ao condicionamento ambiental (ADOLESC-EtOH-CA-SAL) mostraram uma acentuada diminuição na expressão da proteína *Egr-1* no hipocampo. Porém, não houve alteração na expressão da proteína *c-Fos* nessa mesma região encefálica. Por outro lado, aqueles que demonstraram uma acentuada expressão da sensibilização condicionada às pistas ambientais (ADULTO-EtOH-CA-SAL) apresentaram uma diminuição na expressão de *c-Fos* e *Egr-1* no hipocampo. Entretanto, comparativamente, a atenuação na expressão de *Egr-1* comparada ao controle foi menor nos adolescentes do que nos adultos. Os dados nos levam a supor que a sensibilização comportamental possa estar associada a processos adaptativos na expressão de vários genes de resposta imediata. Mudanças moleculares que permeiam repostas alteradas em várias regiões encefálicas durante o

desenvolvimento da dependência são bastante discutidas. Várias vias de transdução de sinal e a síntese de novas proteínas podem ter um papel importante nesse processo. Algumas das proteínas sintetizadas podem ser fatores de transcrição como os genes de resposta imediata, que têm um papel importante na aprendizagem, memória e várias formas de plasticidade sináptica, incluindo dependência. Uma única injeção de cocaína aumentou os níveis de RNAm de vários genes de resposta imediata (*c-Fos*, *c-Jun*, *FosB*, *JunB* e *Egr-1*) no núcleo accumbens de ratos (HOPE et al., 1992). De forma semelhante, o etanol também induziu um aumento na expressão das proteínas *c-Fos* e *Egr-1* após administração aguda de etanol nas várias regiões estudadas, tanto em adultos quanto em adolescentes. No estudo de Hope e cols. (1992), após tratamento crônico com cocaína, a expressão dos genes retornou aos níveis dos controles e não aumentou mesmo após uma dose desafio da droga seguida de um período de abstinência. Em nosso estudo, nós demonstramos uma diminuição nos níveis de *c-Fos* e *Egr-1* no hipocampo dos animais que desenvolveram sensibilização comportamental pareada às pistas ambientais (ADULTO-ETOH-CA-SAL). Esta subsensibilização na indução da expressão dessas proteínas no hipocampo, induzida pelo etanol crônico, pode estar relacionada com os processos que permeiam a sensibilização comportamental condicionada. Neste sentido, podemos supor que a sensibilização comportamental observada não esteja associada a processos mnemônicos de associação da droga com o contexto, mas sim a uma subsensibilização dos processos envolvidos com memória e aprendizagem que faça com que o animal explore mais o ambiente e/ou não desenvolva habituação.

**DISCUSSÃO GERAL,
CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS**

DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

Os resultados comportamentais obtidos confirmaram que a dose usada de etanol (2.0 g/kg) agudamente é capaz de estimular a atividade locomotora de camundongos Swiss. Esta mesma dose utilizada repetidamente leva ao desenvolvimento do fenômeno de sensibilização comportamental em camundongos adultos e tolerância em camundongos adolescentes. Além disso, foi observado que a sensibilização comportamental ao etanol pode ser fortemente influenciada pelo pareamento da droga com as pistas ambientais (sensibilização dependente de contexto), pois o pareamento entre os efeitos ocasionados pelo etanol e as pistas ambientais promoveu uma resposta estimulante motora condicionada mais proeminente nos animais adultos pré-tratados com etanol pareados e expostos ao CA (grupo ADULTO-EtOH-CA-SAL). Dentro desta temática, indagamos se a relação entre sensibilização comportamental ao etanol e condicionamento ambiental é uma ferramenta valiosa que precisa ser estudada e testada, pois pode nos trazer muitos esclarecimentos para melhor entender os mecanismos relacionados com a dependência ao etanol. Assim, nossos resultados relacionando sensibilização comportamental, condicionamento ambiental, dependência ao etanol, faixa etária e expressão de proteínas intraneuronais representam apenas os primeiros passos dentro de toda essa correlação e serão necessários muitos outros trabalhos que possam completar as hipóteses iniciais obtidas aqui.

Muitos achados laboratoriais mostram-nos que alterações neuroquímicas, provocadas pela utilização de drogas de abuso, afetam o sistema nervoso central, alterações estas que, se provocadas durante a adolescência, poderão persistir por toda a vida do usuário. Neste sentido, o presente estudo procurou relacionar a expressão de proteínas intracelulares, como *c-Fos* e *Egr-1*, sensibilização ao etanol,

condicionamento ambiental e faixa etária. Os resultados imuno-histoquímicos mostraram que a expressão de *c-Fos* e *Egr-1* encontra-se alterada quando esses animais receberam agudamente uma dose estimulante 2,0g/kg de etanol, sugerindo aumento da sinalização do AMPc-PKA pelo etanol. Assim, as expressões de *c-Fos* e *Egr-1* aumentaram no CPF, MoC, NAc, ADA, AVA e HIP dos camundongos adultos (ADULTO-EtOH) e adolescentes (ADOLESC-EtOH), indistintamente, quando comparados com seus respectivos controles (ADULTO-SAL e ADOLESC-SAL).

A administração prolongada de etanol induziu alterações adaptativas diferenciadas, dependentes da idade, na expressão de *c-Fos* e *Egr-1* em várias regiões encefálicas.

Um resumo da análise comparativa somente entre os animais submetidos a um tratamento prolongado com etanol, pareados ao campo aberto (EtOH-CA-SAL) e seu controle (animais tratados com salina, pareados ao campo aberto, e desafiados com etanol – SAL-CA-SAL), envolvendo os dois grupos de idade, mostrou os seguintes resultados:

- Com relação aos adolescentes (grupo que não sensibilizou), a expressão de *c-fos* dos animais tratados com etanol diminuiu, em relação ao controle, em várias das regiões estudadas (CPF, CM, Nac, ADA e AVA), sugerindo subsensibilização na indução da expressão dessa proteína nessas regiões. Entretanto, essa subsensibilização não ocorreu no HIP. A expressão de *Egr-1* diminuiu no CPF, CM, Nac, e HIP do grupo tratado com etanol, mas não na ADA e AVA.
- Com relação aos adultos (grupo que sensibilizou), a expressão de *c-fos* dos animais tratados com etanol diminuiu, em relação aos controles, no CoM e HIP, sugerindo subsensibilização na indução da expressão dessa proteína nessas regiões. Entretanto, a expressão de *c-Fos* desses animais não

diferiu dos controles, em CPF, NAc, ADA e AVA. A expressão de *Egr-1* diminuiu em todas as regiões estudadas (CPF, CM, NAc, ADA, AVA e HIP) do grupo tratado com etanol.

- A análise dos dados da expressão de *c-Fos* sugere que os animais adolescentes podem exibir uma adaptação muito mais rápida à exposição ao EtOH do que os animais adultos. Estes achados sugerem uma grande alteração da plasticidade neuronal induzida pelo EtOH na adolescência. Nesse aspecto, observamos uma indução diferencial das proteínas *c-Fos* e *Egr-1* em camundongos pré-expostos ao etanol durante a adolescência quando comparados com adultos.

- Assim, foram detectadas diferenças neuroadaptativas da expressão protéica de *c-Fos* e *Egr-1*, após tratamento prolongado com etanol, entre animais tratados durante a adolescência quando comparados com adultos. Esses resultados ilustram que um tratamento prolongado com etanol durante a adolescência resulta em interações complexas entre o efeito da droga e as características neuroquímicas dependentes da idade, podendo levar a alterações na resposta gênica. A transição entre a adolescência e a vida adulta envolve a maturação da circuitaria mesocorticolímbica. Alterações no desenvolvimento desse sistema podem produzir um aumento em comportamentos de procura pela novidade e tomada de risco, como ocorre no início do processo de dependência às drogas de abuso.

Assim, juntando os nossos dados com aqueles já existentes na literatura, observamos que as drogas de abuso podem provocar alterações persistentes nas funções cerebrais, principalmente naquelas relacionadas aos sistemas

dopaminérgicos e naqueles que ocorrem no cérebro ainda em maturação dos adolescentes.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos permitem as seguintes observações:

a) Uma única injeção intraperitoneal de 2.0 g/kg de etanol promoveu uma hiperatividade locomotora em adultos e adolescentes, mostrando que essa dose é estimulante para ambas as idades.

b) Um tratamento agudo de 2,0 g/kg de etanol promoveu aumento na expressão de *c-Fos* e *Egr-1* no córtex pré-frontal, córtex motor, núcleo accumbens, área dorsal da amígdala, área ventral da amígdala e hipocampo, uma hora após o tratamento com etanol. Estes resultados sugerem aumento da excitabilidade neuronal nessas regiões.

c) O efeito estimulante locomotor do etanol é passível de condicionamento ambiental.

d) O desenvolvimento de sensibilização condicionada (associação entre a hiperatividade locomotora induzida pela droga e o campo aberto) ocorreu em camundongos adultos, mas não em adolescentes.

e) O contexto ambiental parece não exercer influência sobre a indução do fenômeno de sensibilização comportamental em camundongos adolescentes.

f) No que concerne à sensibilização comportamental ao efeito estimulante locomotor do etanol pareado a pistas ambientais, constatamos um importante envolvimento das pistas ambientais sob a expressão de *c-Fos* e *Egr-1*.

g) Há indução diferencial de *c-Fos* e *Egr-1* em camundongos pré-expostos repetidamente ao etanol durante a adolescência, comparados aos adultos.

h) As proteínas *c-Fos* e *Egr-1* são essenciais para os efeitos comportamentais duradouros do EtOH.

i) A manutenção dos efeitos comportamentais induzidos pelo EtOH pode estar implicada com a participação das proteínas *c-Fos* e *Egr-1*.

j) Animais adultos e adolescentes apresentam diferentes padrões na expressão de *Egr-1* e *c-Fos* quando pré-tratados repetidamente com EtOH pareado a pistas ambientais, principalmente na AMIG e HIP.

Finalmente, talvez em alguns anos seja possível trazer avanços para possibilitar um melhor entendimento e para auxiliar no tratamento de uma problemática de saúde pública mundial, com crescente prevalência na população em geral e cujo aumento vertiginoso vem ocorrendo entre os adolescentes, principalmente. Desta forma, talvez, no futuro, existam medicamentos com múltiplas ações farmacológicas capazes de agirem ao mesmo tempo em diferentes órgãos (intestino, fígado, sangue e cérebro, principalmente) e em diferentes estruturas cerebrais relacionados à dependência. Assim, os efeitos clínicos poderão ser mais favoráveis e talvez facilitem a prevenção, o diagnóstico e o tratamento da dependência ao EtOH. Então, poderá ocorrer melhoria na qualidade de vida dos dependentes e de seus familiares, com conseqüente diminuição da violência e da criminalidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, W.C.; DRAGUNOW, M.; TATE, W.P. The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. **Mol Neurobiol.**, v. 5, n. 2-4, p. 297-314, 1991. Review.
- ABRAHAM, W.C.; MASON, S.E.; DEMMER, J.; WILLIAMS, J.M.; RICHARDSON, C.L.; TATE, W.P.; LAWLOR, P.A.; DRAGUNOW, M. Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. **Neurosci.**, v. 56, n. 3, p. 717-727, 1993.
- ADRIANI, W.; CHIAROTTI, F.; LAVIOLA, G. Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. **Behav Neurosci.**, v. 112, n. 5, p.1152-1166, 1998.
- ALLAN, A.M. & HARRIS, R.A. Acute and chronic ethanol treatments alter GABA receptor-operated chloride channels. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 27, n. 4, p. 665-670, 1987.
- ALLEWEIRELDT, A.T.; WEBER, S.M.; NEISEWANDER, J.L. Passive exposure to a contextual discriminative stimulus reinstates cocaine-seeking behavior in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 69, n. 3-4, p. 555-560, 2001.
- ANDERSEN, S.L.; THOMPSON, A.T.; RUTSTEIN, M.; HOSTETTER, J.C.; TEICHER, M.H. Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. **Synapse.**, n. 37, n. 2, p. 167-169, 2000.
- ANDERSEN, S.L. & TEICHER, M.H. Delayed effects of early stress on hippocampal development. **Neuropsychopharmacol.**, v. 29, n. 11, p. 1988-1993, 2004.
- ARAUJO, N.P. **Fatores que modificam a sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de etanol.** [Tese – Doutorado – UNIFESP, EPM]. São Paulo, 2003.
- ARAUJO, N.P.; CAMARINI, R.; SOUZA-FORMIGONI, M.L.; CARVALHO, R.C.; ABILIO, V.C.; SILVA, R.H.; RICARDO, V.P.; RIBEIRO R, de A.; FRUSSA-FILHO, R. The importance of housing conditions on behavioral sensitization and tolerance to ethanol. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 82, n. 1, p. 40-45, 2005.
- ARAUJO, N.P.; ANDERSEN, M.L.; ABILIO, V.C.; GOMES, D.C.; CARVALHO, R.C.; SILVA, R.H.; RIBEIRO, R, de A.; TUFIK, S.; FRUSSA-FILHO, R. Sleep deprivation abolishes the locomotor stimulant effect of ethanol in mice. **Brain Res Bull.**, v. 69, n. 3, p. 332-337, 2006.
- ARNETT, J.J. Adolescent storm and stress, reconsidered. **Am Psychol.**, v. 54, n. 5, p. 317-326, 1999, Review.
- ASHER, O.; CUNNINGHAM, T.D.; YAO, L.; GORDON, A.S.; DIAMOND, I. Ethanol stimulates cAMP-responsive element (CRE)-mediated transcription via CRE-binding protein and cAMP-dependent protein kinase. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 301, n. 1, p.66-70, 2002.

- ASYYED, A.; STORM, D.; DIAMOND, I. Ethanol activates cAMP response element-mediated gene expression in select regions of the mouse brain. *Brain Res.*, v. 1106, n. 1, p. 63-71, 2006.
- AZNAR, S.; TONDER, N.; BELE, S.; KIESSLING, M.; ZIMMER, J.; GASS, P. c-JUN, KROX-24, and c-FOS expression in hippocampal grafts placed in excitotoxic hippocampal lesions of the rat. **Exp Neurol.**, v. 136, n. 2, p. 205-211, 1995.
- BADIANI, A.; OATES, M.M.; DAY, H.E.; WATSON, S.J.; AKIL, H.; ROBINSON, T.E. Amphetamine-induced behavior, dopamine release, and c-fos mRNA expression: modulation by environmental novelty. **J Neurosci.**, v. 18, n. 24, p. 10579-10593, 1998.
- BADOWSKA-SZALEWSKA, E.; KLEJBOR, I.; DZIWIATKOWSKI, J.; SPODNIK, J.H.; MORYŚ, J. The influence of acute and chronic open-field exposure on the hippocampal formation: an immunohistochemical study. **Folia Morphol.**, v. 65, n. 4, p. 343-351, 2006.
- BAN, E.; CHOI, O.K.; CHUNG, W.Y.; PARK, C.S.; YOO, E.A.; CHUNG, B.C.; YOO, Y.S. Influence of buffer composition and sample pretreatment on efficiency separation for monitoring neuropeptides in plasma using capillary electrophoresis. **Electrophoresis.**, v. 22, n. 11, p. 2173-2178, 2001.
- BASSAREO, V.; De LUCA, M.A.; ARESU, M.; ASTE, A.; ARIU, T.; DI CHIARA, G. Differential adaptive properties of accumbens shell dopamine responses to ethanol as a drug and as a motivational stimulus. **Eur J Neurosci.**, v. 17, n. 7, p. 1465-1472, 2003.
- BASSAREO, V.; De LUCA, M.A.; DI CHIARA, G. Differential impact of pavlovian drug conditioned stimuli on in vivo dopamine transmission in the rat accumbens shell and core and in the prefrontal cortex. **Psychopharmacol.**, v. 191, n. 3, p. 689-703, 2007.
- BATTIES, R.J. & BELL, C.S. Future directions in drug abuse prevention research. **NIDA Res Monogr.**, v. 63, p. 221-228, 1985.
- BAXTER, M.G.; PARKER, A.; LINDNER, C.C.; IZQUIERDO, A.D.; MURRAY, E.A. Control of response selection by reinforcer value requires interaction of amygdala and orbital prefrontal cortex. **J Neurosci.**, v. 20, n. 11, p. 4311-4319, 2000.
- BECHARA, A. Neurobiology of decision-making: risk and reward. **Semin Clin Neuropsychiatry**, v. 6, p. 205-216, 2001.
- BECKMANN, A.M. & WILCE, P.A. Egr transcription factors in the nervous system. **Neurochem Int.**, v. 31, n. 4, p. 477-510, discussion p. 517-516, 1997, Review.
- BELLOT, R.G.; CAMARINI, R.; VITAL, M.A.; PALERMO-NETO, J.; LEVTON, V.; FRUSSA-FILHO, R. Monosialoganglioside attenuates the excitatory and

- behavioural sensitization effects of ethanol. **Eur J Pharmacol.**, v. 313, n. 3, p. 175-179, 1996.
- BERGE, O.G. & GARCIA-CABRERA, I. Effects of ethanol on body temperature of rats at high ambient pressure. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 39, n. 1, p. 37-41, 1991.
- BERKE, J.D. & HYMAN, S.E. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. **Neuron.**, v. 25, p. 515-532, 2000.
- BEVINS, R.A. & PALMATIER, M.I. Extending the role of associative learning processes in nicotine addiction. **Behav Cogn Neurosci Rev.**, v. 3, n. 3, p. 143-158, 2004, Review.
- BHAT, R.V.; COLE, A.J.; BARABAN, J.M. Role of monoamine systems in activation of zif268 by cocaine. **J Psychiatry Neurosci.**, v. 17, n. 3, p. 94-102, 1992. Review.
- BJIJOU, Y.; DE DEURWAERDERE, P.; SPAMPINATO, U.; STINUS, L.; CADOR, M. D-amphetamine-induced behavioral sensitization: effect of lesioning dopaminergic terminals in the medial prefrontal cortex, the amygdala and the entorhinal cortex. **Neurosci.**, v. 109, n. 3, p. 499-516, 2002.
- BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res.**, v. 58, n. 1-2, p. 155-165, 1993, Review.
- BOLANOS, C.A.; GLATT, S.J.; JACKSON, D. Subsensitivity to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. **Brain Res Dev Brain Res.**, v. 111, n. 1, p. 25-33, 1998.
- BONCI, A. & MALENKA, R.C. Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. **J Neurosci.**, v. 19, n. 10, p. 3723-3730, 1999.
- BOEDET, R. [Central dopamine receptors: general considerations (Part 1)] **Rev Neurol.**, v. 160, n. 8-9, p.862-70, 2004, Review.
- BOUFFARD, T.; MARCOUX, M.F.; VEZEAU, C.; BORDELEAU, L. Changes in self-perceptions of competence and intrinsic motivation among elementary schoolchildren. *Br J Educ Psychol.*, v. 73, n. Pt 2, p. 171-186, 2003.
- BOZON, B.; DAVIS, S.; LAROCHE, S. A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. **Neuron.**, v. 40, n. 4, p. 695-701, 2003.
- BRAMI-CHERRIER, K.; VALJENT, E.; HERVE, D.; DARRAGH, J.; CORVOL, J.C.; PAGES, C.; ARTHUR, S.J.; GIRAULT, J.A.; CABOCHE, J. Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. **J Neurosci.**, v. 25, n. 49, p. 11444-11454, 2005.

Erratum in: **J Neurosci.**, v. 26, n. 3, 2006, table of contents. Simon, Arthur J [corrected to Arthur, Simon J].

BRASSER, S.M. & SPEAR, N.E. Physiological and behavioral effects of acute ethanol hangover in juvenile, adolescent, and adult rats. **Behav Neurosci.**, v. 116, n. 2, p. 305-320, 2002.

BRENNAN, P.A.; HANCOCK, D.; KEVERNE, E.B. The expression of the immediate-early genes c-fos, egr-1 and c-jun in the accessory olfactory bulb during the formation of an olfactory memory in mice. **Neurosci.**, v. 49, n. 2, p. 277-284, 1992.

BROADBERT, J.; GRAHAME, N.J.; CUNNINGHAM, C.L. Haloperidol prevents ethanol-stimulated locomotor activity but fails to block sensitization. **Psychopharmacol.**, v. 120, p. 475-482, 1995.

BRODIE, M.S.; SHEFNER, S.A.; DUNWIDDIE, T.V. Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. **Brain Res.**, v. 508, p. 65-69, 1990.

BRODIE, M.S.; PESOLD, C.; APPEL, S.B. Ethanol directly excites dopaminergic ventral tegmental area reward neurons. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 23, n. 11, p. 1848-52, 1999.

BRODIE, M.S. Increased ethanol excitation of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area after chronic ethanol treatment. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 26, n. 7, p. 1024-1030, 2002.

BROWN, E.E. & FIBIGIR, H.C. Cocaine-induced conditioned locomotion: Absence of associated increases in dopamine release. **Neurosci.**, v. 48, p. 621-629, 1992.

BROWN, E.E.; ROBERTSON, G.S.; FIBIGIR, H.C. Evidence for conditional neuronal activation following exposure to a cocaine-paired environment: role of forebrain limbic structures. **J Neurosci.**, v. 12, p. 4112-4121, 1992.

BURKE, J.D. Jr; BURKE, K.C.; ERA, D.S. Increased rates of drug abuse and dependence after onset of mood or anxiety disorders in adolescent. **Hosp Commun Psychiatry**, v. 45, p. 451-455, 1994.

CAINE, S.B.; HEINRICHS, S.C.; COFFIN, V.L.; KOOB, G.F. Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. **Brain Res.**, v. 692, n. 1-2, p. 47-56, 1995.

CAMARINI, R.; ANDREATINI, R.; MONTEIRO, M.G. Prolonged treatment with carbamazepine increases the stimulatory effects of ethanol in mice. **Alcohol.**, v. 12, n. 4, p. 305-308, 1995.

- CAMARINI, R.; FRUSSA-FILHO, R.; MONEIRO, M.G.; CALIL, H.M. - MK-801 blocks the development of behavioral sensitization to ethanol. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 24, n. 3, p. 285-290, 2000a.
- CAMARINI, R.; NOGUEIRA PIRES, M.L.; CALIL, H.M. Involvement of the opioid system in the development and expression of sensitization to the locomotor-activating effect of ethanol. **Int J Neuropsychopharmacol.**, v. 3, n. 4, p. 303-309, 2000b.
- CAMARINI, R. & HODGE, C.W. Ethanol preexposure increases ethanol self-administration in C57BL/6J and DBA/2J mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 79, n. 4, p. 623-632, 2004.
- CAMARINI, R.; GRIFFIN III, W.C.; Dos SANTOS, B.R.; OLIVE, M.F. Effects of adolescent exposure to cocaine on locomotor activity e extracellular dopamine e glutamate levels in the mouse nucleus accumbens. **Brain Res** (submetido).
- CAMPEAU, S.; HAYWARD, M.D.; HOPE, B.T.; ROSEN, J.B.; NESTLER, E.J.; DAVIS, M. Induction of the c-fos proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. **Brain Res.**, v. 565, n. 2, p. 349-352, 1991.
- CAO, Y.; XIE, K.; ZHU, X.Z. The enhancement of dopamine D1 receptor desensitization by adenosine A1 receptor activation. **Eur J Pharmacol.**, v. 562, n. 1-2, p. 34-38, 2007.
- CAREY, R. & GUI, J. Cocaine conditioning and cocaine sensitization: what is the relationship? **Behav. Brain. Res.**, v. 92, p.67-76, 1998.
- CARLEZON, W.A. Jr; THOME, J.; OLSON, V.G.; LANE-LADD, S.B.; BRODKIN, E.S.; HIROI, N.; DUMAN, R.S.; NEVE, R.L.; NESTLER, E.J. Regulation of cocaine reward by CREB. **Science**, v. 282, n. 5397, p. 2272-2275, 1998.
- CARPENTER-HYLAND, E.P. & CHANDLER, L.J. Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 86, n. 2, p. 200-208, 2007.
- CASS, W.A. & ZAHNISER, N.R. Cocaine levels in striatum and nucleus accumbens: augmentation following challenge injection in rats withdrawn from repeated cocaine administration. **Neurosci Lett.**, v. 152, p.177-180, 1993.
- CENTONZE, D.; PICCONI, B.; GUBELLINI, P.; BERNARDI, G.; CALABRESI, P. Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. **Eur J Neurosci.**, v. 13, n. 6, p. 1071-1077, 2001. Review.
- CHAMBERS, R.A.; KRYSTAL, J.K.; SELF, D.W. A neurobiological basis for substance abuse comorbidity in schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 50, p. 71-83, 2001.

- CHAMBERS, R.A.; TAYLOR, J.R.; POTENZA, M.N. Development neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. **Am J Psychiatry**, v. 160, p. 1041-1052, 2003. Review.
- CHANDLER, L.J.; CARPENTER-HYLAND, E.; HENDRICSON, A.W.; MALDVE, R.E.; MORRISETTI, R.A.; ZHOU, F.C.; SARI, Y.; BELL, R.; SZUMLINSKI, K.K. Structural and functional modifications in glutamateric synapses following prolonged ethanol exposure. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 30, n. 2, p. 368-376, 2006.
- CHAO, J. & NESTLER, E.J. Molecular neurobiology of drug addiction. **Annu. Rev. Med.**, v. 55, p. 113-132, 2004.
- CHAUDHURI, A. Neural activity mapping with inducible transcription factors. **Neuroreport.**, v. 8, n. 16, p. v-ix, 1997, Review.
- CHEN, R.H.; JUO, P.C.; CURRAN, T.; BLENIS, J. Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. **Oncogene.**, v. 12, n. 7, p. 1493-1502, 1996.
- CHINEN, C.C. **Avaliação Funcional Comportamental da Participação dos Dopaminoceptores D1 em Fenômenos de Plasticidade Dopaminérgica Induzidos por Fatores Farmacológicos, Fisiológicos e Psicológicos.** [Tese – Doutorado – UNIFESP, EPM]. São Paulo 2005.
- CHINEN, C.C.; FARIA, R.R.; FRUSSA-FILHO, R. Characterization of the rapid-onset type of behavioral sensitization to amphetamine in mice: role of drug-environment conditioning. **Neuropsychopharmacol.**, v. 31, n. 1, p. 151-159, 2006.
- CHIU, J.; KALANT, H.; LE, D.A. Vasopressin opposes locomotor stimulation by ethanol, cocaine and amphetamine in mice. **Eur J Pharmacol.**, v. 355, n. 1, p. 11-17, 1998.
- CHRISTY, B.A.; LAU, L.F.; NATHANS, D. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 85, n. 21, p. 7857-7861, 1988.
- CIVELLI, O.; BUNZOW, J.R.; GRANDY, D.K. Molecular diversity of the dopamine receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 33, p. 281-307, 1993, Review.
- CLARK, D.B.; KIRISCI, L.; MOSS, H.B. Early adolescent gateway drug use in sons of fathers with substance use disorders. **Addict Behav.**, v. 23, n. 4, p. 561-566, 1998.
- CLEMMESSEN, L.; INGVAR, M.; HEMMINGSEN, R.; BOLWIG, T.G. Local cerebral glucose consumption during ethanol withdrawal in the rat: effects of single and multiple episodes and previous convulsive seizures. **Brain Res.**, v. 453, n. 1-2, p. 204-214, 1988.

- COLE, A.J.; BHAT, R.V.; PATT, C.; WORLEY, P.F.; BARABAN, J.M. D1 dopamine receptor activation of multiple transcription factor genes in rat striatum. **J Neurochem.**, v. 58, n. 4, p. 1420-1426, 1992.
- COLE, R.L.; KONRADI, C.; DOUGLASS, J.; HYMAN, S.E. Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. **Neuron.**, v. 14, n. 4, p. 813-823, 1995.
- COLLINS, S.L. & IZENWASSER, S. Cocaine differentially alters behavior and neurochemistry in periadolescent versus adult rats. **Brain Res Dev Brain Res.**, v. 138, n. 1, p. 27-34, 2002.
- COMPTON, W.M. 3rd; COTTLER, L.B.; PHELPS, D.L.; BEN ABDALLAH. A.; SPITZNAGEL, E.L. Psychiatric disorders among drug dependent subjects: are they primary or secondary? **Am J Addict.**, v. 9, p. 126-134, 2000.
- COPANI, A.; BRUNO, V.M.; BARRESI, V.; BATTAGLIA, G.; CONDORELLI, D.F.; NICOLETTI, F. Activation of metabotropic glutamate receptors prevents neuronal apoptosis in culture. **J Neurochem.**, v. 64, n. 1, p. 101-108, 1995.
- CORNISH, J.L.; NAKAMURA, M.; KALIVAS, P.W. Dopamine-independent locomotion following blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the ventral tegmental area. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 298, n. 1, p. 226-233, 2001.
- COSTA, F.G.; FRUSSA-FILHO, R.; FELICIO, L.F. The neurotensin receptor antagonist, SR48692, attenuates the expression of amphetamine-induced behavioural sensitisation in mice. **Eur J Pharmacol.**, v. 428, n. 1, p. 97-103, 2001.
- COVINGTON, H.E. 3rd; KIKUSUI, T.; GOODHUE, J.; NIKULINA, E.M.; HAMMER, R.P. Jr; MICZEK, K.A. Brief social defeat stress: long lasting effects on cocaine taking during a binge and zif268 mRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex. **Neuropsychopharmacol.**, v. 30, n. 2, p. 310-321, 2005.
- COWEN, M.S. & LAWRENCE, A.J. The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v. 23, n. 7, p. 1171-212. 1999. Review.
- CREWS, F.T.; BRAUN, C.J.; HOPLIGHT, B.; SWITZER, R.C. 3rd; KNAPP, D.J. Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 24, n. 11, p. 1712-1723, 2000.
- CREWS, F.T.; MDZINARISHVILI, A.; KIM, D.; HE, J.; NIXON, K. Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. **Neuroscience.**, v. 137, n. 2, p. 437-445, 2006.
- CREWS, F.; HE, J.; HODGE, C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 86, p. 189-199, 2007.

- CROMBAG, H.S.; BADIANI, A.; CHAN, J.; DELL'ORCO, J.; DINNEN, S.P.; ROBINSON, T.E. The ability of environmental context to facilitate psychomotor sensitization to amphetamine can be dissociated from its effect on acute drug responsiveness and on conditioned responding. **Neuropsychopharmacol.**, v. 24, n. 6, p. 680-690, 2001.
- CRUZ, F.C.; DELUCIA, R.; PLANETA, C.S. Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 80, p. 411 – 417, 2005.
- CUNNINGHAM, C.L. & NOBLE, D. Conditioned activation induced by ethanol: role in sensitization and conditioned place preference. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 43, p. 307-313, 1992.
- CUNNINGHAM, C.L.; TULL, L.E.; RINDAL, K.E.; MEYER, P.J. Distal and proximal pre-exposure to ethanol in the place conditioning task: tolerance to aversive effect, sensitization to activating effect, but no change in rewarding effect. **Psychopharmacol.**, v. 160, p. 414-424, 2002.
- CURRAN, T. & MORGAN, J.I. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. **Science**, v. 229, n. 4719, p. 1265-1268, 1985.
- CURRAN, E.J.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Psychomotor stimulant- and opiate-induced c-fos mRNA expression patterns in the rat forebrain: comparisons between acute drug treatment and a drug challenge in sensitized animals. **Neurochem Res.**, v. 21, n. 11, p. 1425-1435, 1996.
- DAHL, R.E. Affect regulation, brain development, and behavioral/emotional health in adolescence. **CNS Spectr.**, v. 6, n. 1, p. 60-72, 2001.
- DAHLSTROM, A. & FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. **Experientia.**, v. 20, n. 7, p. 398-399, 1964.
- DALIA, A. & WALLACE, L.J. Amphetamine induction of c-fos in the nucleus accumbens is not inhibited by glutamate antagonists. **Brain Res.**, v. 694, n. 1-2, p. 299-307, 1995.
- DANIELL, L.C. & PHILLIPS T.J. Ethanol sensitivity of brain NMDA receptors in mice selectively bred for differences in response to the low-dose locomotor stimulant effects of ethanol. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 18, n. 6, p. 1474-1481, 1994.
- DAVID, H.N.; ANSSEAU, M.; ABRAINI, J.H. Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals. **Brain Res Brain Res Rev.**, v. 50, n. 2, p. 336-360, 2005, Review.

- DAVIES M. The role of GABA_A receptor in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. **J Psychiatry Neurosci.**, v. 28, n. 263-274, 2003.
- DAVIS, M. & SHI, C. The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? **Ann N Y Acad Sci.**, v. 877, p. 281-291, 1999, Review.
- DERRYBERRY, D. & TUCKER, D.M. The adaptive base of the neural hierarchy: elementary motivational controls on network function. **Nebr Symp Motiv.**, v. 38, p. 289-342, 1990.
- DEUPREE, J.D.; SMITH, S.D.; KRATOCHVIL, C.J.; BOHAC, D.; ELLIS, C.R.; POLAHA, J.; BYLUND, D.B.; UNMC Collaborative ADHD Research Team. Possible involvement of alpha-2A adrenergic receptors in attention deficit hyperactivity disorder: radioligand binding and polymorphism studies. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.**, v. 141, n. 8, p. 877-884, 2006.
- De WIT, D.J., ADLAF, E.M.; OFFORD, D.R.; OGBORNE, A.C. Age at first alcohol use: a risk factor for the development of alcohol disorders. **Am J Psychiatry**, v. 157, p. 745-750, 2000a.
- De WIT, D.J.; HANCE, J.; OFFORD, D.R.; OGBORNE, A.C. The influence of early and frequent use of marijuana on the risk of desistance and of progression to marijuana-related harm. **Prev Med.**, v. 31, p. 455-464, 2000b.
- DIAMOND, I. & GORDON, A.S. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. **Physiol Rev.**, v. 77, p. 1-20, 1997.
- DI CHIARA, G. & IMPERATO, A. Ethanol preferentially stimulates dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats. **Eur J Pharmacol.**, v. 115, n. 1, p. 131-132, 1985.
- DI CHIARA, G. & IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, p. 5274-5278, 1988.
- DI CHIARA, G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. **Drug and Alcohol Depend.**, v. 38, n. 2, p. 95-137, 1995.
- DI CHIARA, G. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. **Eur J Pharmacol.**, v. 375, n. 1-3, p. 13-30, 1999, Review.
- DI CHIARA, G.; BASSAREO, V.; FENU, S.; De LUCA, M.A.; SPINA, L.; CADONI, C.; ACQUAS, E.; CARBONI, E.; VALENTINI, V.; LECCA, D. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. **Neuropharmacol.**, v. 47, n. 1, p. 227-241, 2004, Review.

- DOUGHERTY, G.G. & ELLINWOOD, E.H. Jr. Chronic d-amphetamine in nucleus accumbens: lack of tolerance or reverse tolerance or locomotor activity. **Life Sci.**, v. 28, p. 2295-2298, 1981.
- DRAGUNOW, M. & ROBERTSON, H.A. Generalized seizures induce c-fos protein(s) in mammalian neurons. **Neurosci Lett.**, v. 82, n. 2, p. 157-161, 1987.
- DURSTEWITZ, D.; KRONER, S.; GUNTURKUN, O. The dopaminergic innervation of the avian telencephalon. **Prog Neurobiol.**, v. 59, n. 2, p. 161-195, 1999, Review.
- EHRlich, M.E.; SOMMER, J.; CANAS, E.; UNTERWALD, E.M. Periadolescent mice show enhanced DeltaFosB upregulation in response to cocaine and amphetamine. **J Neurosci.**, v. 22, n. 21, p. 9155-9159, 2002.
- EKMAN, G.; FRANKENHAUSER, M.; GOLBERG, L.; BJERVER, K.; JAERPE, G.; MYRSTEN, A.L. Effects of alcohol intake on subjective and objective variables over a five-hour period. **Psychopharmacol.**, v. 4, p. 28-38, 1963.
- EKMAN, G.; FRANKENHAUSER, M.; GOLDBERG, L.; HAGDAHL, R.; MYRSTEN, A.L. Subjective and objective effects of alcohol as functions of dosage and time. **Psychopharmacol.**, v. 6, n. 6, p. 399-409, 1964.
- EPPING-JORDAN, M.P.; MARKOU, A.; KOOB, G.F. The dopamine D-1 receptor antagonist SCH 23390 injected into the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis decreased cocaine reinforcement in the rat. **Brain Res.**, v. 784, n. 1-2, p. 105-115, 1998.
- ESTROFF, T.W.; SCHWARTZ, R.H.; HOFFMANN, N.G. Adolescent cocaine abuse. Addictive potential, behavioral and psychiatric effects. **Clin Pediatr.**, v. 28, n. 12, p. 550-555, 1989.
- EVERITT, B.J.; PARKINSON, J.A.; OLMSTEAD, M.C.; ARROYO, M.; ROBLEDO, P.; ROBBINS, T.W. Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 877, p. 412-438, 1999, Review.
- EVERITT, B.J.; DICKINSON, A.; ROBBINS, T.W. The neuropsychological basis of addictive behaviour. **Brain Res Brain Res Rev.**, v. 36, n. 2-3, p. 129-138, 2001, Review.
- EVERITT, B.J. & WOLF, M.E. Psychomotorstimulant addiction: a neural systems perspective. **J Neurosci.**, v. 22, p. 3312-3320, 2002.
- FADDA, F. & ROSSETTI, Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Prog Neurobiol.**, v. 56, n. 4, p. 385-431, 1998.
- FAN, X.; HESS, E.J. D2-like dopamine receptors mediate the response to amphetamine in a mouse model of ADHD. **Neurobiol Dis.**, v. 26, n. 1, p. 201-211, 2007.

- FENG, H.J. & FAINGOLD, C.L. Modulation of audiogenic seizures by histamine and adenosine receptors in the inferior colliculus. **Exp Neurol.**, v. 163, n. 1, p. 264-270, 2000.
- FENG, H.J.; YANG, L.; FAINGOLD, C.L. Role of the amygdala in ethanol withdrawal seizures. **Brain Res.**, v. 1141, p. 65-73, 2007.
- FIBIGER, H.C.; NOMIKOS, G.; PFAUS, J.G.; DAMSMA, G. Sexual behavior, eating and mesolimbic dopamine. **Clin Neuropharmacol.**, v. 15, n. 1, part A, p. 556A-567A, 1992.
- FINCH, D.M. Neurophysiology of converging synaptic inputs from the rat prefrontal cortex, amygdala, midline thalamus, and hippocampal formation onto single neurons of the caudate/putamen and nucleus accumbens. **Hippocampus**, v. 6, p. 495-512, 1996.
- FLATSCHER-BADER, T.; VAN DER BRUG, M.; HWANG, J.W.; GOCHEE, P.A.; MATSUMOTO, I.; NIWA, S.; WILCE, P.A. Alcohol-responsive genes in the frontal cortex and nucleus accumbens of human alcoholics. **J Neurochem.**, v. 93, n. 2, p. 359-370, 2005. Erratum in: **J Neurochem.**, v. 94, n. 5, p. 1472, 2005.
- FLEMING, R.L.; WILSON, W.A.; SWARTZWELDER, H.S. Magnitude and ethanol sensitivity of tonic GABAA receptor-mediated inhibition in dentate gyrus changes from adolescence to adulthood. **J Neurophysiol.**, v. 97, n. 5, p. 3806-3811, 2007.
- FRANKEN, I.H.; BOOIJ, J.; VAN DEN BRINK, W. The role of dopamine in human addiction: from reward to motivated attention. **Eur J Pharmacol.**, v. 526, n. 1-3, p. 199-206, 2005, Review.
- FRUSSA-FILHO, R.; GONÇALVES, M.T.; ANDERSEN, M.L.; De ARAUJO, N.P.; CHINEN, C.C.; TUFIK, S. Paradoxical sleep deprivation potentiates amphetamine-induced behavioural sensitization by increasing its conditioned component. **Brain Res.**, v. 1003, n. 1-2, p. 188-193, 2004.
- GALDUROZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; CARLINI, E.A. Trends in drug use among students in Brazil: analysis of four surveys in 1987, 1989, 1993 and 1997. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v. 37, p. 523 – 531, 2004.
- GALDUROZ, J.C. & CARLINI, E.A. Use of alcohol among the inhabitants of the 107 largest cities in Brazil-2001. **Braz J Med Biol Res.**, v. 40, n. 3, p. 367-375, 2007.
- GARCIA-CABRERA, I. & BERGE, O.G. Pressure reversal of the depressant effect of ethanol on spontaneous behavior in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 29, n. 1, p. 133-141, 1988.

- GELBARD, H.A.; TEICHER, M.H.; FAEDDA, G.; BALDESSARINI, R.J. Postnatal development of dopamine D1 and D2 receptor sites in rat striatum. **Brain Research.**, v. 49, p. 123–130, 1989.
- GESSA, G.L.; MUNTONI, F.; COLLU, M.; VARGIU, L.; MEREU, G. - Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. **Brain Res.**, v. 348, p. 201-203, 1985.
- GIEDD, J.N.; BLUMENTHAL, J.; JEFFRIES, N.O.; CASTELLANOS, F.X.; LIU, H.; ZIJDENBOS, A.; PAUS, T.; EVANS, A.C.; RAPOPORT, J.L. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. **Nat Neurosci.**, v. 2, n. 10, p. 861-863, 1999.
- GILL, K.M.; BERNSTEIN, I.L.; MIZUMORI, S.J. Immediate early gene activation in hippocampus and dorsal striatum: effects of explicit place and response training. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 87, n. 4, p. 583-596, 2007.
- GINGRICH, J.A. G CARON, M.G. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. **Annu Rev Neurosci.**, v. 16, p. 299-321, 1993, Review.
- GOELDNER, F.O.; PIGATTO, G.; RIBEIRO, A.F.; MACHADO, H.B.; BOERGEN-LACERDA, R. Influence of fluoxetine and paroxetine in behavioral sensitization induced by ethanol in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 82, n. 2, p. 388-396, 2005.
- GONZALES, R.A.; JOB, M.O.; DOVON, W.M. The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. **Pharmacol Therap.**, v. 103, p. 121-146, 2004.
- GRASSI-ZUCCONI, G.; MENEGAZZI, M.; De PRATI, A.C.; BASSETTI, A.; MONTAGNESE, P.; MANDILE, P.; COSI, C.; BENTIVOGLIO, M. c-fos mRNA is spontaneously induced in the rat brain during the activity period of the circadian cycle. **Eur J Neurosci.**, v. 5, n. 8, p. 1071-1078, 1993.
- GRAYBIEL, A.M.; MORATALLA, R.; ROBERTSON, H.A. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 87, n. 17, p. 6912-6916, 1990.
- GRAYBIEL, A.M. Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 5, n. 6, p. 733-741, 1995, Review.
- GRUART, A. & DELGADO-GARCIA, J.M. Activity-dependent changes of the hippocampal CA3-CA1 synapse during the acquisition of associative learning in conscious mice. **Genes Brain Behav.**, v. 6, n. 1, p. 24-31, 2007.
- HALL, J.; THOMAS, K.L.; EVERITT, B.J. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. **Nat Neurosci.**, v. 3, n. 6, p. 533-535, 2000.

- HALL, J.; THOMAS, K.L.; EVERITT, B.J. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 2186-2193, 2001.
- HAMLIN, A.S.; MCNALLY, G.P.; OSBORNE, P.B. Induction of c-Fos and zif268 in the nociceptive amygdala parallel abstinence hyperalgesia in rats briefly exposed to morphine. **Neuropharmacology**., v. 53, n. 2, p. 330-43, 2007.
- Hammer, R.P. Jr. & COOKE, E.S. Sensitization of neuronal response to cocaine during withdrawal following chronic treatment. **Neuroreport**. 1996; 7(12):2041-2045.
- HANCHAR, H.J.; DODSON, P.D.; OLSEN, R.W.; OTIS, T.S.; WALLNER, M. Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. **Nat Neurosci.**, v. 8, n. 3, p. 339-45, 2005.
- HARTMAN, D.S. & LANAU, F. Diversity of dopamine receptors: new molecular and pharmacological developments. **Pol J Pharmacol.**, v. 49, n. 4, p. 191-199, 1997, Review.
- HE, J. & CREWS, F.T. Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 86, n. 2, p. 327-333, 2007.
- HERDEGEN, T. & LEAH, J.D. Inducible and constitutive transcription factor in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Res. Brain Res Rev.**, v. 28, p. 370-490, 1998.
- HERMAN, J.P. & CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends Neurosci.**, v. 20, n. 2, p. 78-84, 1997, Review.
- HOFFMAN, D.C. Typical and atypical neuroleptics antagonize MK-801-induced locomotion and stereotypy in rats. **J Neural Transm Gen Sect.**, v. 89, n. 1-2, p. 1-10, 1992.
- HOFFMAN, D.C. & WISE, R.A. Locomotor-activating effects of the D2 agonist bromocriptine show environment-specific sensitization following repeated injections. **Psychopharmacology**. 1992; 7:277-284.
- HOOKS, M.S.; JONES, G.H.; LIEM, B.J.; JUSTICE, J.B. Jr. Sensitization and individual differences to IP amphetamine, cocaine, or caffeine following repeated intracranial amphetamine infusions. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 43, n. 3, p. 815-823, 1992.
- HOPE, B.; KOSOFSKY, B.; HYMAN, S.E.; NESTLER, E.J. Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 89, n. 13, p. 5764-5768, 1992.

- HUNT, W.A. & LANDS, W.E.M. A role for behavioral sensitization in uncontrolled ethanol intake. **Alcohol**, **9**:327-328, 1992.
- HURD, Y.L.; MCGREGOR, A.; PONTEN, M. In vivo amygdala dopamine levels modulate cocaine self-administration behaviour in the rat: D1 dopamine receptor involvement. **Eur J Neurosci.**, v. 9, n. 12, p. 2541-2548, 1997.
- HYMAN, S.E. & NESTLER, E.J. Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action. **Am J Psychiatry.**, v. 153, n. 2, p. 151-162, 1996, Review.
- IMPERATO, A. & DI CHIARA, G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1986; 239(1):219-228.
- IMPEY, S.; SMITH, D.M.; OBRIETAN, K.; DONAHUE, R.; WADE, C.; STORM, D. Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. **Nat Neurosci.**, v. 1, n. 7, p. 595-601, 1998.
- IRWIN, K.B.; CRAIG, A.D.; BRACHA, V.; BLOEDEL, J.R. Distribution of c-fos expression in brainstem neurons associated with conditioning and pseudo-conditioning of the rabbit nictitating membrane reflex. **Neurosci Lett.**, v. 148, n. 1-2, p. 71-75, 1992.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; BIANCHIN, M.; WALZ, R.; ZANATTA, M.S.; Da SILVA, R.C.; BUENO e SILVA, M.; RUSCHEL, A.C.; PACZKO, N. Memory processing by the limbic system: role of specific neurotransmitter systems. **Behav Brain Res.**, v. 58, n. 1-2, p. 91-98, 1993, Review.
- IZQUIERDO, I. & CAMMAROTA, M. Neuroscience Zif and the survival of memory. **Science.**, v. 304, n. 5672, p. 829-830, 2004.
- JABER, M.; ROBINSON, S.W.; MISSALE, C.; CARON, M.G. Dopamine receptors and brain function. **Neuropharmacology.**, v. 35, n. 11, p. 1503-1519, 1996, Review.
- JARVIER, K.R. & CARON M.G. Heterogeneity of dopamine receptors. **Adv Neurol.**, v. 60, p. 325-33, 1993, Review.
- JOHSON, K.; CHURCHILL, L.; KLITENICK, M.A.; HOOKS, M.S.; KALIVAS, P.W. Involvement of the ventral tegmental area in locomotion elicited from the nucleus accumbens or ventral pallidum. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 277, n. 2, p. 1122-1131, 1996.
- JONES, M.W.; ERRINGTON, M.L.; FRENCH, P.J.; FINE, A.; BLISS, T.V.; GAREL, S.; CHARNAV, P.; BOZON, B.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. **Nat. Neurosci.**, v. 4, p. 289-296, 2001.

- JONES, S.R.; MATHEWS, T.A.; BUDYGIN, E.A. Effect of moderate ethanol dose on dopamine uptake in rat nucleus accumbens in vivo. **Synapse.**, v. 60, n. 3, p. 251-255, 2006.
- KACZMAREK, L. Gene expression in learning processes. **Acta Neurobiol Exp.**, v. 60, n. 3, p. 419-424, 2000.
- KALANT, H. Stress-related effects of ethanol in mammals. **Crit Rev Biotechnol.**, v. 9, n. 4, p. 265-272, 1990, Review.
- KALIVAS, P.W. Interactions between dopamine and excitatory aminoacids in behavioral sensitization to psychostimulants. **Drug and Alcohol Dependence**, **37**:95-100, 1995.
- KALIVAS, P.W.; CHURCHILL, L.; ROMANIDES, A. Involvement of the pallidal-thalamocortical circuit in adaptive behavior. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 877, p. 64-70, 1999.
- KALIVAS, P.W. Neurocircuitry of addiction. In: DAVIS, K.L.; CHARNEY, D.; COYLE, J.T.; NEMEROFF, C. (eds). **Neuropsychopharmacology**, The fifth generation of progress. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; pp. 1357-1366, 2002.
- KALIVAS, P.W. & STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. **Brain Res. Rev.**, **16**:223-244, 1991.
- KALIVAS, P.W. & STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. **Brain Res Rev.**, v. 16, p. 223-244, 1991.
- KALIVAS, P.W. & VOLKOW, N.D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. **Am J Psychiatry.**, v. 162, n. 8, p. 1403-1413, 2005, Review.
- KALIVAS, P.W. & WEBER, B. Behavioral and neurochemical effects of acute and daily cocaine administration in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 245:1095-1102, 1988.
- KALSBECK, A.; VOORN, P.; BUIJS, R.M.; POOL, C.W.; UYLINGS, H.B. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. **J Comp Neurol.**, v. 269, p. 58-72, 1988.
- KANDEL, D.B.; DAVIES, M.; KARUS, D.; YAMAGUCHI, K. The consequences in young adulthood of adolescent drug involvement. **An overview.**, v. 43, p. 746-754, 1986.

- KATSURA, M.; TORIGOE, F.; HAYASHIDA, S.; HONDA, T.; TSUJIMURA, A.; OHKUMA, S. Ethanol physical dependence is accompanied by up-regulated expression of L-type high voltage-gated calcium channel $\alpha 1$ subunits in mouse brain. **Brain Res.**, v. 1039, n. 1-2, p. 211-215, 2005.
- KELLY, S.J.; BONTHIUS, D.J.; WEST, J.R. Developmental changes in alcohol pharmacokinetics in rats. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 11, p. 281-286, 1987.
- KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 493-495, 1997.
- KEMPERMANN, G. Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. **Bipolar Disord.**, v. 4, n. 1, p. 17-33, 2002, Review.
- KNAPP, D.J. & CREWS, F.T. Induction of cyclooxygenase-2 in brain during acute and chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 23, n. 4, p. 633-643, 1999.
- KNIERIM, J.J. Neural representations of location outside the hippocampus. **Learn Mem.**, v. 13, n. 4, p. 405-415, 2006, Review.
- KOLOMIETS, B.P.; DENIAU, J.M.; MAILLY, P.; MENETREY, A.; THIERRY, A.M. Segregation and convergence of information flow through the cortico-subthalamic pathways. **J Neurosci.**, v. 21, p. 5764-5772, 2001.
- KOMBIAN, S.B. & MALENKA, R.C. Simultaneous LTP of non-NMDA- and LTD of NMDA-receptor-mediated responses in the nucleus accumbens. **Nature**, v. 368, n. 6468, p. 242-246, 1994.
- KOOB, G.F.; SANNA, P.P.; BLOOM, F.E. Neuroscience of addiction. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 467-476, 1998, Review.
- KOOB, G.F. Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 897, p. 27-45, 1999, Review.
- KORNETSKY, C.; BAIN, G.T.; UNTERWALD, E.M.; LEWIS, M.J. Brain stimulation reward: effects of ethanol. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 12, n. 5, p. 609-616, 1988, Review.
- KOVACS, E.J. & JERRELS, T.R.; Alcohol and Immunology research interest group. Alcohol and immunology: introduction to and summary of the 2003 Alcohol and Immunology research interest group. **Alcohol**, **33** (3): 171-174, 2004.
- KREEK, M.J.; NIELSEN, D.A.; BUTELMAN, E.R.; LAFORGE, K.S. Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. **Nat Neurosci.**, v. 8, n. 11, p. 1450-1457, 2005, Review. **Nat Neurosci.**, v. 8, n. 11, p. 1450-1457, 2005, Review.

- KURTZ, D.L.; STEWART, R.B.; ZWEIFEL, M.; LI, TK; FROEHLICH, J.C. - Genetic differences in tolerance and sensitization to the sedative/hypnotic effects of alcohol. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 53(3):585-591, 1996.
- LACERDA, R.B.- **Efeitos ansiolítico e excitatório do etanol administrado aguda ou cronicamente a camundongos: um estudo da variabilidade individual.** São Paulo, 1996. Tese – Doutorado - UNIFESP, Escola Paulista de Medicina].
- LANCASTER, F.E.; BROWN, T.D.; COKER, K.L.; ELLIOTT, J.A.; WREN, S.B. Sex differences in alcohol preference and drinking patterns emerge during the early postpubertal period. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 20, n. 6, p. 1043-1049, 1996.
- LASZLO, F.A.; VARGA, C.; PAVO, I.; GARDI, J.; VECSENYES, M.; GALFI, M.; MORSCHI, E.; LASZLO, F.; MAKARA, G.B. Vasopressin pressor receptor-mediated activation of HPA axis by acute ethanol stress in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 280, n. 2, p. R458-R465, 2001.
- LAVIOLA, G.; WOOD, R.D.; KUHN, C.; FRANCIS, R.; SPEAR, L.P. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 275, n. 1, p. 345-357, 1995.
- LAVIOLA, G.; ADRIANI, W.; TERRANOVA, M.L.; GERRA, G. Psychobiologic risk factors and vulnerability to psychostimulants in adolescents and animal models. **Ann Ist Super Sanita.**, v. 36, n. 1, p. 47-62, 2000, Review.
- LEAH, J.D.; HERDEGEN, T.; MURASHOV, A. DRAGUNOW, M.; BRAVO, R. Expression of immediate early gene proteins following axotomy and inhibition of axonal transport in the rat central nervous system. **Neuroscience.**, v. 57, n. 1, p. 53-66, 1993.
- LEE, J.L.C.; EVERITT, B.J.; THOMAS, K.L. Independent cellular process for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science.**, v. 304, p. 839-843, 2004.
- LEMAIRE, P.; REVELANT, O.; BRAVO, R.; CHARNAY, P. Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 85, n. 13, p. 4691-4695, 1988.
- LE MOAL, M. In **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**, Bloom, F.E. & Kupfer, D.J. (eds) Raven Press, Ltd New York, 1995.
- LENROOT, R.K. & GIEDD, J.N. Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 30, n. 6, p. 718-729, 2006, Review.
- LESLIE, C.A.; ROBERTSON, M.W.; CUTLER, A.J.; BENNETT Jr.; J.P. Postnatal development of D1 dopamine receptors in the medial prefrontal cortex, striatum

- and nucleus accumbens of normal and neonatal 6-hydroxydopamine treated rats: a quantitative autoradiographic analysis. **Developmental Brain Research**, v. 62, p. 109–114, 1991.
- LESSOV, C.N.; PALMER, A.A.; PHILLIPS, T.J. - Voluntary ethanol drinking in C57BL/6J and DBA/2J mice before and after sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol. **Psychopharmacol.**, v. 155, p. 91-99, 2001.
- LESSOV, C.N. & PHILLIPS, T.J. - Duration of sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol in mice. **Psychopharmacol.**, v. 135, p. 374-382, 1998.
- LEUNER, B.; GOULD, E.; SHORS, T.J. Is there a link between adult neurogenesis and learning? **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 216-224, 2006, Review.
- LI, C.; PEOPLES, R.W., WEIGHT, F.F. Alcohol action on a neuronal membrane receptor: Evidence for a direct interaction with the receptor protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 8200-8204, 1994.
- LILIEQUIST, S. & ENGEL, J. Effects of GABAergic agonists and antagonists on various ethanol-induced behavioral changes. **Psychopharmacology**, v. 78, n. 1, p. 71-75, 1982.
- LIU, P.; LIU, J.; HUANG, W.; LI, M.D.; DOPICO, A.M. Distinct regions of the slow subunit determine differential BKCa channel responses to ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 27, n. 10, p. 1640-1644, 2003.
- LI, Y. & KAUER, J.A. Repeated exposure to amphetamine disrupts dopaminergic modulation of excitatory synaptic plasticity and neurotransmission in nucleus accumbens. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 1-10, 2004.
- LYVERS, M. Drug addiction as a physical disease: the role of physical dependence and other chronic drug-induced neurophysiological changes in compulsive drug self-administration. **Exp Clin Psychopharmacol.**, v. 6, n. 1, p. 107-125, 1998, Review.
- MAAS, J.W. Jr; VOGT, S.K.; CHAN, G.C.; PINEDA, V.V.; STORM, D.R.; MUGLIA, L.J. Calcium-stimulated adenylyl cyclases are critical modulators of neuronal ethanol sensitivity. **J Neurosci**, v. 25, n. 16, p. 4118-4126, 2005.
- MACK, K.J. & MACK, P.A. Induction of transcription factors in somatosensory cortex after tactile stimulation. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 12, n. 1-3, p. 141-147, 1992.
- MACKLER, S.A.; HOMAN, Y.X.; KOTUTLA, L.; CONTI, A.C.; BLENDY, J.A. The mouse nac1 gene, encoding a cocaine-regulated Bric-a-brac Tramtrac Broad complex/Pox virus and Zinc finger protein, is regulated by AP1. **Neuroscience**, v. 121, n. 2, p. 355-361, 2003.

- MALKANI, S. & ROSEN, J.B. Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. **Neuroscience.**, v. 97, n. 4, p. 693-702, 2000.
- MALKANI, S. & ROSEN, J.B. Differential expression of EGR-1 mRNA in the amygdala following diazepam in contextual fear conditioning. **Brain Res.**; v. 860, n. 1-2, p.53-63, 2000.
- MANDELZYS, A.; GRUDA, M.A.; BRAVO, R.; MORGAN, J.I. Absence of a persistently elevated 37 kDa fos-related antigen and AP-1-like DNA-binding activity in the brains of kainic acid-treated fosB null mice. **J Neurosci.**, v. 17, n. 14, p. 5407-5415, 1997.
- MANLEY, S.J. & LITTLE, H.J. Enhancement of amphetamine- and cocaine-induced locomotor activity after chronic ethanol administration. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 281, n. 3, p. 1330-1339, 1997.
- MARINKOVIC, K.; HALGREN, E.; MALTZMAN, I. Effects of alcohol on verbal processing: an event-related potential study. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 28, n. 3, p. 415-423, 2004.
- MARK, G.P.; RADA, P.; POTHOS, E.; HOEBEL, B.G. Effects of feeding and drinking on acetylcholine release in the nucleus accumbens, striatum and hippocampus of freely behaving rats. **J Neurochem.**, v. 58, p. 2269-2274, 1992.
- MARKWISE, B.J.; ACHESON, S.K.; LEVIN, E.D.; WILSON, W.A.; SWARTZWELDER, H.S. Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 22, n. 2, p. 416-421, 1998.
- MARQUES, A.C.P.R. Resenha do resumo do relatório da Organização Mundial de Saúde sobre neurociências e substâncias de abuso: pontos principais. **J. Bras. Dep. Quim.**, v. 5, n. 1, p. 51-56, 2004.
- MASTERMAN, D.L. & CUMMINGS, J.L. Frontal-subcortical circuits: the anatomical basis of executive, social and motivational behaviors. **J Psychopharmacol.**, v. 11, p. 107-114, 1997.
- MASUR, J.; SOUZA, M.L.O.; ZWICKER, A.P. - The excitatory effect of ethanol: absence in rats, no tolerance and increased sensitivity in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 1225-1228, 1986.
- MASUR, J. & BOERNGEN, R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 13, n. 6, p. 777-80, 1980.
- MATTHEWS R.P.; GUTHRIE, C.R.; WAILES, L.M.; ZHAO, X.; MEANS, A.R.; McKNIGHT, G.S. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. **Mol Cell Biol.**, v. 14, n. 9, p. 6107-6116, 1994.

- MATTHEWS, D.B.; ILGEN, M.; WHITE, A.M.; BEST, P.J. Acute ethanol administration impairs spatial performance while facilitating nonspatial performance in rats. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 72, n. 3, p. 169-179, 1999.
- MAYR, B. & MONTMINY, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 2, n. 8, p. 599-609, 2001, Review.
- McFARLAND, K.; DAVIDGE, S.B.; LAPISH, C.C.; KALIVAS, P.W. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. **J Neurosci.**, v. 24, n. 7, p. 1551-1560, 2004.
- McFARLAND, K. & KALIVAS, P.W. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. **J Neurosci.**, v. 21, n.21, p. 8655-8663, 2001.
- MILBRANDT, J. a nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science.*, v. 238, p. 797-799, 1987.
- McGUE, M.; IACONO, W.G.; LEGRAND, L.N.; ELKINS, I. Origins and consequences of age at first drink. II. Familial risk and heritability. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 25, p.1166-1173, 2001a.
- McGUE, M.; IACONO, W.G.; LEGRAND, L.N.; MALONE, S.; ELKINS, I. Origins and consequences of age at first drink. I. Associations with substance-use disorders, disinhibitory behavior and psychopathology, and P3 amplitude. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 25, p. 1156-1165,2001b.
- MELIA, K. R.; RYABININ, A. E.; CORODIMAS, K. P.; WILSON, M. C.; LEDOUX, J. E. Hippocampal-dependent learning and experience-dependent activation of the hippocampus are preferentially disrupted by ethanol. **Neurosci.**, v. 74, n. 2, p. 313–322, 1996.
- MELIS, M.; CAMARINI, R.; UNGLES, M.A.; BONCI, A. Long-lasting potentiation of GABAergic synapses in dopamine neurons after a single in vivo ethanol exposure. **J Neurosci.**, v. 22, n. 6, p. 2074-2082, 2002.
- MEREU, G. & GESSA, G.L. Low doses of ethanol inhibit the firing of neurons in the substantia nigra, pars reticulata: a GABAergic effect? **Brain Res.**, v. 360, n. 1-2, p. 325-330, 1985.
- MESNER, P.W.; EPTING, C.L.; HEGARTY, J.L.; GREEN, S.H. A timetable of events during programmed cell death induced by trophic factor withdrawal from neuronal PC12 cells. **J Neurosci.**, v. 15, n. 11, p. 7357-7366, 1995.
- MEYER, P.J.; PALMER, A.A.; McKINNON, C.S.; PHILLIPS, T.J. Behavioral sensitization to ethanol is modulated by environmental conditions, but is not associated with cross-sensitization to allopregnanolone or pentobarbital in DBA/2J mice. **Neurosci.**, v. 131, n. 2, p. 263-273, 2005.

- MEZINSKIS, J.P.; HONOS-WEBB, L.; KROPP, F.; SOMOZA, E. The measurement of craving. **J Addict Dis.**, v. 20, n. 3, p. 67-85, 2001.
- MIHIC, S.J.; YE, Q.; WICK, M.J.; KOLTCHINE, W.V.; KRASOWSKI, M.D.; FINN, S.E.; MASCIA, M.P.; VALENZUELA, C.F.; HANSON, K.K.; GREENBLATT, E.P.; HORRIS, R.A.; HARRISON, N.L. Sites of alcohol and volatile anesthetic action on GABA_A and glycine receptor. **Nature**, v. 389, p. 389-392, 1997.
- MISSALE, C.; NASH, S.R.; ROBINSON, S.W.; JABER, M.; CARON, M.G. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol Rev.**, v. 78, n. 1, p. 189-225, 1998, Review.
- MITCHEEL, J.B. & GRATTON, A. Involvement of mesolimbic dopamine neurons in sexual behaviors: implications for the neurobiology of motivation. **Rev Neurosci.**, v. 5, p. 317-329, 1994.
- MOORE, M.S.; DeZAZZO, J.; LUK, A.Y.; TULLY, T.; SINGH, C.M.; HEBERLEIN, U. Ethanol intoxication in Drosophila: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway. **Cell.**, v. 93, n. 6, p. 997-1007, 1998.
- MORATALLA, R.; ROBERTSON, H.A.; GRAYBIEL, A.M. Dynamic regulation of NGFI-A (zif268, egr1) gene expression in the striatum. **J Neurosci.**, v. 12, n. 7, p. 2609-2622, 1992.
- MORATALLA, R.; VICKERS, E.A.; ROBERTSON, H.A.; COCHRAN, B.H.; GRAYBIEL, A. M. Coordinate expression of c-fos and jun B is induced in the rat striatum by cocaine. **J Neurosci.**, v. 13, n. 2, p. 423-433, 1993.
- MORATALLA, R.; XU, M.; TONEGAWA, S.; GRAYBIEL, A.M. Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 93, n. 25, p. 14928-14933, 1996.
- MORATALLA, R.; VALLEJO, M.; ELIBOL, B.; GRAYBIEL, A.M. D1-class dopamine receptors influence cocaine-induced persistent expression of Fos-related proteins in striatum. **Neuroreport.**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 1996.
- MORGAN, J.I. & CURRAN, T. Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons. **Cell Calcium.**, v. 9, n. 5-6, p. 303-311, 1988, Review.
- MORGAN, J.I. & CURRAN, T. Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 12, n. 9, p. 343-349, 1991, Review.
- MORGAN, J.I. & CURRAN, T. Immediate-early genes: ten years on. **Trends Neurosci.**, v. 18, n. 2, p. 66-67, 1995, Review.
- MORGENSON, G.; JONES, D.; YIM, C.Y. From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. **Prog Neurobiol.**, v. 14, p. 69-97, 1980.

- MORROW, B.A.; ELSWORTH, J.D.; LEE, E.J.; ROTH, R.H.. Divergent effects of putative anxiolytics on stress-induced fos expression in the mesoprefrontal system of the rat. **Synapse**, v. 36, n. 2, p. 143-154, 2000.
- MORROW, B.A.; ELSWORTH, J.D.; ROTH, R.H. Male rats exposed to cocaine in utero demonstrate elevated expression of Fos in the prefrontal cortex in response to environment. **Neuropsychopharmacol.**, v. 26, n. 3, p. 275-285, 2002.
- MORZORATI, S.L. & MARUNDE, R.L. Comparison of VTA dopamine neuron activity in lines of rats selectively bred to prefer or avoid alcohol. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 30, n. 6, p. 991-997, 2006.
- MURRIN, L.C. & ZENG, W. Postnatal ontogeny of dopamine D2 receptors in rat striatum. **Biochem Pharmacol.**, v. 35, p. 1159-1162, 1986.
- MUTSCHLER, N.H.; MICZEK, K.A.; HAMMER, R.P. Jr. Reduction of zif268 messenger RNA expression during prolonged withdrawal following "binge" cocaine self-administration in rats. **Neurosci.**, v. 100 n. 3, p. 531-538, 2000.
- NAKAJIMA, A.; YAMADA, K.; HE, J.; ZENG, N.; NITTA, A.; NABESHIMA, T. Anatomical substrates for the discriminative stimulus effects of methamphetamine in rats. **J Neurochem.**, v. 91 n. 2, p. 308-317, 2004.
- NAYLOR, J.C.; SIMSON, P.E.; GIBSON, B.; SCHNEIDER, A.M.; WILKINS, E.; FIRESTONE, A.; CHUY, M. Ethanol inhibits spontaneous activity of central nucleus of the amygdala neurons but does not impair retention in the passive-avoidance task. **Alcohol Clin Exp Res. Nov.**, v. 25, n. 11, p. 1683-1688, 2001.
- NESTLER, E.J. Hard target: understanding dopaminergic neurotransmission. **Cell.**, v. 79, n. 6, p. 923-926, 1994, Review.
- NESTLER, E.J.; KELZ, M.B.; CHEN, J. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. **Brain Res.**, v. 835, n. 1, p. 10-17, 1999, Review.
- NESTLER, E.J. Molecular neurobiology of addiction. **Am J Addict.**, v. 10, n. 3, p. 201-217, 2001, Review.
- NESTLER, E.J. Molecular mechanisms of drug addiction. **Neuropharmacol.**, v. 47, n. 1, p. 24-32, 2004, Review.
- NEWLIN, D.B. & THOMSON, J.B. Alcohol challenge with sons of alcoholics: a critical review and analysis. **Psychol Bull.**, v. 108, n. 3, p. 383-402, 1990, Review.
- NYE, H.E. & NESTLER, E.J. Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration. **Mol Pharmacol.**, v. 49, n. 4, p. 636-645, 1996.
- OADES, R.D. & HALLIDAY, G.M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology: 1. Anatomy and connectivity. **Brain Res.**, v. 434, p. 117-165, 1987.

- O'DONNELL, P.; GREENE, J.; PABELLO, N.; LEWIS, B.L.; GRACE, A.A. Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. **Ann NY Acad Sci.**, v. 877, p. 157-175, 1999.
- O'DONOVAN, K.J.; TOURTELLOTTE, W.G.; MILLBRANDT, J.; BARABAN, J.M. The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. **Trends Neurosci.**, v. 22, n. 4, p. 167-173, 1999, Review.
- O'MALLEY, P.M.; JOHNSTON, L.D.; BACHMAN, J.G. Alcohol use among adolescents. **Alcohol Health Res World**, v. 22, p. 85-93, 1998.
- OTANI, K.; KORENAGA, M.; BEARD, M.R.; LI, K.; QUIAN, T.; SHOWALTER, L.A.; SINGH, A.; WANG, T.; WEINMAN, S.A. Hepatitis C virus core protein, cytochrome P450 2E1, and alcohol produce combined mitochondrial injury and cytotoxicity in hepatoma cells. **Gastroenterology**, v. 128, n. 1, p. 96-107, 2005.
- OTMAKHOVA, N.A.; LISMAN, J.E. D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. **J Neurosci.**, v. 16, n. 23, p. 7478-7486, 1996.
- PARTRIDGE, J.G.; TANG, K.C.; LOVINGER, D.M. Regional and postnatal heterogeneity of activity-dependent long-term changes in synaptic efficacy in the dorsal striatum. **J Neurophysiol.**, v. 84, n. 3, p. 1422-1429, 2000.
- PENNARTZ, C.M.A.; GROENEWEGEN, H.J.; LOPEZ da SILVA, F.H. The nucleus accumbens as a complex functionally distinct neuronal ensembles: na integration of behavioral, electrophysiological and anatomical data. **Prog Neurobiol.**, v. 42, p. 719-761, 1994.
- PEOPLES, R.W.; LI, C.; WEIGHT, F.F. Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 36, p.185-201, 1996.
- PEPER, M.; HERPERS, M.; SPREER, J.; HENNING, J.; ZENTNER, J. Functional neuroimaging of emotional learning and autonomic reactions. **J Physiol Paris**, v. 99, n. 4-6, p. 342-354, 2006, Review.
- PERT, A.; POST, R.; WEISS, S.R. Conditioning as a critical determinant of sensitization induced by psychomotor stimulants. **NIDA Res. Monogr.**, v. 97, p. 208-241, 1990.
- PEZZONE, M.A.; LEE, W.S.; HOFFMAN, G.E.; RABIN, B.S. Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. **Brain Res.**, v. 597, n. 1, p. 41-50, 1992.

- PHILLIPS, T.J.; DICKINSON, S.; BURKHART-KASCH, S. Behavioral sensitization to drug stimulant effects in C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. **Behav. Neurosci.**, v. 108, p. 789-803, 1994.
- PHILLIPS, T.J.; HUSON, M.; GWIAZDON, C.; BURKHART-KASCH, S.; SHEN, E.H. - Effects of acute and repeated ethanol exposures on the locomotor activity of BXD recombinant inbred mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 19, p. 269-278, 1995.
- PHILLIPS, T.J.; ROBERTS, A.J.; LESSOV, C.N. Behavioral sensitization to ethanol: genetics and the effects of stress. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 57, p. 487-493, 1997.
- PHILPOT, R.M.; BADANICH, K.A.; KIRSTEIN, C.L. Place conditioning: age-related changes in the rewarding and aversive effects of alcohol. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 27, p. 593-599, 2003.
- PHILPOT, R. & KIRSTEIN, C. Developmental differences in the accumbal dopaminergic response to repeated ethanol exposure. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1021, p. 422-6, 2004.
- PIERCE, R.C. & KUMARESAN, V. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 30, n. 2, p. 215-238, 2006, Review.
- PREDIGER, R.D. & TAKAHASHI, R.N. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. **Eur J Pharmacol.**, v. 462, n. 1-3, p. 115-123, 2003.
- PRESCOTT, C.A. & KENDLER, K.S. Age at first drink and risk for alcoholism: a non casual association. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 23, p. 101-107, 1999.
- PYAPALI, G.K.; TURNER, D.A.; WILSON, W.A.; SWARTZWELDER, H.S. Age and dose-dependent effects of ethanol on the induction of hippocampal long-term potentiation. **Alcohol.**, v. 19, n. 2, p. 107-111, 1999.
- QUADROS, I.M.; HIPÓLIDE, D.C.; FRUSSA-FILHO, R.; De LUCCA, E.M.; NOBREGA, J.N.; SOUZA-FORMIGONI, M.L. Resistance to ethanol sensitization is associated with increased NMDA receptor binding in specific brain áreas. **Eur J Pharmacol.**, v. 442, n. 1-2, p. 55-61, 2002.
- RASSNICK, S.; HEINRICHS, S.C.; BRITTON, K.T.; KOOB, G.F. Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. **Brain Res.**, v. 605, n. 1, p. 25-32, 1993.

- ROBERTS, A.J.; LESSOV, C.N.; PHILLIPS, T.J. - Critical role for glucocorticoid receptors in stress- and ethanol-induced locomotor sensitization. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 275, p. 790-797, 1995.
- ROBINSON, T.E. & BECKER, J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Res. Rev.**, v. 11, p.157-198, 1986.
- ROBINSON, T.E. & BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res. Rev.**, v. 18, p. 247-291, 1993.
- ROBINSON, T.E. & BERRIDGE, K.C. Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**, v. 96, p. 103-114, 2001.
- ROBINSON T.E.; & BERRIDGE KC – Addiction. **Ann Rev. Psychol.**, v. 54, n. 1, p. 25-53, 2003.
- ROBINSON, T.E. & KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 33-46, 2004.
- RODRIGUEZ-SANCHEZ, M.N.; PUEBLA, L.; LOPEZ-SANUDO, S.; RODRIGUEZ-MARTIN, E.; MARTIN-ESPINOSA, A.; RODRIGUEZ-PENA, M.S.; JUARRANZ, M.G.; ARILLA, E. Dopamine enhances somatostatin receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in rat striatum and hippocampus. **J Neurosci Res.**, v. 48, n. 3, p. 238-248, 1997.
- ROLLS, E.T. & TREVES, A. Neural Networks and brain function. Mew York, Oxford University Press, 1998.
- ROSENBERG, D.R. & LEWIS, D.A. Changes in the dopaminergic innervation of monkey prefrontal cortex during late postnatal development: a tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. **Biol Psychiatry**, v. 36, n. 272-277, 1994.
- ROSSETTI, Z.L.; LAI, M.; HMAIDAN, Y.; GESSA, G.L. Depletion of mesolimbic dopamine during behavioral despair: partial reversal by chronic imipramine. **Eur J Pharmacol.**, v. 242, n. 3, p. 313-315, 1993.
- RUNKORG, K.; VERAKSITS, A.; KURRIKOFF, K.; LUUK, H.; RAUD, S.; ABRAMOV, U.; MATSUI, T.; BOURIN, M.; KOKS, S; VASAR, E. Distinct changes in the behavioural effects of morphine and naloxone in CCK2 receptor-deficient mice. **Behav Brain Res.**, v. 144, n. 1-2, p. 125-35, 2003.
- RYABININ, A.E. Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies. **Psychopharmacol. (Berl)**, v. 139, n. 1-2, p. 34-43, 1998, Review.

- SAGAR, S.M.; SHARP, F.R.; CURRAN, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1328-1331, 1988.
- SALMINEN, O.; LAHTINEN, S.; AHTEE, L. Expression of Fos protein in various rat brain areas following acute nicotine and diazepam. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 54, n. 1, p. 241-248, 1996.
- SALMINEN, O.; SEPPA, T.; GADDNAS, H.; AHTEE, L. The effects of acute nicotine on the metabolism of dopamine and the expression of Fos protein in striatal and limbic brain areas of rats during chronic nicotine infusion and its withdrawal. **J Neurosci.**, v. 19, n. 18, p. 8145-8151, 1999.
- SAMSON, H.H.; HODGE, C.W.; ERICKSON, H.L.; NIEHUS, J.S.; GERHARDT, G.A.; KALIVAS, P.W.; FLOYD, E.A. The effects of local application of ethanol in the n. accumbens on dopamine overflow and clearance. **Alcohol.**, v. 14, n. 5, p. 485-492, 1997.
- SAMSON, H.H. The microstructure of ethanol drinking: genetic and behavioral factors in the control of drinking patterns. **Addiction.**, v. 95, n. 2, p. S61-S72, 2000.
- SCHINGENSIEPEN, K.H.; LUNO, K.; BRYSCH, W. High basal expression of the zif/268 immediate early gene in cortical layers IV and VI, in CA1 and in the corpus striatum--an in situ hybridization study. **Neurosci Lett.**, v. 122, n. 1, p. 67-70, 1991.
- SCHNEIDER, F.; HABEL, U.; WAGNER, M.; FRANKE, P.; SALLOUM, J.B.; SHAH, N.J.; TONI, I.; SULZBACH, C.; HONING, K.; MAIER, W.; GAEBEL, W.; ZILLES, K. Subcortical correlates of craving in recently abstinent alcoholic patients. **Am J Psychiatry.**, v. 158, n. 7, p. 1075-1083, 2001.
- SCHRAMM, N.L.; EGLI, R.E.; WINDER, D.G. LTP in the mouse nucleus accumbens is developmentally regulated. **Synapse.**, v. 45, n. 4, p. 213-219, 2002.
- SCHRAMM-SAPYTA, N.L.; PRATT, A.R.; WINDER, D.G. Effects of periadolescent versus adult cocaine exposure on cocaine conditioned place preference and motor sensitization in mice. **Psychopharmacol. (Berl.)**, v. 173, n. 1-2, p. 41-48, 2004.
- SCHROEDER, B.E.; BINZAK, J.M.; KELLEY, A.E. A common profile of prefrontal cortical activation following exposure to nicotine- or chocolate-associated contextual cues. **Neurosci.**, v. 105, n. 3, p. 535-545, 2001.
- SCHUCKIT, M.A. Behavioral effects of alcohol in sons of alcoholics. **Recent Dev Alcohol.**, v. 3, p. 11-19, 1985.
- SCIVOLETTO, G.; PETRELLI, A.; LUCENT, L.D.; GIANNANTONI, A.; FUOCO, U.; D'AMBROSIO, F.; FILIPPINI, V. One year follow up of spinal cord injury patients using a reciprocating gait orthosis: preliminary report. **Spinal Cord.**, v. 38, n. 9, p. 555-558, 2000.

- SEEMAN, P. & VAN TOL, H.H. Dopamine receptor pharmacology. **Curr Opin Neurol Neurosurg.**, v. 6, n. 4, p. 602-608, 1993, Review.
- SEIBEL, S. D. & TOSCANO Jr., A. Conceitos básicos e classificação geral das substâncias psicoativas. In S. D. Seibel & A. Toscano Jr. (Orgs.), **Dependência de drogas**. São Paulo: Atheneu, p. 1-6, 2001.
- SELF, D.W.; McCLENAHAN, A.W.; BEITNER-JOHNSON, D.; TERWILLIGER, R.Z.; NESTLER, E.J. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to heroin self-administration. **Synapse**, v. 21, n. 4, p. 312-318, 1995.
- SEPPA, T.; SALMINEN, O.; MOED, M.; AHTEE, L. Induction of Fos-immunostaining by nicotine and nicotinic receptor antagonists in rat brain. **Neuropharmacol.**, v. 41, n. 4, p. 486-495, 2001.
- SHAW-LUTCHMAN, T.Z.; BARROT, M.; WALLACE, T.; GILDEN, L.; ZACHARIOU, V.; IMPEY, S.; DUMAN, R.S.; STORM, D.; NESTLER, E.J. Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. **J Neurosci.**, v. 22, n. 9, p. 3663-3672, 2002.
- SHAW-LUTCHMAN, T.Z.; IMPEY, S.; STORM, D.; NESTLER, E.J. Regulation of CRE-mediated transcription in mouse brain by amphetamine. **Synapse**, v. 48, n. 1, p. 10-17, 2003.
- SHAYWITZ, A.J.; GREENBERG, M.E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. **Annu Rev Biochem.**, v. 68, p. 821-861, 1999. Erratum in: *Annu Rev Biochem.*, v. 72, p. vii, 2003.
- SHIM, I.; JAYALID, J.I.; WIRTSHAFTER, D.; JANG, S.Y.; SHIN, K.H.; LEE, H.J.; CHENG, Y.C.; CHUN, B.G. Nicotine-induced behavioral sensitization is associated with extracellular dopamine release and expression of c-Fos in the striatum and nucleus accumbens of the rat. **Behav Brain Res.**, v. 121, n. 1-2, p. 137-147, 2001.
- SHIPPENBERG, T.S.; CHEFER, V.I.; ZAPATA, A.; HEIDBREDER, C.A. Modulation of the behavioral and neurochemical effects of psychostimulants by kappa-opioid receptor systems. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 937, p. 50-73, 2001, Review.
- SIBLEY, D.R.; MONSMA, F.J. Jr; SHEN, Y. Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. **Int Rev Neurobiol.**, v. 35, p. 391-415, 1993, Review.
- SMITH, M.A.; BANERJEE, S.; GOLD, P.W.; GLOWA, J. Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. **Brain Res.**, v. 578, n. 1-2, p. 135-141, 1992.
- SNEDECOR, G.W. In *Statistical Methods*, 4^o edition, **Ames, Iowa State College Press**, 1946.

- SOLDERA, M.; DALGALARRONDO, P.; CORREA FILHO, H.R.; SILVA, C.A. Heavy alcohol use among elementary and high-school students in downtown and outskirts of Campinas City-Sao Paulo: prevalence and related factors. **Rev Bras Psiquiatr.**, v. 26, n. 3, p. 174-179, 2004.
- SOMMER, W.; HYYTIA, P.; KIIANMAA, K. The alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats: neurobiology of the regulation of alcohol drinking. **Addict Biol.**, v. 11, n. 3-4, p. 289-309, 2006, Review.
- SOUZA-FORMIGONI, M.L.; De LUCCA, E.M.; HIPÓLIDE, D.C.; ENNS, S.C.; OLIVEIRA, M.G.; NOBREGA, J.N. Sensitization to ethanol's stimulant effect is associated with region-specific increases in brain D2 receptor binding. **Psychopharmacol.**, v. 146, n. 3, p. 262-267, 1999.
- SPEAR, L.P. & BRICK, J. Cocaine-induced behavior in the developing rat. **Behav Neural Biol.**, v. 26, n. 4, p. 401-415, 1979.
- SPEAR, L.P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 24, p. 417-463, 2000.
- SPEAR, L.P. Adolescent brain development and animal models. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1021, p. 23-26, 2004, Review.
- STEKETEE, J.D. Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. **Brain Res Brain Res Rev.**, v. 41, n. 2-3, p. 203-228, 2003, Review.
- STEVENSON, C.W. & GRATTON, A. Basolateral amygdala modulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress: role of the medial prefrontal cortex. **Eur J Neurosci.**, v. 17, n. 6, p. 1287-1295, 2003.
- STEWART, J. Reinstatement of heroin and cocaine self-administration behavior in the rat by intracerebral application of morphine in the ventral tegmental area. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 20, n. 6, p. 917-923, 1984.
- STEWART, J. & VEZINA, P. A comparison of the effects of intra-accumbens injections of amphetamine and morphine on reinstatement of heroin intravenous self-administration behavior. **Brain Res.**, v. 457, n. 2, p. 287-294, 1988.
- SWANSON, L.W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. **Brain Res.**, v. 886, p. 113-164, 2000.
- SUKHATME, V.P.; CAO, X.M.; CHANG, L.C.; TSAI-MORRIS, C.H.; STAMENKOVICH, D.; FERREIRA, P.C.; COHEN, D.R.; EDWARDS, S.A.; SHOWS, T.B.; CURRAN, T. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. **Cell.**, v. 53, n. 1, p. 37-43, 1988.
- TAJUDDIN, N.F. & DRUSE, M.J. Effects of chronic ethanol consumption and aging on proenkephalin and neurotensin. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 22, n. 5, p.1152-1160, 1998.

- TAMBOUR, S.; DIDONE, V.; TIRELLI, E.; QUERTEMENT, E. Locomotor effects of ethanol and acetaldehyde after peripheral and intraventricular injections in Swiss and C57BL/6J mice. **Behav Brain Res.**, v. 172, n. 1, p. 145-154, 2006.
- TANG, L.; TODD, R.D.; HELLER, A.; O'MALLEY, K.L. Pharmacological and functional characterization of D2, D3 and D4 dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 268, n. 1, p. 495-502, 1994. Erratum in: **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 270, n. 3, p. 1397, 1994.
- TANI, K.; IYO, M.; MATSUMOTO, H.; KAWAI, M.; SUZUKI, K.; IWATA, Y.; WON, T.; TSUKAMOTO, T.; SEKINE, Y.; SAKANOE, M.; HASHIMOTO, K.; OHASHI, Y.; TAKEI, N.; MORI, N. The effects of dentate granule cell destruction on behavioural activity and Fos protein expression induced by systemic methamphetamine in rats. **Br J Pharmacol.**, v. 134, n. 7, p. 1411-1418, 2001.
- TARAZI, F.I.; TOMASINI, E.C.; BALDESSARINI, R.J. Postnatal development of dopamine D4-like receptors in rat forebrain regions: comparison with D2-like receptors. **Develop Brain Res.**, v. 110, p. 227-233, 1998.
- TARAZI, F.I.; TOMASINI, E.C.; BALDESSARINI, R.J. Postnatal development of dopamine D1-like receptors in rat cortical and striatolimbic brain regions: an autoradiographic study. **Develop Neurosci.**, v. 21, p. 43-49, 1999.
- TARAZI, F.I.; BALDESSARINI, R.J. Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain. **Int J Dev Neurosci.**, v. 18, p. 29:37, 2000.
- TARTER, R.; VANYUKOV, M.; GIANCOLA, P.; DAWES, M.; BLACKSON, T.; MEZZICK, A.; CLARCK, D.B. Etiology of early age onset substance use disorder: a maturational perspective. **Dev Psychopathol.**, v. 11, p. 657-683, 1999.
- TAYLOR, S.S.; BUECHLER, J.A.; TONEMOTO, W. cAMP-dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatory enzymes. **Annu Rev Biochem.**, v. 59, p. 971-1005, 1990.
- TEICHER, M.H.; ANDERSEN, S.L.; HOSTETTER Jr., J.C. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. **Brain Res Dev Brain Res.**, v. 89, p. 176-172, 1995.
- THIELE, T.E.; WILLIS, B.; STADLER, J.; REYNOLDS, J.G.; BERNSTEIN, I.L.; McKNIGHT, G.S. High ethanol consumption and low sensitivity to ethanol-induced sedation in protein kinase A-mutante mice. **J. Neurosci.**, v. 20, p. RC75, 2000.
- THOMAS, M.J.; MALENKA, R.C.; BONCI, A. Modulation of long-term depression by dopamine in the mesolimbic system. **J Neurosci.**, v. 20, n. 15, p. 5581-5586, 2000.

- THOMAS, K.L.; HALL, J.; EVERITT, B.J. Cellular imaging with zif268 expression in the rat nucleus accumbens and frontal cortex further dissociates the neural pathways activated following the retrieval of contextual and cued fear memory. **Eur. J. Neurosci.**, v. 16, p. 1789-1796, 2002.
- TODTENKOPF, M.S.; MIHALAKOPOULOS, A.; STELLAR, J.R. Withdrawal duration differentially affects c-fos expression in the medial prefrontal cortex and discrete subregions of the nucleus accumbens in cocaine-sensitized rats. **Neurosci.**, v. 114, n. 4, p. 1061-1069, 2002.
- TODTENKOPF, M.S. & CARLEZON Jr, W.A. Contribution of drug doses and conditioning periods to psychomotor stimulant sensitization. **Psychopharmacol.**, v. 185, n. 4, p. 451-458, 2006.
- TORRES, G. & RIVIER, C. Differential effects of intermittent or continuous exposure to cocaine on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and c-fos expression. **Brain Res.**, v. 571, n. 2, p. 204-211, 1992.
- TRUJILLO, K.A. & AKIL, H. Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. **Drug Alcohol Depend.**, v. 38, p. 139-154, 1995.
- TRUXELL, E. & SPEAR, N.E. Immediate acceptance of ethanol in infant rats: ontogenetic differences with moderate but not high ethanol concentration. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 28, n. 8, p. 1200-1211, 2004.
- TU, Y.; KROENER, S.; ABERNATHY, K.; LAPISH, C.; SEAMANS, J.; CHANDLER, L.J.; WOODWARD, J.J. Ethanol inhibits persistent activity in prefrontal cortical neurons. **J Neurosci.**, v. 27, n. 17, p. 4765-4775, 2007.
- TUPALA, E. & TJIHANEN J. Dopamine and alcoholism: neurobiological basis of ethanol abuse. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychi.**, v. 28, p. 1221-1247, 2004.
- TURGEON, S.M.; POLLACK, A.E.; FINK, J.S. Enhanced CREB phosphorylation and changes in c-Fos and FRA expression in striatum accompany amphetamine sensitization. **Brain Res.**, v. 749, n. 1, p. 120-126, 1997.
- TZSCHENTKE, T.M. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. **Prog Neurobiol.**, v. 63, n. 3, p. 241-320, 2001, Review.
- UNDIE, A.S.; BERKI, A.C.; BEARDSLEY, K. Dopaminergic behaviors and signal transduction mediated through adenylate cyclase and phospholipase C pathways. **Neuropharmacol.**, v. 39, n. 1, p. 75-87, 2000.
- URBANO-MARQUEZ, A. & FERNANDEZ-SOLA, J. Effects of alcohol on skeletal and cardiac muscle. **Muscle Nerve.**, v. 30, n. 6, p. 689-707, 2004.
- USLANER, J.; BADIANI, A.; DAY, H.E.; WATSON, S.J.; AKIL, H.; ROBINSON, T.E. Environmental context modulates the ability of cocaine and amphetamine to

- induce c-fos mRNA expression in the neocortex, caudate nucleus, and nucleus accumbens. **Brain Res.**, v. 920, n. 1-2, p. 106-116, 2001.
- VALENZUELA, C.F. & HARRIS, R.A. IN: LOWINSON, J.H; RUIA, P.; MILLMAN, R.B.; LANGROD, J.G. (EDS). **Substance Abuse**, Third Edition, Baltimore, Maryland, USA, p. 119-142, 1997.
- VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 24, n. 1, p. 125-132, 2000, Review.
- VAN ETEN M.L. & ANTHONY, J.C. Comparative epidemiology of initial drug opportunities and transitions to first use: marijuana, cocaine, hallucinogens and heroin. **Drug Alcohol Depend.**, v. 54, p. 117-125, 1999.
- VALIENT, E.; PAGES, C.; HERVE, D.; GIRAULT, J.A.; CABOCHE, J. Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. **Eur J Neurosci.**, v. 19, n. 7, p. 1826-1836, 2004.
- VALJENT, E.; AUBIER, B.; CORBILLE, A.G.; BRAMI-CHERRIER, K.; CABOCHE, J.; TOPILKO, P.; GIRAULT, J.A.; HERVE, D. Plasticity-associated gene Krox24/Zif268 is required for long-lasting behavioral effects of cocaine. **J Neurosci.**, v. 26, n. 18, p. 4956-4960, 2006. Erratum in: **J Neurosci.**, v. 26, n. 20, p. table of contents, 2006.
- VALLES, S.L.; BLANCO, A.M.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. **Brain Pathol.**, v. 14, n. 4, p. 365-371, 2004.
- VAN PRAAG H.; CHRISTIE, B.R.; SEINOWSKI, T.J.; GAGE F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 96, n. 23, p. 13427-3431, 1999.
- VANGVERAVONG, S.; McELVEEN, E.; TAYLOR, M.; XU, J.; TU, Z.; LUEDTKE, R.R.; MACH, R.H. Synthesis and characterization of selective dopamine D2 receptor antagonists. **Bioorg Med Chem.**, v. 14, n. 3, p. 815-825, 2006.
- VEZINA, P. & STEWART, J. Amphetamine administered to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens sensitizes rats to systemic morphine: lack of conditioned effects. **Brain Res.**, v. 516, n.1, p. 99-106, 1990.
- VEZINA, P. D1 dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. **J Neurosci.**, v. 16, n. 7, p. 2411-2420, 1996.
- VEZINA, P. & STEWART, J. The effects of dopamine receptor blockade on the development of sensitization to the locomotor activating effects of amphetamine and morphine. **Brain Res.**, v. 499, p. 108-120, 1989.

- VOLLM, B.A.; de ARAUJO, I.E.; COWEN, P.J.; ROLLS, E.T.; KRINGELBACH, M.L.; SMITH, K.A.; JEZZARD, P.; HEAL, R.J.; MATTHEWS, P.M. Methamphetamine activates reward circuitry in drug naive human subjects. **Neuropsychopharmacol.**, v. 29, n. 9, p. 1715-1722, 2004.
- WALLNER, M.; HANCHAR, H.J.; OLSEN, R.W. Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 100, n. 25, p. 15218-15223, 2003. Comment in: **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 101, n. 1, p. 2-3, 2004.
- WALLNER, M.; HANCHAR, H.J.; OLSEN, R.W. Low dose acute alcohol effects on GABA A receptor subtypes. **Pharmacol Ther.**, v. 112, n. 2, p. 513-528, 2006, Review.
- WALTERS, C.L.; KUO, Y.C.; BLENDY, J.A. Differential distribution of CREB in the mesolimbic dopamine reward pathway. **J Neurochem.**, v. 87, n. 5, p. 1237-1244, 2003.
- WANG, J.Q.; SMITH, A.J.; MCGINTY, J.F. A single injection of amphetamine or methamphetamine induces dynamic alterations in c-fos, zif/268 and preprodynorphin messenger RNA expression in rat forebrain. **Neurosci.**, v. 68, n. 1, p. 83-95, 1995.
- WEISS, F.; LORANG, M.T.; BLOOM, F.E.; KOOB, G.F. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 267, n. 1, p. 250-258, 1993.
- WEISS, F. & PORRINO, L.J. Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. **J Neurosci.**, v. 22, n. 9, p. 3332-3337, 2002. Comment in: **J Neurosci.**, V. 22, n. 9, p. 3303-3305, 2002.
- WHITE, F.J. Synaptic regulation of mesocorticolimbic dopamine neurons. **Annu Rev Neurosci.**, v. 19, p. 405-436, 1996, Review.
- WHITE, A.M.; GHIA, A.J.; LEVIN, E.D.; SWARTZWELDER, H.S. Binge pattern ethanol exposure in adolescent and adult rats: differential impact on subsequent responsiveness to ethanol. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 24, n. 8, p. 1251-1256, 2000.
- WHITE, A.M. & SWARTZWELDER, H.S. Age-related effects of alcohol on memory and memory-related brain function in adolescents and adults. **Recent Dev Alcohol.**, v. 17, p. 161-176, 2005.
- WISE, R.A. The role of reward pathways in the development of drug dependence. **Pharmacol Ther.**, v. 35, p. 227-263, 1987.

- WISE, R.A. & LEEB, K. Psychomotor – stimulant sensitization: a unitary phenomenon? **Behav Pharmacol.**, v. 4, p. 339-349, 1993.
- WICK, M.J.; MIHIC, S.J.; UENO, S.; MASCÍA, M.P.; TRUDELL, J.R.; BROZOWSKI, S.J.; YE, Q.; HARRISON, N.L.; HARRIS, R.A. Mutations of γ -aminobutyric acid and glycine receptors change alcohol cutoff: Evidence for an alcohol receptor? **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 95, p. 6504-6509, 1998.
- WISE, R.A. & BOZARTH, M.A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol Rev.**, v. 94, n. 4, p. 469-492, 1987, Review.
- WOLF, M.E.; WHITE, F.J.; NASSAR, R.; BROODERSON, R.J.; KANSA, M.R. Differential development of auto-receptor subsensitivity and enhanced dopamine release during amphetamine sensitization. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 264, n. 1, p. 249-255, 1993.
- WOLF, M.E. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. **Prog Neurobiol.**, v. 54, n. 6, p. 679-720, 1998, Review.
- WONG, W. & SCOTT, J.D. AKAP signalling complexes: Focal points in space and time. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 5, p. 959-970, 2004.
- YAO, L.; ASAI, K.; JIANG, Z.; ISHII, A.; FAN, P.; GORDON, A.S.; DIAMOND, I. Dopamine D2 receptor inhibition of adenylyl cyclase is abolished by acute ethanol but restored after chronic ethanol exposure (tolerance). **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 298, n. 2, p. 833-839, 2001.
- YIM, H.J. & GONZALES, R.A. Ethanol-induced increases in dopamine extracellular concentration in rat nucleus accumbens are accounted for by increased release and not uptake inhibition. **Alcohol.**, v. 22, n. 2, p. 107-115, 2000.
- YIM, H.J.; ROBINSON, D.L.; WHITE, M.L.; JAWORSKI, J.N.; RANDALL, P.K.; LANCASTER, F.E.; GONZALES, R.A. Dissociation between the time course of ethanol and extracellular dopamine concentrations in the nucleus accumbens after a single intraperitoneal injection. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 24, n. 6, p. 781-788, 2000.
- YOSHIMOTO, K.; McBRIDE, W.J.; LUMENG, L.; LI, T.K. Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. **Alcohol.**, v. 9, n. 1, 17-22, 1992.
- YOSHIMOTO, K.; YAYAMA, K.; SORIMACHI, Y.; TANI, J.; OGATA, M.; NISHIMURA, A.; YOSHIDA, T.; UEDA, S.; KOMURA, S. Possibility of 5-HT₃ receptor involvement in alcohol dependence: a microdialysis study of nucleus accumbens dopamine and serotonin release in rats with chronic alcohol consumption. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 20, n. 9, p. 311A-319A, 1996.

- YOSHIMURA, M.; PEARSON, S.; KADOTA, Y.; GONZALES, C.E. Identification of ethanol responsive domains of adenylyl cyclase. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 30, n. 11, p. 1824-1832, 2006.
- ZINKERNAGEL, C.; NAEF, M.R.; BUCHER, H.C.; LADEWIG, D.; GYR, N.; BATTEGAY, M. Onset and pattern of substance use in intravenous drug users of an opiate maintenance program. **Drug Alcohol Depend.**, v. 64, p. 105-109, 2001.

ANEXO

ANEXO I: Protocolo utilizado para imuno-histoquímica:

I - Incubação no anticorpo primário:

Diluir o anticorpo primário 1:500-1:2000 em 0,3% de Triton X-100 mais 5-10% de soro normal do animal em que foi feito o anticorpo secundário em PB 0,1M. Por exemplo: se o secundário for uma IgG anti-rato feito em cabra, utilize o soro de cabra juntamente com o primário. Incubar os cortes da noite para o dia.

Lavar 3 vezes, durante 10 minutos, em PB 0,1M.

II - Incubação no anticorpo secundário:

Diluir o anticorpo marcado com biotina 1:200 em 0,3% de Triton X-100 em PB 0,1M e incubar por 2 horas.

Lavar 3 vezes, durante 10 minutos, em PB 0,1M.

III - Incubação no Kit ABC

Diluir as soluções A e B do Kit ABC 1:100 em 0,3 % de Triton X-100 ABC em PB 0,1 M contendo NaCl e incubar por 1 hora.

Lavar 3 vezes, durante 10 minutos, em PB 0,1M.

Obs.: a solução de ABC deve ser preparada pelo menos meia hora antes de ser usada.

IV - Revelação com diaminobenzidina (DAB)

Diluir 25mg de DAB em 100ml de PB 0,1M.

Pré-incubar os cortes nesta solução por alguns minutos.

Adicionar 3 ml de H₂O₂ 0,3% (100µl de H₂O₂ em 10 ml de H₂O destilada) e esperar o necessário para visualizar a marcação marrom.

Lavar várias vezes por 10 minutos em PB 0,1M.