Priscila Fernandes Carrara do Nascimento

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL EM CAMUNDONGOS
ADOLESCENTES E ADULTOS: COMPORTAMENTOS
RELACIONADOS À RECOMPENSA, SENSIBILIZAÇÃO
COMPORTAMENTAL E O PAPEL DOS SISTEMAS
DOPAMINÉRGICO E GLUTAMATÉRGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

Priscila Fernandes Carrara do Nascimento

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL EM CAMUNDONGOS
ADOLESCENTES E ADULTOS: COMPORTAMENTOS
RELACIONADOS À RECOMPENSA, SENSIBILIZAÇÃO
COMPORTAMENTAL E O PAPEL DOS SISTEMAS
DOPAMINÉRGICO E GLUTAMATÉRGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Camarini

Versão Original

São Paulo
2011

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

Nascimento, Priscila Fernandes Carrara do

Efeitos da exposição ao etanol em camundongos adolescentes e adultos: comportamentos relacionados à recompensa, sensibilização comportamental e o papel dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico. / Priscila Fernandes Carrara do Nascimento. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Rosana Camarini.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neuroquímica e Farmacologia comportamental.

Versão do título para o inglês: Effects of ethanol exposure in adolescent and adult mice: behaviors related to reward, behavioral sensitization and the role of the dopaminergic and glutamatergic systems.

Descritores: 1. Alcoolismo 2. Adolescentes 3. Camundongos 4. Comportamento animal 5. Recompensa 6. Glutamatos I. Camarini, Rosana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0106/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscila Fernandes Carrara do Nascimento.

Título da Tese: Efeitos da exposição ao etanol em camundongos adolescentes e adultos: comportamentos relacionados à recompensa, sensibilização comportamental e o papel dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico.

Orientador(a): Rosana Camarini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**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

À minha mãe Ruth,
Meu irmão, Ivan
Meu marido, Márcio

por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de Doutorado e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa PDEE (Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior).

Agradeço aos meus colegas de laboratório, que se tornaram meus amigos: Ana Maria, André, Anny, Cristina, Daniel, Jaqueline, Mariana, Marília e Sabrina; pois contribuíram para que eu me aperfeiçoasse como profissional e como pessoa.

Aos técnicos do laboratório, Mateus e Manuel, que contribuíram para o bom andamento dos experimentos.

Aos Professores que abriram as portas de seus laboratórios e, portanto, contribuíram para o este trabalho: Rosely Godinho, Cleópatra da Silva Planeta, Jackson Bittencourt, Marcelo Nicolás Muscará, Soraia Kátia Costa, Silvana Auxiliadora Bordin da Silva, José Ernesto Belizário.

Ao Dr. Michael Foster Olive que me recebeu na “Medical University of South Carolina” para que eu realizasse o PDEE (Programa de Doutorado com Estágio no Exterior). Agradeço também ao Dr. Marcelo Lopez que me ensinou a trabalhar com o modelo de inalação de vapor de álcool e me acompanhou juntamente com o Dr. Olive; e aos Doutores Howard Becker, Tripp Griffin e Patrick Muholand, pois me receberam em seus laboratórios e me apoiaram.

Aos irmãos em Cristo, pelo amor que nos une.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Dra Rosana Camarini; pois sua motivação, dedicação e eficiência são inspiração para minha carreira.

O gênio é um por cento de inspiração é
Noventa e nove por cento de transpiração.

Thomas A. Edison (1847 – 1931)

RESUMO

Carrara-Nascimento, PF. Efeitos da exposição ao etanol em camundongos adolescentes e adultos: comportamentos relacionados à recompensa, sensibilização comportamental e o papel dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico. (Tese de Doutorado, 260 folhas). São Paulo; Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2011.

O uso de drogas de abuso inicia-se principalmente na adolescência, um período em que o sistema nervoso central está passando por mudanças maturacionais neuroquímicas e neuroanatômicas. Assim, o objetivo desse projeto foi avaliar efeitos comportamentais e neuroquímicos da exposição ao etanol em camundongos adolescentes e adultos. O presente projeto investigou: o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol em camundongos adolescentes e adultos; possíveis alterações na sinalização dopaminérgica e glutamatérgica no núcleo accumbens e estriado de camundongos sensibilizados ao etanol durante a adolescência; participação da via AMPc/PKA na sensibilização comportamental ao etanol em camundongos adolescentes e adultos; efeitos reforçadores do etanol em camundongos adolescentes e adultos por meio do modelo de auto-administração; efeitos reforçadores do etanol utilizando-se o aparelho de preferência condicionada de lugar, que possibilita a quantificação do tempo de permanência do animal no ambiente associado aos efeitos da droga; efeito de intoxicações crônicas seguidas de abstinência no padrão de consumo.

Palavras-chave: Etanol. Adolescentes. Camundongos. Sensibilização Comportamental.

ABSTRACT

Carrara-Nascimento, PF. Effects of ethanol exposure in adolescent and adult mice: behaviors related to reward, behavioral sensitization and the role of the dopaminergic and glutamatergic systems. (Doctorate Thesis 260 pages). São Paulo; Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2011.

The use of drugs of abuse begins mainly in adolescence, a period in which the central nervous system is undergoing neurochemical and neuroanatomical maturation changes. Thus, the aim of this project was to evaluate the behavioral and neurochemical effects of ethanol exposure in adolescent and adult mice. The present project investigated: the development of behavioral sensitization to ethanol in adolescent and adult mice; possible alterations in the dopaminergic and glutamatergic signaling in the nucleus accumbens and striatum of mice sensitized to ethanol during adolescence; participation of the AMPc/PKA pathway in the behavioral sensitization to ethanol in adolescent and adult mice; reinforcing effects of ethanol in adolescent and adult mice in a model of self-administration; reinforcing effects of ethanol in a model of conditioned place preference, that allows the quantification of the animal time spent in the environment associated with the drug effects; effect of chronic intoxication followed by withdrawal in the consumption pattern.

Key words: Ethanol. Adolescents. Mice. Behavioral Sensitization.

LISTA DE ABREVIações

AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CPF	Córtex pré-frontal
CREB	Fator de transcrição regulado pelo AMPC
DA	Neurotransmissor dopamina; relacionado ao sistema dopaminérgico
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
GABA	Neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico); relacionado ao sistema GABAérgico
GLU	Neurotransmissor glutamato; relacionado ao sistema glutamatérgico
5-HT	Neurotransmissor setoronina (5-hidroxi-triptamina); relacionado ao sistema serotoninérgico
HVA	Ácido homovanílico
NAcc	Núcleo Accumbens
PKA	Proteína quinase A
PND	Dia após o nascimento
SN	Substância Negra ou "Substantia Nigra"
VTA	Área ventral do tegmento mesencefálico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Alterações cerebrais no período da adolescência.....	16
1.1.1 <i>Modificações no córtex pré-frontal e sistemas de neurotransmissão.....</i>	<i>17</i>
1.1.2 <i>Alterações no volume de substância branca e cinzenta.....</i>	<i>20</i>
1.1.3 <i>Características comportamentais do adolescente promovem vulnerabilidade do abuso de álcool e outras drogas</i>	<i>22</i>
1.2 Neurobiologia da dependência.....	25
1.3 Neurobiologia da sensibilização comportamental	31
1.4 Sensibilização psicomotora induzida pelo álcool	34
1.5 Alterações neuromoleculares promovidas pelo álcool	37
1.5.1 <i>Sistema Dopaminérgico.....</i>	<i>39</i>
1.5.2 <i>Sistema Glutamatérgico.....</i>	<i>40</i>
1.5.3 <i>Via de sinalização relacionada aos mediadores AMPc/PKA.....</i>	<i>42</i>
1.6 Outros modelos animais para o estudo do mecanismo de recompensa	47
1.6.1 <i>Preferência Condicionada de Lugar.....</i>	<i>47</i>
1.6.2 <i>Auto-Administração.....</i>	<i>55</i>
1.6.3 <i>Intoxicação com vapor de álcool e auto-administração.....</i>	<i>57</i>
2 OBJETIVOS.....	59
2.1 Objetivo geral.....	60
2.2 Objetivos específicos.....	60
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
3.1 Animais.....	63
3.2 Drogas.....	63
3.3 Quantificação da atividade locomotora dos animais no campo aberto.....	64
3.4 Procedimentos para realização da microdiálise “in vivo”.....	64
3.4.1 <i>Cirurgia estereotáxica, coleta e análise das amostras e localização da cânula</i>	<i>64</i>
3.4.2 <i>Princípio da Técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>	<i>66</i>
3.5 Dosagem de dopamina, DOPAC e HVA no núcleo accumbens e estriado.....	66
3.6 Determinação dos níveis de AMPc.....	67
3.6.1 <i>Princípio do Ensaio.....</i>	<i>68</i>
3.6.2 <i>Descrição dos Procedimentos.....</i>	<i>68</i>
3.7 Quantificação da atividade da PKA	69

3.7.1 Princípio do Ensaio.....	69
3.7.2 Descrição dos Procedimentos.....	70
3.8 Preferência Condicionada por Lugar.....	71
3.9 Auto-administração de etanol.....	72
3.10 Auto-administração em animais expostos a sucessivas sessões de intoxicação crônica com vapor de etanol e abstinência.....	74
3.10.1 Auto-administração de etanol.....	75
3.10.2 Exposição a sessões de intoxicação crônica com vapor de etanol seguidas de abstinência.....	75
3.10.3 Dosagem de etanol nas câmaras de inalação de vapor	76
3.11 Dosagem de etanol no sangue	77
3.12. Análise estatística	77
 4 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	
PARCIAL.....	78
4.1 Quantificação de glutamato no núcleo accumbens de camundongos swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol.....	79
4.1.1 Delineamento Experimental.....	79
4.1.2 Resultados.....	82
4.1.3 Discussão parcial.....	90
4.2 Quantificação de dopamina, DOPAC e HVA no núcleo accumbens e caudato putamen de camundongos swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol	93
4.2.1 Delineamento Experimental.....	93
4.2.2 Resultados.....	94
4.2.3 Discussão Parcial.....	106
4.3 Quantificação dos níveis de AMPc e atividade da PKA no estriado de camundongos swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol	111
4.3.1 Delineamento Experimental.....	111
4.3.2 Resultados.....	112
4.3.3 Discussão Parcial.....	120
 4.4 Efeitos reforçadores do etanol, no paradigma de Preferência Condicionada por	123

Lugar, em camundongos swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol.....	
<i>4.4.1 Delineamento Experimental.....</i>	123
<i>4.4.2 Resultados.....</i>	124
<i>4.4.3 Discussão Parcial.....</i>	129
4.5 Efeitos reforçadores do etanol em camundongos swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol no paradigma de auto-administração num protocolo de livre escolha entre duas garrafas	132
<i>4.5.1 Delineamento Experimental.....</i>	132
<i>4.5.2 Resultados.....</i>	133
<i>4.5.3 Discussão Parcial.....</i>	139
4.6 Comportamento de consumo de camundongos adolescentes e adultos da linhagem c57, vulnerável ao consumo voluntário de álcool, num protocolo de múltiplas intoxicações com vapor de etanol seguidas de abstinência	144
<i>4.6.1 Delineamento Experimental.....</i>	144
<i>4.6.2 Resultados.....</i>	146
<i>4.6.3 Discussão Parcial.....</i>	157
5 DISCUSSÃO GERAL.....	163
6 CONCLUSÕES.....	170
REFERÊNCIAS	173
ANEXO A: Artigo de Carrara-Nascimento et al., 2011.....	228
ANEXO B: Fotos relacionadas aos experimentos.....	240

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alterações cerebrais no período da adolescência

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) 2,5 milhões de pessoas morrem de conseqüências relacionadas ao consumo de álcool por ano no mundo. Os riscos à saúde associados ao abuso do álcool são principalmente a cirrose hepática, acidentes de carro, violência doméstica e danos ao feto. O II Levantamento sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil, realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) em 2006, revelou aumento dos dependentes de álcool no país de 11,2% em 2001 para 12,3% em 2006. Segundo o CEBRID, 48,3% dos adolescentes entre 12 e 17 anos já beberam alguma vez na vida. Destes, 14% bebem regularmente e 6,7% são dependentes. O I Levantamento Nacional sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira (2007) mostrou que indivíduos que fazem uso freqüente de bebidas alcoólicas aos 14,6 anos experimentaram o primeiro gole com cerca de 13,9 anos.

O álcool é uma das primeiras drogas de escolha entre jovens e adolescentes. Estudos demonstram que o consumo de álcool por adolescentes pode promover anormalidades na estrutura cerebral, déficits na memória e prejudicar o desempenho acadêmico (BROWN e TAPERT, 2004; MEDINA et al., 2008; NAGEL et al., 2005; ZEIGLER et al., 2005). O uso precoce de álcool resulta em maior probabilidade de dependência ao álcool e outras drogas futuramente, na idade adulta (GRANT e DAWSON, 1997).

A adolescência é o período de maturação entre a infância e a idade adulta caracterizada por alterações hormonais que levam à maturação sexual, secreção de hormônios relacionados ao estresse, e crescimento considerável (SPEAR e VARLINSKAYA, 2010; WITT, 2007). Mudanças hormonais, fisiológicas e neurais são semelhantes entre espécies de mamíferos (SPEAR, 2004; 2007). Em ratos, considera-se que o período da adolescência está entre o PND ("Post Natal Day" ou dia após o nascimento) 28-42; e em humanos, entre 12-20 ou 25 anos (SPEAR, 2000).

O cérebro passa por alterações peculiares na adolescência. Estudos de ressonância magnética em humanos mostraram que o córtex e algumas regiões subcorticais mudam dramaticamente durante a infância e adolescência (GOGTAY et al., 2004; PAUS, 2005; PAUS et al., 2001; SOWEL et al., 2002; 2003a; 2003b). Ocorre alteração na densidade de substância branca e substância cinzenta e os axônios tornam-se mais mielinizados. Alguns dos circuitos que estão passando por modificações são aqueles que modulam a sensibilidade e a motivação por reforçadores naturais como estímulo social, novidade e riscos, e que também são substratos para reforçadores não naturais como álcool e outras drogas de abuso. São essas áreas que recebem eferências dopaminérgicas da VTA (“ventral tegmental área” ou área ventral do tegmento mesencefálico) e SN (substância negra) – porções do CPF (Córtex Pré-Frontal), NAcc (Núcleo Accumbens), amígdala e estriado dorsal. As alterações neurais que ocorrem durante a adolescência estão relacionadas à maturação do CPF e suas interconexões com o sistema límbico (cingulato, amígdala, hipocampo). O sistema límbico regula a experiência emocional, memória e aprendizado emocional. A maturação das conexões entre o CPF, gânglio basal e cerebelo é crucial para o desenvolvimento de funções cognitivas mais complexas (HEYDER, SUCHAN e DAUM, 2004).

1.1.1 Modificações no córtex pré-frontal e sistemas de neurotransmissão

Funções executoras são invocadas para promover respostas a um estímulo. O lobo executivo frontal recebe aferências de todas as modalidades sensoriais, integra essas informações com a memória, analisa o benefício do ato e executa o comportamento planejado (CREWS e BOETTINGER, 2009). Conexões entre as regiões do córtex frontal com as áreas límbicas hipocampo, amígdala e regiões estriatais regulam o comportamento relacionado a um objetivo (WINSTANLEY, 2007). Assim, o indivíduo é capaz de utilizar a experiência passada e conhecimento para definir a resposta comportamental futura. O CPF (definido como a região que se projeta do tálamo dorso-medial e inclui o CPF dorso-lateral, córtex cingulado anterior e córtex órbita frontal) projeta aferências para a VTA e NAcc, importantes estruturas da via dopaminérgica mesolímbica, onde a DA (dopamina) executa um

papel crucial no controle do comportamento. A via DA mesolímbica origina-se na VTA e projeta-se para o NAcc e outras estruturas límbicas (KALIVAS, 1993). A liberação de DA ocorre em resposta a uma variedade de reforçadores ambientais tais como água (CARLEZON e WISE, 1996) comida (DI CHIARA, 1998) e drogas de abuso (DI CHIARA, 1997a; 1997b). Concentrações aumentadas de DA estriatal são essenciais para denotar o valor destes estímulos reforçadores. O estriado ventral (NAcc) é importante para o julgamento, controle do impulso e expressão de comportamentos (CREWS e BOETTINGER, 2009).

A rede neural composta de um “loop” que vai do CPF para o NAcc (através do tálamo) e volta para o CPF recebe informações afetivas de estruturas límbicas (hipocampo e amígdala) e informação relacionada ao comportamento motivado do hipotálamo (ADINOFF, 2004; SWANSON, 2000). O hipocampo representa a memória contextual relacionada àquele estímulo e a amígdala fornece informação afetiva do estímulo motivacional (BECHARA, 2001; PENNARTZ et al., 1994; GROENEWEEN, WRIGHT e BEIJERGROENEWEEN, WRIGHT e BEIJER, 1999). Este sistema codifica comportamentos “apetitivos” (estímulos reforçadores), mas possui um sistema de supressão do comportamento para que um dano ao indivíduo possa ser evitado. A liberação de DA no NAcc responde à aferência glutamatérgica do CPF, regiões límbicas e hipocampo (FINCH, 1996; LAVIN e GRACE, 1994). A DA também induz modificações neuroplásticas no NAcc (HYMAN e MALENKA, 2001) e tem sido associada ao aprendizado motivacional. No sistema de aprendizado motivacional a DA (dopamina) e o GLU (glutamato) são neurotransmissores estimulatórios, 5-HT (serotonina) e GABA (ácido gama-amino-butírico) são supressores – todos atuam neste sistema que envolve o CPF e as vias dopaminérgicas mesolímbica / mesocortical para regulação do comportamento. A expressão do aspecto estimulatório é maior que a do supressor durante o desenvolvimento do adolescente normal e a liberação de DA no NAcc é o principal evento neuromodulatório implicado na tradução da motivação em ação (CHAMBERS, TAYLOR e POTENZA et al., 2003).

O volume do CPF começa a declinar na adolescência e completa o processo no início da idade adulta (SOWELL et al., 2001; vanVAN EDEN, KROS E UYLINGS, 1990). Esta redução está associada com o refinamento dos circuitos neurais e conexões. Durante a adolescência, o CPF sofre perda de sinapses glutamatérgicas aferentes (HUTTENLOCHER, 1984), enquanto eferências dopaminérgicas e

serotoninérgicas aumentam e posteriormente declinam (KALSBECK et al., 1988; ROSENBERG e LEWIS, 1994). Essas modificações estão associadas com modificações cognitivas e funcionais e com a aquisição de funções executoras maduras (inibição da resposta, atenção, memória de trabalho) (CASEY, GIEDD e THOMAS, 2000; PAUS, 2005).

As regiões subcorticais passam por considerável remodelamento durante a adolescência (GOGTAY et al., 2004; SOWELL, THOMPSON e TOGA, 2004; TOGA e THOMPSON, 2003). Principalmente as conexões com o CPF que incluem a amígdala e outras estruturas dopaminérgicas mesocorticolímbicas terminais (SPEAR 2002; 2007). Aferências dopaminérgicas para o CPF apresentam-se em maior quantidade (pico) na adolescência (LEWIS, 1997; SPEAR, 2000). Estudos em animais e humanos mostram que receptores dopaminérgicos são superproduzidos no desenvolvimento e ocorre decaimento na adolescência, o que sugere remodelamento das vias de recompensa (TARAZI e BALDESSARINI, 2000; TEICHER, ANDERSEN e HOSTETTER, 1995; TARAZI, TOMASINI e BALDESSARINI, 1999). Particularmente no CPF os receptores DA não apresentam decaimento até o final da adolescência (TARAZI, TOMASINI e BALDESSARINI, 1999; ANDERSEN et al., 2000). Os eventos descritos podem alterar o balanço da atividade dopaminérgica entre o CPF e estriado ou regiões mesolímbicas terminais, resultando em maior predominância da atividade dopaminérgica no CPF no início da adolescência.

No início da adolescência observa-se também um pico de receptores glutamatérgicos NMDA, que declina posteriormente (GUILARTE e McGLOTHAN, 1998; INSEL, MILLER e GELHARD, 1990). Este declínio pode promover perda de excitação glutamatérgica no NAcc (FRANTZ e VAN HARTESVELDT, 1999b).

O neurotransmissor GABA inibe a atividade do Núcleo Accumbens (NAcc) e se opõe aos efeitos excitatórios do GLU e da DA (JOHNSON, 2005). Os receptores GABAérgicos alcançam níveis maduros na adolescência (NURSE e LACAILLE, 1999). Aferências GABAérgicas no CPF parecem diminuir ao longo da adolescência em humanos (LEWIS, 1997; SPEAR, 2000), após o pico que ocorre na pré-adolescência. Em ratos, os neurônios GABAérgicos diminuem de tamanho durante a adolescência (VINCENT, PABREZA e BENES, 2005). As projeções 5-HT originam-se no núcleo dorsal da rafe e projetam-se para o CPF, NAcc, hipocampo e regiões límbicas (KALIVAS, 1993). As projeções 5-HT têm um papel supressor no sistema

motivacional, pois a 5-HT inibe e se opõe à atividade DA (relacionada ao comportamento impulsivo) (ROBINS e EVERITT, 1999). Assim, enquanto a DA promove comportamentos motivados, a 5-HT breca a função estriatal relacionada ao comportamento apetitivo. O “turnover” de 5-HT é 4 vezes mais lento no rato adolescente em comparação ao rato adulto e mais jovem (TEICHER e ANDERSEN, 1999) enquanto a quantidade de DA no CPF é 3 vezes maior que a quantidade de 5-HT (LAMBE, KRIMER e GOLDMAN-RAKIC, 2000). Ratos adolescentes passam por significativa redução de sinapses 5-HT (DINOPOULOS, DORI E PARNAVELAS, 1997).

Também foram observadas particularidades dos sistemas colinérgico e canabinóide durante a adolescência. A inervação colinérgica do CPF aumenta na adolescência e posteriormente atinge níveis maduros em ratos (GOULD, WOOLF e BUTCHER, 1991) e humanos (KOSTOVIC, 1990). Os sistemas canabinóides, que regulam as vias dopaminérgicas mesocortical e estriatal, alcançam maturidade funcional durante a adolescência (RODRIGUEZ et al., 1993; FRIDE e MECHOULAM, 1996a; 1996b). Receptores canabinóides sofrem um declínio de 50% ou mais na capacidade de “binding”, o que poderia influenciar no aprendizado motivacional.

Em suma, durante a adolescência observa-se predominância dos sistemas estimulatórios (relacionados à neurotransmissão DA e GLU) sobre os supressores (regulados pelos neurotransmissores 5-HT e GABA) do comportamento relacionado à resposta a estímulos ambientais. O indivíduo adolescente é mais impulsivo em suas respostas a estímulos ambientais e possui menor capacidade de julgamento de suas decisões, o que o torna mais vulnerável à experimentação de drogas de abuso e conseqüente desenvolvimento de dependência. Um dos objetivos de investigação desta tese foi estudar os sistemas de neurotransmissão DA e GLU em resposta ao etanol, em adolescentes.

1.1.2 Alterações no volume de substância branca e cinzenta

O cérebro humano está em constante transformação ao longo da infância, adolescência, idade adulta e envelhecimento. Porém, as mudanças mais intensas

ocorrem na adolescência (SOWELL et al., 2003a). As modificações compreendem o processo de mielinização, redução no número de sinapses no córtex cerebral (HUTTENLOCHER e DABHOLKAR 1997; HUTTENLOCHER, 1984; BOURGEOIS, GOLDMAN-RAKIC e RAKIC, 1994), modificações nas células da glia, alterações vasculares, aumento do calibre do axônio (PAUS, KESHAVAN e GIEDD, 2008; PERRIN et al., 2008) e alterações na densidade de substância branca e cinzenta (TOGA e THOMPSON, 2003; SOWELL, THOMPSON e TOGA, 2004). A morte celular geneticamente programada (apoptose), regional e específica (MARKHAM, MORRIS e JURASKA, 2007) e declínios nos níveis de neurogênese (HE e CREWS, 2007) também colaboram para o declínio da densidade da substância cinzenta e perda de conexões sinápticas no córtex durante a adolescência (BOURGEOIS et al., 1994).

A perda de sinapses é determinada pelo uso. Conexões utilizadas são mantidas e fortalecidas, enquanto as que deixam de ser utilizadas são eliminadas. A eliminação de sinapses reduz o padrão infantil de processamento (CASEY et al., 2000; 1998; 1997).

O pico da densidade de substância cinzenta ocorre na infância, em áreas sensório-motoras e posteriormente em áreas de associação de alta ordem, como o córtex pré-frontal (SOWELL et al., 2001). A substância cinzenta passa por redução não linear (acontece em momentos diferentes em regiões cerebrais diferentes) ao longo da infância e adolescência, conforme demonstrado por Gogtay et al. (2004). O aumento de substância branca nas primeiras décadas de vida e a remoção de conexões sinápticas (“pruning”) explicam esta alteração. A maturação das diversas áreas corticais parece seguir a mesma seqüência do desenvolvimento pré-natal. Regiões associadas às funções mais primárias, como o córtex motor primário, se desenvolvem mais cedo que as envolvidas com tarefas mais complexas e integrativas (lobo temporal). A maturação da matéria cinzenta é muito influenciada pela experiência; isso torna o cérebro adolescente muito versátil e capaz de realizar mudanças de acordo com a demanda ambiental (BLAKEMORE, 2008).

O volume de substância branca apresenta um aumento linear durante a infância e adolescência, sendo que o volume máximo é alcançado em torno da terceira ou quarta década de vida (BARTZOKIS et al., 2001; SOWELL et al., 2003a). A intensa mielinização observada no período da adolescência aumenta drasticamente a velocidade dos sinais neurais, o que resulta em maior conectividade

e integração da circuitaria neural (GIEDD et al. 2009). A mielina não somente maximiza a velocidade da transmissão, mas também modula o tempo e sincronia dos padrões de disparo neurais que formam redes de transmissão de impulsos (FIELDS et al., 2002). A progressiva mielinização promove estabilidade de conexões entre neurônios (PERRIN et al., 2009; SOWELL et al., 2001; 2003a; 2003b) e resulta em desenvolvimento da matéria branca ao longo da adolescência. Na idade adulta acelera o fluxo de informações ao longo dos axônios, o que aumenta a velocidade do processamento de informações no cérebro.

Ao nível celular, essas modificações estão associadas com a superprodução de axônios e sinapses no início da puberdade e rápido decaimento ao final da adolescência (GIEDD et al., 1999; HUNTENLOCHER e DE COURTEN, 1987; SOWEL et al., 2004). Assim, novas conexões sinápticas são estabelecidas enquanto outras são eliminadas. Esses eventos refletem a construção e o refinamento das conexões entre neurônios e também com células gliais (FIELDS e STEVENS-GRAHAM, 2002). A comunicação entre regiões aumenta e o cérebro se torna mais integrado e mais complexo. A superprodução de sinapses associada à eliminação seletiva promove máxima eficiência. Em conjunto, as alterações maturacionais descritas promovem uma nova organização funcional nas funções cerebrais. A especialização de funções e maior integração de informações proporciona o desenvolvimento bem sucedido das funções cognitiva, motora e sensorial observado quando o indivíduo alcança a idade adulta.

1.1.3 Características comportamentais do adolescente promovem vulnerabilidade ao abuso de álcool e outras drogas

O remodelamento cerebral durante a adolescência está associado ao desenvolvimento cognitivo e emocional (RUBIA et al., 2006). Nesta idade o indivíduo aumenta suas interações sociais, escolhe grupos de amigos, aumenta a busca por situações novas e comportamento arriscado (SPEAR, 2007) apresenta níveis mais elevados de ansiedade e impulsividade (BLAKEMORE, 2008). Estas adaptações comportamentais promovem benefícios como o desenvolvimento de habilidades sociais, suporte social (HARRIS, 1995) e o desenvolvimento da capacidade para

lidar com situações inesperadas e aprender a evitar consequências adversas (SPEAR, 2000). Embora estes comportamentos característicos da adolescência proporcionem amadurecimento ao indivíduo, a busca por novas sensações, comportamento arriscado, impulsividade e necessidade de interação social podem torná-lo mais vulnerável ao uso de álcool e outras drogas de abuso. Essas substâncias sensibilizam os circuitos da recompensa, e causam déficits comportamentais e cognitivos. Este é um período crucial em que a exposição ao álcool pode causar anormalidades irreversíveis na estrutura cerebral e suas funções na idade adulta (GUERRI, BAZINET e RILEY, 2009; PAUS, KESHAVAN e GIEDD, 2008). Além disso, o córtex pré-frontal, envolvido no julgamento e controle do impulso, amadurece tardiamente na adolescência. Se o indivíduo adolescente é mais propenso a ignorar as consequências negativas de seu comportamento, torna-se mais vulnerável ao envolvimento com substâncias de abuso (SPEAR e VARLINSKAYA, 2010).

Adolescentes são menos sensíveis que adultos a certos efeitos aversivos do álcool: inibição social (VARLINSKAYA e SPEAR, 2002), sedação (DRASKI, BICE E DEITRICH, 2001; SILVERI e SPEAR, 1998) e incoordenação motora (WHITE et al., 2002). Por outro lado, adolescentes são mais sensíveis que adultos a efeitos recompensadores do álcool, como facilitação social (SPEAR e VARLINSKAYA, 2005), auto-medicação - alívio da ansiedade e do estresse (DOREMUS-FITZWATER, VARLINSKAYA e SPEAR, 2007; VARLINSKAYA e SPEAR, 2007). Adolescentes humanos relatam a facilitação social como o efeito mais importante do consumo de álcool (BECK, THOMBS e SUMMONS et al., 1993). Além disso, adolescentes também experimentam sintomas de abstinência atenuados, incluindo redução na ansiedade (VARLINSKAYA e SPEAR, 2004; DOREMUS et al., 2003). Por serem menos sensíveis aos efeitos aversivos e mais sensíveis aos efeitos recompensadores do álcool, adolescentes são mais vulneráveis ao desenvolvimento da dependência. A insensibilidade do adolescente aos efeitos intoxicantes do álcool está associada com aumento do consumo e aumento da probabilidade de desenvolver dependência.

Estudos em animais adolescentes descrevem a vulnerabilidade aos danos neuronais ocasionados pelo álcool. Animais expostos ao álcool exibem mais déficits cognitivos, incluindo disfunções no aprendizado e memória (MARKWIESE et al., 1998; WHITE e SWARTZWELDER, 2005). Alguns desses déficits ainda

permanecem na idade adulta em ratos (PASCUAL et al., 2007; SIRCAR e SIRCAR, 2005). Em cortes de hipocampo de ratos PND30 e PND60, Swartzwelder, Wilson e Tayyeb (1995a; b) demonstraram que o álcool atenuou a atividade sináptica mediada por receptores NMDA e inibiu a indução de LTP (“Long Term Potentiation”), (fenômeno associado ao aprendizado, memória e desenvolvimento de sinapses) em maior proporção no hipocampo imaturo que no hipocampo maduro. Em concordância com esses dados, ratos adolescentes apresentaram mais danos que adultos na aquisição de memória espacial após exposição aguda ao álcool (MARKWIESE et al., 1998). Além do hipocampo, mais danos em regiões do córtex frontal anterior foram observados em ratos jovens expostos a “binge-drinking” (consumo ocasional em altas doses) em comparação a adultos, incluindo o córtex olfatório frontal e piriforme (CREWS et al., 2000). A exposição intermitente ao álcool reduz os níveis de receptores dopaminérgicos D2 e a fosforilação de receptores NMDA-2B em diversas áreas cerebrais, incluindo o CPF e o hipocampo de animais adolescentes; no cérebro adulto não foram observados efeitos significativos. A administração intermitente de álcool também promove aumento dos níveis de DA no septo do NAcc em ratos adolescentes e adultos, mas os níveis de DA são ainda mais elevados em ratos adolescentes (PASCUAL et al., 2009). Os níveis elevados de DA observados em ratos tratados com álcool durante a adolescência continuam elevados na idade adulta (BADANICH, MALDONADO e KIRSTEIN, 2007). E ainda a administração intermitente de álcool (PND30-45) aumenta a morte neural no hipocampo e CPF; os animais apresentam déficits comportamentais e cognitivos ao final do tratamento e na idade adulta (PASCUAL et al., 2007).

Durante a adolescência os sistemas de aprendizado e memória também estão passando pelo processo de maturação. Enquanto déficits na memória e aprendizado estão associados com perda de função devido a dano ou idade, o uso prolongado de drogas de abuso está associado com o problema oposto, conceitualizado como aprendizado aberrante ou “over-learning” (HYMAN, 2005). Associações aprendidas e fortemente estabelecidas continuam a influenciar o comportamento mesmo após longo período de abstinência, o que pode resultar em recaída. A atividade neural no córtex, sistema límbico e gânglio basal participa do aprendizado e memória; a transmissão GLU é crítica para estabelecer e modificar as conexões sinápticas e codificar mecanismos nessas regiões cerebrais. Durante a adolescência esses circuitos estão passando por processos maturacionais que

podem ser danificados pela exposição ao álcool. O álcool promove modificações em sinapses GLU, o que sugere associação entre a atividade glutamatérgica e as modificações duradouras em funções cerebrais (JONES e BONCI, 2005). A transmissão glutamatérgica, crítica para avaliar a novidade e importância de um estímulo, apresenta aumento na quantidade de receptores NMDA após exposição ao álcool na adolescência e aumento no tamanho das espinhas dendríticas. (CARPENTER-HYLAND e CHANDLER, 2007).

1.2 Neurobiologia da Dependência

A motivação é o processo neural que determina a priorização, organização e realização de comportamentos específicos requeridos para alcançar um objetivo específico. Segundo a visão contemporânea, a dependência é uma doença do processo motivacional (KALIVAS e VOLKOW, 2005) mediada pela ação da DA (HYMAN, 2005).

A manifestação do comportamento motivado resulta da atividade de estruturas corticais, subcorticais e límbicas, interligadas de maneira complexa. No córtex frontal neurônios glutamatérgicos são intercalados por neurônios GABAérgicos (SPORNS, TONONI e EDELMAN, 2002). Fibras glutamatérgicas originam-se do córtex pré-frontal (córtex orbitofrontal, medial e cingulado) e projetam-se para o estriado ventral (NAcc). A VTA envia projeções DA predominantemente para o NAcc e CPF (KALIVAS, 1993; HABER e McFARLAND, 1999), e também para a amígdala basolateral e hipocampo ventral. Por sua vez, a VTA recebe eferências GABAérgicas do NAcc e eferências glutamatérgicas do CPF. O hipocampo ventral e a amígdala basolateral também estão conectados reciprocamente por projeções glutamatérgicas (MULDER, HODENPIJL e LOPEZ DE SILVA, 1998; GURDEN, TASSIN e JAY, 1999; PITKANEN et al., 2000; ISHIKAWA e NAKAMURA, 2003). No CPF projeções glutamatérgicas provenientes da amígdala basolateral e hipocampo ventral estão próximas das aferências DA da VTA. O NAcc também recebe impulsos glutamatérgicos da amígdala basolateral e formação hipocampal ventral. As projeções DA que chegam ao NAcc a partir da VTA estão próximas às regiões de recepção de aferências glutamatérgicas do CPF, amígdala

basolateral e hipocampo ventral (O'DONNELL et al., 1999). As aferências do CPF no NAcc trazem informação executora (julgamento, decisão, planejamento motor); a amígdala traz informação afetiva e o hipocampo traz informação relacionada à memória contextual. Assim, o NAcc constitui numa estrutura que recebe informação emocional e cognitiva da amígdala, hipocampo e CPF, sendo esse conjunto de informações influenciado por projeções DA provenientes da VTA.

A execução do comportamento motivado é muito sensível às mudanças ambientais, o que confere vantagem evolutiva (WILLEBOORDSE, 2006). Disparos neurais DA da VTA para o NAcc ou aumento dos níveis de DA nessa estrutura, estão associados principalmente às seguintes categorias de estímulo: recompensadores naturais, associados à sobrevivência (ex.: comida) (SPANAGEL e WEISS, 1999; KELLEY, 2004); novidade (LJUNGBERG, APICELLA e SCHULTZ, 1992; BARDO, DONOHEW e HARRINGTON, 1996; VOLKOW e LI, 2004; LISMAN e GRACE, 2005); estímulos aversivos ou estressores (PIAZZA e LE MOAL, 1996; FINLAY e ZIGMOND, 1997); e drogas de abuso (KOOB, 1992; SELF e NESTLER, 1998; WISE, 1998; GERDEMAN et al., 2003; RODD et al., 2004; VOLKOW e LI, 2004). Já que a ação de drogas de abuso no sistema DA não está associada a questões de sobrevivência, pode-se dizer que a dependência usurpa mecanismos motivacionais adaptativos naturais (ORFORD, 2001; NEWLIN, 2002; ROBINSON e BERRIDGE, 2003). Além disso, a capacidade das drogas de abuso em estimular a liberação de DA é maior que a de estímulos naturais, ou seja, drogas de abuso são poderosamente motivacionais. (VOLKOW e LI, 2004).

Ao longo dos tempos surgiram diversas teorias para explicar como as alterações induzidas por drogas promovem dependência, e porque é tão difícil para o dependente deixar o abuso da substância. As principais são:

Teoria do Processo Oponente ou Hedonia (KOOB e LE MOAL, 1997; 2001; 2005; SOLOMON e CORBIT, 1973; 1974): Teoria baseada no acesso farmacológico aos sinais cerebrais hedonicamente positivos (KALIVAS e VOLKOW, 2005; VOLKOW, FOWLER e WANG, 2003; VOLKOW et al., 2004). Segundo essa teoria as drogas são utilizadas por promoverem prazer, ou seja efeito positivo. O organismo desenvolve um processo que se opõe ao prazer com o intuito de recuperar a homeostase, que seria a tolerância. Cessa a sensação prazerosa e surgem sintomas de abstinência. Inicialmente o uso da droga é devido ao prazer, posteriormente, é para evitar os sintomas de abstinência (KOOB e LE MOAL 2001).

De acordo com Koob e Le Moal (1997) a droga utilizada agudamente produz um estado positivo causado pela ativação DA da amígdala e NAcc. Quando o uso da droga é interrompido, surgem os sintomas de abstinência. Além disso, os autores sugerem que a ativação do eixo HPA (Hipotalâmico-Pituitário Adrenal) por drogas também pode contribuir para o desenvolvimento da dependência.

Teoria do “Overlearning” (Aprendizado aberrante ou Aprendizado Excessivo): os circuitos envolvidos com o NAcc estão relacionados ao aprendizado associado à recompensa (WHITE, 1996; KELLEY, 1999; SCHULTZ, 2000). O NAcc é ativado, em animais e humanos, na presença de pistas que demonstram que a recompensa está disponível (SCHULTZ, 1998; CHILDRESS et al., 1999; KNUTSON et al., 2001). As drogas de abuso produzem associações fortemente anormais de pistas com a recompensa, mais poderosas que as associações de recompensas naturais com pistas. A memória dos efeitos hedônicos da droga poderia ser particularmente vívida e a expectativa de seus efeitos excessivamente otimista. Assim, determinadas pistas ou contextos poderiam promover comportamentos específicos, como a auto-administração compulsiva de drogas.

Teoria da Sensibilização do Incentivo, ou Saliência do Incentivo: Teoria baseada na sensibilização de sinais motivacionais do cérebro (BERRIDGE e ROBINSON, 1998; 2003; ROBINSON e BERRIDGE, 1993; 2001; 2003; 2004). Estão relacionados a essa teoria os processos de motivação e aprendizado. A sensibilização de sistemas que atribuem saliência do incentivo causam motivação compulsiva, ou seja, “querer” a droga compulsivamente (ROBINSON E BERRIDGE, 1993; 2000; 2008). A idéia central é que as drogas de abuso promovem alterações duradouras nos sistemas relacionados ao NAcc que medeiam uma função básica – o incentivo da motivação, a atribuição de saliência ao incentivo. Esses circuitos se tornam hipersensíveis ou sensibilizados aos efeitos das drogas e pistas / contextos a elas associados.

Disfunções no processo de decisão e perda do controle inibitório: Esta teoria sugere que escolhas irracionais levam indivíduos a abusar de drogas. Mesmo se o indivíduo decide racionalmente abster-se de drogas na presença do contexto associado ao uso suas decisões racionais podem ser vencidas e o indivíduo pode ter uma recaída. Os sistemas corticofrontais, envolvidos no comportamento executivo (tomar decisão, capacidade de julgar as futuras conseqüências de uma atitude), projetam-se para o estriado. São particularmente importantes na regulação

da emoção e controle inibitório sobre o comportamento (DAVIDSON, JACKSON e KALIN, 2000). A exposição repetida a drogas pode suprimir o processamento de informações em regiões frontais, distorcer funções e reduzir o volume do córtex pré-frontal (JENTSCH e TAYLOR, 1999; LIU et al., 1998). Dependentes apresentam déficits neuropsicológicos semelhantes àqueles apresentados por pacientes com disfunção frontal (BOLLA, CADET e LONDON, 1998; BECHARA, DOLAN, e HINDES, 2002).

Cada uma dessas teorias é incompleta em algum ponto e incapaz de explicar, por si só, todos os aspectos da dependência. Porém, também não são incompatíveis; cada uma esclarece um aspecto importante relacionado ao mecanismo pelo qual a dependência se desenvolve. A Teoria do Processo Oponente justifica que as drogas são utilizadas devido ao efeito hedônico que promovem; o indivíduo progride no uso, em parte, porque os efeitos da abstinência são aversivos. A Teoria do Aprendizado Aberrante descreve que os circuitos conectados ao NAcc estão relacionados ao aprendizado associado à recompensa. Já que drogas de abuso produzem associações fortemente anormais de pistas com a recompensa, a memória dos efeitos hedônicos da droga em determinado contexto é particularmente significativa. Assim, a sensibilização de sistemas que atribuem saliência ao incentivo (estímulo) causa motivação compulsiva, ou seja, “querer” a droga compulsivamente (Teoria da Saliência do Incentivo). Tais sistemas se tornam hipersensíveis aos efeitos da droga e do contexto a ela associado. Portanto, mesmo que o indivíduo decida racionalmente interromper o uso da substância de abuso, não é capaz, pois os sistemas corticofrontais envolvidos com julgamento e controle do impulso, que enviam projeções para o NAcc, foram danificados pelo uso repetido da droga de abuso (Teoria da Disfunção do Processo de Decisão).

Há alvos moleculares que sofrem alterações, devido ao uso repetido de drogas de abuso. A liberação de DA promove alterações neuroplásticas. A sinalização desencadeada por receptores dopaminérgicos envolve modificações na transcrição gênica e remodelamento da cromatina. A estimulação de receptores D₁ no estriado e córtex aumenta AMPc (adenosina monofosfato cíclico), PKA (Proteína quinase A) e CREB (“cAMP response element-binding” ou fator de transcrição regulado pelo AMPc), o que resulta na transcrição de muitos genes implicados na dependência como *c-fos*, *DFosB* e *Homer* (HURD e HERKENHAM, 1993; NESTLER, BARROT e SELF, 2001; McCLUNG e NESTLER, 2003). Segundo alguns

autores a superexpressão de CREB no NAcc inibe os efeitos recompensadores de psicoestimulantes (BARROT et al., 2002; LU et al., 2003; McCLUNG e NESTLER, 2003); de acordo com outros autores (JIN, BLENDY e THOMAS, 2005; WALTERS et al., 2005; CHOI et al., 2006) o CREB é necessário para os efeitos recompensadores. A exposição repetida a opióides e cocaína leva à ativação do CREB (“adenosine monophosphate response-element binding protein”) no NAcc e núcleo central da amígdala (SHAW-LUTCHMAN et al., 2002; EDWARDS et al., 2007). O CREB pode ser fosforilado pela PKA, o que pode resultar em expressão gênica. A ativação do CREB no NAcc está relacionada com sintomas de abstinência (NESTLER, 2005). A ativação repetida do CREB no NAcc promove expressão da dinorfina, que diminui a atividade DA, o que pode contribuir para estados emocionais negativos. O CREB e outros mensageiros intracelulares podem ativar fatores de transcrição, que podem modificar a expressão gênica e produzir alterações duradouras na expressão de proteínas, ou seja, alterações duradouras na função neural. Mesmo quando administradas agudamente, drogas de abuso podem causar ativação de membros da proteína Fos (algumas horas), como *c-fos*, FosB, Fra-1 e Fra-2 no NAcc. Uma forma altamente estável da proteína FosB (DFosB) se acumula por alguns dias devido à administração repetida de drogas. Nestler (2005) sugere que este é um mecanismo compensatório para limitar o reforço promovido pela droga. Porém, a indução de Cdk5 fosforila a fosfatase DARPP-32 regulada pela DA, prevenindo a fosforilação do CREB e sua ativação pela PKA (BENAVIDES e BIBB, 2004). A indução de outros genes pela DFosB aumenta a recompensa por drogas de abuso (KELZ et al., 1999; COLBY et al., 2003; ZACHARIOU et al., 2006).

A transmissão GLU também é desregulada por drogas de abuso. A exposição repetida à cocaína promove redução nos níveis basais de GLU no NAcc e aumento na transmissão na re-exposição à droga (BAKER et al., 2003; HOTSENPILLER, GIORGETTI e WOLF, 2001; PIERCE et al., 1996). Alterações importantes foram relatadas, como alterações na densidade de espinhas dendríticas no NAcc e CPF (ROBINSON e KOOB, 2004), aumento na inserção de receptores AMPA na membrana (MANGIAVACCHI e WOLD, 2004; SUN, ZHAO e WOLF, 2005; BOUDREAU e WOLF, 2005) e aumento nas correntes AMPA em espinhas dendríticas no NAcc (KOURRICH et al., 2007). É interessante observar que a estimulação de receptores DA D_1 promove inserção de receptores AMPA na membrana (SUN, ZHAO e WOLF, 2005), ou seja, a ação da DA interfere no sistema

GLU. A estimulação do receptor DA D₁ no CPF é necessária para a reinstalação da busca pela droga, o que é consistente com a possibilidade de aumento da inserção de receptores AMPA na membrana (CAPRILES et al., 2003; SUN e REBEC, 2005). Além disso, o bloqueio dos receptores AMPA no NAcc atenua o comportamento de busca pela droga em resposta ao estímulo associado (DI CIANO e EVERITT, 2001) e também a reinstalação (CORNISH e KALIVAS, 2000).

Assim, alterações induzidas por drogas nos sistemas DA e GLU no NAcc são cruciais para o comportamento de busca pela droga. Talvez a motivação aumentada ocorra com a exposição repetida.

Recentemente, Peter Kalivas sugeriu que a incapacidade do CPF em controlar o comportamento de busca pela droga está relacionada a um desequilíbrio entre o GLU sináptico e não sináptico. Esta teoria foi chamada de “teoria da homeostase do glutamato” (KALIVAS, 2009). Segundo esse pesquisador indivíduos dependentes tem dificuldade em suprimir o comportamento de busca pela droga ou comportamento de busca patológico. O circuito corticoestriatal, envolvido na adaptação do comportamento de acordo com a demanda ambiental, torna-se danificado em sua capacidade de modular o comportamento. O circuito corticoestriatal pode ser subdividido em outros dois subcircuitos: límbico (CPF, amígdala, NAcc e VTA) e motor (córtex motor, estriado dorsal e Substância Negra). Através do NAcc a informação sensorial processada pelo sistema límbico acessa o subcircuito motor (YIN et al., 2006; GROENEWEGEN, WRIGHT e BEIJER, 1996). A partir de um estímulo motivacional (comida, por exemplo), o sistema límbico engaja numa tarefa de aprendizado e planejamento de estratégia para se adaptar a este estímulo. Depois que o animal aprende que ao pressionar uma barra ele recebe a comida, ou seja, quando o comportamento já está estabelecido, a influência do circuito límbico diminui progressivamente (YIN et al., 2006; BARNES et al., 2005). Se o pressionar da barra deixa de resultar em obtenção de comida, o ambiente exige do indivíduo uma mudança comportamental adaptativa. Os circuitos límbicos são novamente requeridos e o subcircuito motor se torna mais desorganizado. Porém, quando o estímulo motivacional é uma droga de abuso, o comportamento de busca pelo estímulo reforçador é compulsivo e não é interrompido quando a droga não está mais disponível. De acordo com Kalivas, a influência reduzida do sistema límbico nesse processo origina-se de um desequilíbrio duradouro na homeostase do GLU no NAcc. Um fator crucial para manter a homeostase do GLU é um equilíbrio ideal entre

a liberação e eliminação de GLU sináptica e glial. Este equilíbrio afeta a atividade sináptica e plasticidade, controlando o acesso do GLU aos receptores ionotrópicos e metabotrópicos. A densidade de espinhas dendríticas também pode ser aumentada por drogas de abuso no NAcc e CPF de ratos (ROBINSON e KOLB, 1997). Receptores GLU metabotrópicos também são alterados devido à administração repetida de drogas de abuso. O número de receptores mGLUR2/3 diminui com a administração prolongada de cocaína e nicotina (XI et al., 2002; LIECHTI et al., 2007). Tais modificações neuroplásticas geram alterações nas correntes induzidas por AMPA e NMDA, ou seja, alterações na depressão e potencialização a longo prazo. Enfim, Kalivas sugeriu uma nova abordagem para explicar o mecanismo pelo qual neuroadaptações induzidas por drogas de abuso promovem o uso compulsivo. Essa teoria vem a contribuir com as teorias descritas anteriormente, sugerindo que o indivíduo é incapaz de interromper racionalmente o uso de drogas de abuso devido à perda do funcionamento homeostático do sistema GLU.

1.3 Neurobiologia da sensibilização comportamental

Adaptações comportamentais à administração repetida de drogas de abuso incluem o desenvolvimento de tolerância e sensibilização, caracterizadas pela redução e aumento da resposta à droga, respectivamente. A sensibilização comportamental pode ser definida como o aumento de comportamentos (como aumento da atividade locomotora, comportamento rotacional e comportamento estereotipado) devido à administração repetida de drogas de abuso (ROBINSON e BERRIDGE, 2000). O paradigma de sensibilização comportamental é um modelo da neuroplasticidade que ocorre durante a transição do uso para o abuso de drogas. Os comportamentos observados podem ser facilmente quantificados e são mediados por sistemas cerebrais que se sobrepõe àqueles envolvidos na recompensa (WISE e BOZARTH, 1987), portanto, podem ser utilizados para estudar a sensibilização neural.

Diversos fatores influenciam a obtenção experimental de sensibilização comportamental: fatores genéticos (espécie e linhagem animal), hormonais (diferenças entre os sexos), diferenças individuais na susceptibilidade à

sensibilização, via de administração, dose da droga, intervalo entre cada administração, ambiente em que a droga é recebida, estresse, etc. (ROBINSON e BECKER, 1986; STEWART e BADIANI, 1993; ROBINSON et al., 1998). Estes autores demonstraram que diversas drogas de abuso podem produzir sensibilização comportamental – anfetaminas, cocaína, opióides, álcool e nicotina. A sensibilização comportamental é persistente, assim como a dependência. Pode persistir por meses ou anos após a interrupção do tratamento (PAULSON, CAMP e ROBINSON, 1991; CASTNER e GOLDMAN-RAKIC, 1999).

A sensibilização comportamental já foi descrita também em humanos (STRAKOWSKI et al., 1996; STRAKOWSKI e SAX, 1998). Os autores observaram que o segundo tratamento com anfetamina promoveu aumento da atividade, discurso e piscar de olhos. Após a terceira exposição à anfetamina observou-se que a atividade e o piscar de olhos havia aumentado progressivamente ao longo dos tratamentos. Estes autores sugeriram que se as adaptações neurais em humanos forem tão duradouras quanto em animais, podem durar uma vida inteira.

Uma vez que os substratos neurais estejam sensibilizados a determinada droga, indivíduos podem apresentar sensibilização cruzada, ou seja, sensibilização a outras drogas também. A sensibilização cruzada também pode ocorrer entre drogas e estresse (ANTELMAN et al., 1980). Assim, o estresse poderia promover recaída ou susceptibilidade à dependência (PIAZZA et al., 1991; SHAHAM, ERB e STEWART, 2000).

Evidências demonstram que a sensibilização comportamental envolve alterações duradouras nos circuitos de recompensa relacionados ao NAcc (ROBINSON e BERRIDGE, 2000). Está relacionada, por exemplo, ao efluxo de DA no NAcc (ROBINSON e BERRIDGE, 2000; 1993; ROBINSON e BECKER, 1986; KALIVAS et al., 1991; PIERCE e KALIVAS, 1997). Receptores DA D₁ no NAcc se tornam hipersensíveis após a sensibilização, potencializando o sinal na via dopaminérgica mesolímbica (WHITE e KALIVAS, 1998). O GLU também é liberado no NAcc por neurônios do CPF, amígdala e hipocampo (WOLF, 1998; VANDERSCHUREN e KALIVAS, 2000; HYMAN e MALENKA, 2001; EVERITT e WOLF, 2002). Observa-se diminuição da sensibilidade de receptores GLU no NAcc (WHITE et al., 1995; WOLF, 1998). Modificações na estrutura dos neurônios também foram observadas (ROBINSON e KOLB, 1997; 1999a,b). Neurônios do NAcc e CPF

apresentam alterações no comprimento dos dendritos, densidade e tipo de espinos que são o sítio de ação primário de sinapses GLU excitatórias.

É importante enfatizar que o processo de aprendizado associativo (associação dos efeitos da droga com determinado contexto) pode modular a sensibilização neural e conseqüentemente o comportamento (STEWART e VEZINA, 1991; ANAGNOSTARAS e ROBINSON, 1996; ROBINSON et al., 1998). O grupo de Badiani (BADIANI, BROWMAN e ROBINSON, 1995; BADIANI, ANAGNOSTRARAS e ROBINSON, 1995; BADIANI, OATES e ROBINSON, 2000; BADIANI et al, 2000) observou que quando anfetamina, cocaína e morfina eram fornecidas aos animais em um ambiente distinto e relativamente novo, uma sensibilização comportamental mais robusta era observada em comparação ao recebimento da droga na caixa-moradia. Se animais desenvolvem a sensibilização comportamental somente no ambiente em que receberam a droga, diz-se que a sensibilização é específica ao contexto (PERT, POST e WEISS , 1990; ANAGNOSTARAS e ROBINSON, 1996). Portanto, fatores ambientais modulam diretamente o impacto biológico das drogas. Em algumas regiões cerebrais a intensidade da expressão dos genes de resposta imediata c-fos e arc é maior se as drogas são fornecidas em um novo ambiente em comparação à caixa-moradia (BADIANI et al., 1998; KLEBAUR et al., 2002). O aumento dependente de novidade na expressão de genes de resposta imediata envolve o recrutamento de populações adicionais de neurônios, o que aconteceu quando a droga foi fornecida em um ambiente novo. O contexto ambiental e histórico de exposição às drogas modula os efeitos das drogas; tanto efeitos comportamentais quanto de expressão gênica e plasticidade neural. Um contexto ambiental pode promover comportamento de busca pela droga mesmo após longos períodos de abstinência, devido ao condicionamento Pavloviano (CAPRIOLI et al., 2007; BADIANI e ROBINSON, 2004).

Evidências mais diretas de sensibilização neural promovida pela sensibilização comportamental são de estudos onde a auto-administração operante foi realizada posteriormente. A sensibilização comportamental diminuiu a quantidade de treinamento necessária para que os animais aprendessem o procedimento de auto-administração (PIAZZA et al., 1989; 1990; HORGER, SHELTON e SCHENK, 1990, HORGER, GILES e SCHENK, 1992; VALADEZ e SCHENK, 1994; PIERRE e VEZINA, 1998). Em modelos de auto-administração operante com esquema de razão progressiva, os animais se esforçaram mais do que o normal para ganhar a

recompensa (MENDREK, BLAHA e PHILLIPS, 1998; LORRAIN, ARNOLD e VEZINA, 2000). A sensibilização também facilita o aprendizado no paradigma de Preferência Condicionada por Lugar (LETT, 1989; SHIPPENBERG e HEIDBREder, 1995; SHIPPENBERG, HEIDBREder e LEFEVOUR, 1996) e a motivação para obter cocaína (o animal correu mais rapidamente pela passagem que o levou à recompensa) (DEROCHE, LE MOAL e PIAZZA, 1999). Num modelo de recaída animais sensibilizados apresentaram mais rapidamente reinstalação do comportamento de busca pela droga após extinção do comportamento (DE VRIES et al., 1998; 2002).

Robinson e Berridge (2000) sugeriram que para que o modelo de sensibilização comportamental fosse considerado confiável deveria obedecer alguns critérios em comum com a sensibilização neural promovida por drogas com potencial de abuso em humanos: produzir neuroadaptações duradouras em sistemas neurais envolvidos na motivação do incentivo e recompensa; tais neuroadaptações tornam os sistemas de recompensa cerebrais hipersensíveis às drogas e estímulos a ela associados; os sistemas sensibilizados aumentam o “querer” a droga. Esses critérios são validados pelos dados expostos anteriormente.

1.4 Sensibilização psicomotora induzida pelo álcool

Diferentes comportamentos podem ser estudados com diferentes doses de álcool. Enquanto doses mais elevadas (3.5 g/kg – 4,0 g/kg) promovem perda do reflexo postural (HEFNER e HOLMES, 2007; YAKA et al., 2003), o aumento da atividade locomotora devido à administração repetida (sensibilização comportamental ou sensibilização psicomotora) é observado com doses mais baixas de álcool (1,0 g/kg – 3,0 g/kg) (MASUR e BOERGEN, 1980; STEVENSON, BESHEER e HODGE, 2008; BLEDNOV et al., 2004; PHILLIPS et al., 1992; FARIA et al., 2008).

A estimulação locomotora induzida pela administração repetida da mesma dose de álcool foi descrita em camundongos de diferentes linhagens como C57, DBA (CAMARINI e HODGE, 2004; LESSOV et al., 2001) e Swiss (MASUR e BOERGEN, 1980; MASUR, OLIVEIRA DE SOUZA e ZWICKER 1986; FARIA et al.,

2008; de ARAÚJO et al., 2009). É importante salientar que animais da linhagem C57, apesar de apresentarem aumento da atividade locomotora, são mais susceptíveis ao consumo voluntário de álcool. Por outro lado, camundongos da linhagem DBA são mais vulneráveis ao aumento da atividade locomotora do que ao consumo voluntário. De um modo geral, os C57 são conhecidos por não sensibilizarem aos efeitos estimulantes do etanol, apesar de ter sido demonstrado que um histórico prévio de exposição ao etanol, possa induzir sensibilização nestes animais (CAMARINI e HODGE, 2004). Há também grupos de pesquisa que possuem linhagens que apresentam estimulação psicomotora e linhagens que não são afetadas ou respondem com depressão da atividade locomotora - respectivamente, camundongos "FAST" e "SLOW" (PHILLIPS et al., 1992; SHEN, CRABBE e PHILLIPS, 1995). Há relatos do fenômeno em ratos, embora mais escassos (ARIAS et al., 2009; BARBIER et al., 2008; 2009).

Os trabalhos de Masur e Boergen (1980) e MASUR, OLIVEIRA DE SOUZA e ZWICKER (1986) foram pioneiros em demonstrar experimentalmente a sensibilização comportamental com injeções de álcool em camundongos. Masur e Boergen (1980) demonstraram que uma dose aguda estimulatória de álcool promovia aumento pronunciado na atividade locomotora após exposição repetida ao álcool; esse efeito estimulatório não apresentava tolerância, mesmo após 60 dias de tratamento com álcool. Nem mesmo após 5 meses de tratamento o efeito estimulatório se converteu em tolerância (MASUR, OLIVEIRA DE SOUZA e ZWICKER, 1986). Naquela época, aspectos experimentais como delineamento experimental, espécie (rato ou camundongo), linhagem, dose (que poderia produzir efeito estimulatório ou inibitório) já eram discutidos (BREESE et al., 1984; POHORENCKY, 1977; FRYE e BREESE, 1981). Porém, os mecanismos relacionados à estimulação locomotora ao álcool estavam começando a ser questionados (AHLENIUS et al., 1973; CARLSSON, ENGEL e SVENSSON, 1972; CARLSSON et al., 1974; LILJEQUIST, 1978; MATCHETT e ERICKSSON, 1977; STRÖMBOM, SVENSSON e CARLSSON, 1977).

Atualmente, achados de diversos pesquisadores mostram o envolvimento dos sistemas DA e GLU na determinação dos efeitos do álcool na locomoção. Camarini et al. (2000) demonstraram que o antagonismo de receptores NMDA pelo MK-801, administrado sistemicamente, impediu o desenvolvimento de sensibilização locomotora ao álcool. BROADBENT, KAMPMUELLER e KOONSE (2003) relataram

que os antagonistas GLU MK-801 e infenprodil diminuíram a atividade locomotora induzida por injeções repetidas de álcool. Recentemente, Blednov et al. (2004) demonstraram que animais geneticamente modificados que não possuíam o mGLUR4, um dos tipos de receptor GLU metabotrópico, não apresentavam estimulação da atividade locomotora. Porém, eram semelhantes aos animais controle em relação ao consumo voluntário de álcool, gravidade da abstinência e duração da perda de reflexo postural. Le et al. (1997) demonstraram que o tratamento com antagonistas dos receptores DA (D_1 e D_2) impediu completamente efeitos de estimulação locomotora do álcool. Recentemente, Meyer, Meshul e Phillips (2009) observaram que camundongos “FAST” apresentaram níveis mais elevados de DA em comparação aos camundongos “SLOW” após tratamento com álcool. Não foram observadas diferenças nos níveis de GLU. Portanto, os autores sugeriram que a sensibilidade à estimulação locomotora induzida pelo álcool está relacionada com aumento nos níveis de DA no NAcc.

A sensibilização locomotora persiste por algum tempo após o término do tratamento repetido (LESSOV e PHILLIPS, 1998). Além da dose de álcool, espécie e linhagem animal, contexto e delineamento experimental, a idade é uma variável que interfere no fenômeno de sensibilização comportamental. Stevenson et al. (2008) observaram que camundongos adolescentes eram mais sensíveis que adultos aos efeitos agudos de estimulação locomotora do álcool. Porém, adolescentes eram menos sensíveis que adultos ao desenvolvimento de sensibilização comportamental induzido por injeções repetidas; somente a dose mais elevada utilizada (2,5 g/kg) induziu sensibilização no animal adolescente, enquanto doses inferiores induziram sensibilização no animal adulto. Faria et al. (2008) observaram que camundongos adolescentes apresentaram atividade locomotora gradativamente reduzida ao longo do tratamento repetido quando cada injeção foi pareada com o contexto (aparato em que foi quantificada a atividade locomotora). Recentemente, Barbier et al. (2009) testaram o efeito da pré-exposição ao álcool em prole de ratos (Long-Evans) expostos desde o período pré-natal. Esta pré-exposição tornou os animais mais vulneráveis à subsequente sensibilização locomotora ao álcool, outras drogas de abuso (cocaína, anfetamina) e agonista DA (apomorfina). O consumo de álcool aumentou devido à exposição prévia; os efeitos sedativos estavam reduzidos. Os autores relatam que a expressão gênica foi alterada em diversas regiões envolvidas

com reforço. Receptores e sítios de transporte DA sofreram “down-regulation” no estriado dessas proles (BARBIER et al., 2008).

Analisados em conjunto, esses achados demonstram que animais adolescentes são menos sensíveis à sensibilização locomotora ao álcool. Esta resposta comportamental provavelmente reflete as neuroadaptações que estão ocorrendo nesse período. A pré-exposição ao álcool pode tornar os indivíduos mais vulneráveis aos efeitos recompensadores e psicoestimulantes do álcool, o que corrobora a evidência de que a exposição às drogas em períodos críticos do desenvolvimento aumenta a vulnerabilidade para o desenvolvimento da dependência posteriormente. Alterações duradouras nos sistemas de neurotransmissão e respostas comportamentais promovem vulnerabilidade para dependência.

1.5 Alterações neuromoleculares promovidas pelo álcool

As primeiras teorias sobre a ação do álcool no sistema nervoso central foram a Teoria dos Lipídeos e a Teoria das Proteínas (PEOPLES, LI e WEIGHT, 1996). Diferentes Teorias dos Lipídeos postularam que o álcool perturbava a organização dos lipídeos da membrana dos neurônios; a Teoria das Proteínas sugeriu que o álcool afetava proteínas de membrana, como canais iônicos, via ação nos lipídeos de membrana. Porém, essas teorias tem claras limitações. A origem parece ter um enfoque mais biofísico que farmacológico. Alguma desorganização da membrana lipídica, por exemplo, é observada apenas em níveis de álcool próximos da DL₅₀ em humanos (ADDOLORATO et al., 2007); mesmo em concentrações de álcool suficientes para causar perda de consciência, alterações em proteínas de membrana seriam insignificantes (PEOPLES, LI e WEIGHT, 1996).

Posteriormente, David Lovinger, White e Weight (1989) demonstraram que a função NMDA podia ser inibida pelo álcool de maneira concentração-dependente numa quantidade que produz intoxicação em humanos. A capacidade do álcool em inibir a corrente ativada por NMDA está linearmente relacionada ao potencial de intoxicação. Este achado sugere que a inibição da função NMDA produzida pelo álcool contribui para as manifestações neurais e cognitivas associadas à intoxicação.

O receptor NMDA é um canal iônico regulado por ligante. A subunidade NR1 é crucial para a função do canal, enquanto a subunidade NR2 contém o sítio de ligação do GLU; a subunidade NR3 tem uma função regulatória na atividade do canal especialmente em condições patológicas. Estudos eletrofisiológicos sugerem que o álcool interage com domínios que influenciam a atividade do canal (WRIGHT, PEOPLES e WEIGHT, 1996). A função dos receptores GABA é aumentada pelo álcool. Alostericamente, o álcool modula o receptor GABA, abre o canal de cloreto (canal iônico regulado por ligante) e potencializa a hiperpolarização produzida pelo GABA. Um domínio das subunidades α/β do receptor GABA_A está envolvido na ação do álcool (MIHIC et al., 1997). O álcool liga-se a uma proteína entre o segundo e terceiro segmento transmembrana desse receptor. O álcool também afeta diretamente receptores de glicina. Evidências indicam que o álcool age em resíduos específicos de domínios transmembrana (MIHIC et al., 1997) e domínios extracelulares dos receptores de glicina. O álcool também potencializa receptores nAChR (receptores nicotínicos de acetilcolina) e a função do receptor 5-HT₃ (NARAHASHI et al., 1999; LOVINGER e WHITE, 1991; MACHU e HARRIS, 1994). O álcool inibe canais de cálcio tipo L sensíveis à diidropiridina (WANG et al., 1994). Essas ações primárias do álcool em canais iônicos e receptores dependem de numerosas variáveis; particularmente a concentração de álcool e a composição particular de um canal ou receptor (subunidades que os constitui). Assim, receptores GABA que contém a subunidade $\beta 3$ são mais sensíveis ao álcool, ou seja, sofrem alteração na função em quantidades de álcool mais baixas que receptores que não são compostos pela subunidade $\beta 3$ (WALLNER, HANCHAR e OLSEN, 2003). Receptores de glicina que contém a subunidade $\alpha 1$ são mais sensíveis às baixas concentrações de álcool que os receptores que contém a subunidade $\alpha 2$ (MIHIC, 1999). Enquanto em concentrações mais baixas o álcool potencializa somente receptores nAChR constituídos por determinadas combinações de subunidades ($\alpha 2/\beta 4$, $\alpha 4/\beta 4$, $\alpha 2/\beta 2$ e $\alpha 4/\beta 2$), concentrações mais elevadas são menos seletivas e potencializam quase todos os receptores nAChR (HARRIS, 1999). O fato de o álcool afetar mais algumas regiões cerebrais do que outras está ligado à localização dos receptores constituídos de subunidades mais sensíveis aos efeitos do álcool. Os subtipos de receptores NMDA NR1/NR2B, mais sensíveis às ações do álcool, são expressos principalmente em regiões corticais (VENGELIENE et al., 2008).

Em suma, os alvos primários do álcool são os receptores NMDA, GABA_A, 5-HT-3, nAChR e canais de cálcio tipo L. Quando o álcool alcança esses alvos seus efeitos comportamentais se manifestam. Os sinais da intoxicação compreendem a desinibição e sedação, em doses mais baixas e mais altas, respectivamente. Os efeitos nos sistemas de neurotransmissores desencadeiam uma série de eventos relacionados ao reforço e à recompensa. Abaixo serão abordados especificamente os neurotransmissores DA e GLU e os mediadores intracelulares AMPc e PKA (Proteína quinase A), que são o foco desta Tese.

1.5.1 Sistema Dopaminérgico

Em um trabalho pioneiro, Gessa et al. (1985) demonstraram que baixas doses sistêmicas de álcool produzem aumento dose-dependente no disparo de neurônios DA na VTA, ou seja, o álcool pode excitar diretamente neurônios DA na VTA. Posteriormente, Di Chiara e Imperato (1988) demonstraram que o álcool estimula a transmissão DA na via mesolímbica. Em 1995, Pontieri, Tanda e Di Chiara demonstraram que a administração aguda de álcool resulta em liberação de DA na região “concha” do NAcc, utilizando a técnica de microdiálise. Sugere-se que a aferência GABAérgica para a VTA seja o mecanismo envolvido no aumento extracelular de DA no NAcc. O álcool pode diminuir a atividade dos neurônios GABAérgicos, o que subsequente leva a desinibição de neurônios da via DA mesolímbica (SPANAGEL e WEISS, 1999; KOHL et al., 1998). Por sua vez, o aumento de DA no NAcc ativa o sistema de “feedback” GABAérgico. A atividade dopaminérgica é regulada pelo sistema GLU também. Projeções GLU que partem do CPF, hipocampo, amígdala e núcleo paraventricular direcionam-se para o NAcc; agem em receptores ionotrópicos na “concha” do NAcc e induzem liberação de DA (BLAHA et al., 1997; HOWLAND, TAEPVARAPRUK e PHILLIPS, 2002; PARSONS et al., 2007). Dependendo da dose, o álcool pode elevar os níveis extracelulares de GLU no NAcc (baixas doses) ou reduzir (altas doses) (GASS e OLIVE, 2008; MOGHADDAM et al., 1994).

O papel do sistema DA no reforço foi demonstrado por estudos que mostram diminuição na aquisição de comportamento de consumo devido à lesão por 6-

hidroxi-dopamina (IKEMOTO et al., 1997; RASSNICK, STINUS e KOOB, 1993) e pela observação de que agonistas e antagonistas de receptores DA modulam o consumo de álcool em ratos (PFEFFER e SAMSON, 1988; RUSSELL et al., 1996; DYR et al., 1993; McBRIDE e LI, 1998; THANOS et al., 2005). A auto-administração operante de álcool é acompanhada de aumento dos níveis de DA no NAcc em uma linhagem de “P-rats” (ratos que consomem álcool espontaneamente) (WEISS et al., 1996). A exposição do indivíduo abstinente às pistas relacionadas à droga pode promover a liberação de DA mesolímbica (LÖF et al., 2007; WEISS et al., 1992), o que sugere um importante papel da DA na recaída.

Apesar da DA possuir uma função chave na aquisição do reforço, outros neurotransmissores modulam diretamente a atividade dopaminérgica (GABA, GLU, serotonina, acetilcolina, glicina).

1.5.2 Sistema glutamatérgico

A atividade GLU apresenta-se diminuída na exposição aguda ao álcool. Isto se deve ao efeito antagônico do álcool no receptor NMDA. Porém, após o consumo crônico de álcool, os receptores GLU parecem se adaptar aos efeitos inibitórios do álcool aumentando sua atividade excitatória (DARSTEIN et al., 1998; HOFFMAN et al., 1990). Tais respostas adaptativas incluem aumento no número e afinidade de receptores GLU sinápticos. Durante a abstinência, o número e atividade excitatória aumentada dos receptores promove hiperexcitabilidade do sistema nervoso central e pode causar convulsões. Esta excitabilidade também foi relacionada à fissura ou compulsão (LITTLETON, 2000; GASS e OLIVE, 2008).

O GLU excita neurônios DA da VTA (SUAUD-CHAGNY et al., 1992) e, portanto, é um importante mediador de modificações comportamentais produzidas pelo álcool (ECKARDT et al., 1998; KRYSTAL et al., 2003). Apesar de o álcool inibir receptores NMDA, em algumas situações o álcool promove aumento da liberação de GLU (SELIM e BRADBERRY, 1996; DAHCHOUR et al., 2000; ROBERTO et al., 2004; ZHU, BIE e PAN, 2007). A administração sistêmica de álcool aumenta a liberação de GLU no NAcc de ratos com baixa sensibilidade ao álcool (DAHCHOUR et al., 2000) e propensos à dependência (SELIM e BRADBERRY, 1996). No núcleo

central da amígdala o álcool agudo aumentou a liberação de GLU apenas em ratos que receberam tratamento crônico de etanol (ROBERTO et al., 2004; ZHU, BIE e PAN, 2007). Xiao et al. (2009) demonstraram que o álcool aumenta a liberação de GLU em neurônios DA da VTA. O álcool provavelmente potencializa a ação da DA nos receptores D₁ – fato corroborado pela evidência de que o álcool administrado sistemicamente aumenta a DA extracelular na VTA (CAMPBELL, KOHL e MCBRIDE, 1996; YAN et al., 2005). A DA liberada na região somatodendrítica parece modular a liberação de GLU pela ativação de receptores D₁ e D₂ de terminais GLU adjacentes. Segundo Xiao et al., (2009) o álcool poderia estimular a liberação de GLU através de potencialização de receptores D₁ pré-sinápticos. Os autores sugerem que a liberação de DA poderia aliviar, de alguma forma, o aumento da liberação de GLU.

Uma função importante do GLU no sistema mesolímbico é a plasticidade. Drogas de abuso, incluindo-se o álcool, promovem mudanças plásticas em neurônios GLU que se projetam para neurônios DA da VTA (SAAL et al., 2003; UNGLESS et al., 2001). A facilitação da LTP (“long term potentiation” ou potencialização a longo prazo) e bloqueio da LTD (“long term depression” depressão a longo prazo) (LIU et al., 2005; JONES, KORNBLUM E KAUER, 2000) aumentam a responsividade dos neurônios DA ao GLU e promovem aumento da liberação de DA no NAcc e CPF (GIORGETTI et al., 2001). Esses eventos promovem o fortalecimento da sinapse e modificações nos receptores AMPA. Este receptor incorpora a subunidade GLUR1, o que resulta em fortalecimento da sinapse, formando receptores altamente condutíveis do íon cálcio. O recrutamento das subunidades GLUR1 e a potencialização da sinapse como resultado requer a ativação de receptores NMDA (DONG, WAXMAN e LYNCH, 2004).

As modificações induzidas por GLU em neurônios DA estão relacionadas ao desenvolvimento do processo de reforço (ENGBLOM et al., 2008; KAUER e MALENKA, 2007).

1.5.3 Via de sinalização relacionada aos mediadores AMPc/PKA

O desenvolvimento de dependência envolve modificações patológicas induzidas por drogas em mecanismos celulares e moleculares de plasticidade sináptica (HYMAN, 2005; HYMAN, MALENKA e NESTLER, 2006; KELLEY, 2004a, b). Drogas de abuso estimulam vias de sinalização que ativam proteínas quinase e conseqüentemente, ocorre transcrição alterada de genes e síntese de proteínas. Esses eventos geram alterações a longo prazo na função sináptica e redes neurais (LEE e MESSING, 2008).

Seguindo-se a liberação de DA, promovida pelo álcool, os receptores DA do tipo D₁ (D₁ e D₅) são ativados e aumentam a atividade da AC (adenilil ciclase) via acoplamento com proteínas G estimulatórias (G_{αs}). A estimulação de receptores do tipo D₁ resulta em aumento na concentração de AMPc, o que promove dissociação das subunidades regulatórias e catalíticas da PKA. A ativação da sinalização da via da PKA ("cAMP-dependent protein kinase A" ou proteína dependente de cAMP) resulta na fosforilação de substratos. A via AMPc/PKA é a cascata de sinalização primária induzida pela exposição ao álcool (DANIELS e BUCK, 2002; DIAMOND e GORDON, 1997). A expressão de numerosos genes influenciados pelo álcool está relacionada a essa via (THIBAUT et al., 2000; HASSAN et al., 2003).

A PKA é multifuncional e está envolvida em muitos aspectos da função neural, incluindo a plasticidade sináptica (NGUYEN e WOO, 2003; WALTEREIT e WELLER, 2003), exocitose (EVANS e MORGAN, 2003) e transcrição gênica (SANDS e PALMER, 2008). A PKA pode também modular outras vias de segundos mensageiros, como a via da MAPK (WALTEREIT e WELLER, 2003) ("Mitogen-activated protein kinase"). A PKA é expressa em todo o cérebro e é particularmente abundante no córtex, tálamo e amígdala, e moderadamente abundante no NAcc e VTA (LEIN et al., 2007).

A PKA é uma proteína quinase tetramérica constituída por duas subunidades regulatórias e duas catalíticas (BRANDON, IDZERDA e, 1997). Há quatro isoformas de subunidades regulatórias (RIa, RIb, RIIa, RIIb) e três isoformas de subunidades catalíticas (C_α, B_α e C_γ); todas são abundantemente expressas no cérebro (NGUYEN e WOO, 2003). Como tetrâmero, a PKA é inativa. O AMPc, produzido pela AC, ativa a PKA ao ligar-se à subunidades regulatórias, o que resulta em

liberação e translocação das subunidades catalíticas ativas para o núcleo (MEINKOTH et al., 1993). A atividade da PKA pode ser medida pela translocação da subunidade catalítica (MEINKOTH et al., 1993) ou pela fosforilação de substratos específicos, como as subunidades do receptor NMDA. Dentre as diversas quinases que modulam a função NMDA está a PKA, que regula a função das subunidades NR1 e NR2 por fosforilação (TINGLEY, 1993; LEONARD e HELL, 1997). A fosforilação da subunidade NR1 promove aumento na função do receptor NMDA (RAMAN, TONG e JAHR, 1996). A ativação de receptores D1 induz fosforilação mediada pela PKA da subunidade NR1 e fosforilação do fator de transcrição CREB em neurônios estriatais (DUDMAN et al., 2003). A PKA contribui para a plasticidade sináptica ao fosforilar subunidades GluR1 de receptores AMPA, que promove o tráfico do receptor AMPA para a superfície celular (MAN, SEKINE-AIZAWA e HUGANIR, 2007). A ativação da PKA induzida por drogas pode aumentar a força sináptica, o que pode ser detectado eletrofisiologicamente como aumento das correntes AMPA e NMDA (SCHILSTRÖM et al., 2006).

A ativação da PKA depende do AMPc produzido pela ativação de uma ou mais das nove isoformas de AC que são ativadas ou inibidas de maneiras complexas pela proteínas G (COOPER, 2003). Todas as AC são ativadas por proteínas G_{α_s} . AC5 é ativada pela proteína $G_{\alpha_{off}}$. A AC2, AC4 e AC7 são ativadas por subunidades livres da proteína $G\beta\gamma$ liberadas pela proteína $G_{i/o}$. As AC1, AC5, AC6 e AC8 são inibidas pela proteína $G_{\alpha_{i/o}}$. As drogas de abuso aumentam agudamente os níveis de dopamina extracelular no NAcc (NESTLER, 2005), ativando a AC e PKA por estimulação da proteína G_s e G_{off} acopladas a receptores D_1 (NEVE, SEAMANS e TRANTHAM-DAVIDSON, 2004). A dopamina também ativa receptores D_2 acoplados a G_o , levando à inibição de diversas isoformas de AC. A ativação de receptores D_2 pela DA libera as subunidades $G\beta\gamma$ que exercem múltiplos efeitos, como o aumento de AC2 e ativação de AC4, estimulação de GIRK (canais de potássio retificadores de influxo regulados pela proteína G) e inibição de canais de cálcio tipo L, N e P/Q. O efeito das subunidades $G\beta\gamma$ está bem estabelecido e resulta em diminuição da excitabilidade neural e diminuição da liberação de neurotransmissor (NEVE, SEAMANS e TRANTHAM-DAVIDSON, 2004); desta forma, contribui para a sinalização no NAcc. As AC podem ser moduladas por proteínas quinase, incluindo a PKC, que ativa a AC2, AC4 e AC7 (COOPER, 2003).

Além da ativação da via AMPc/PKA por intermédio da proteína G, o etanol pode ativar diretamente a AC. Dentre as 9 isoformas conhecidas, AC7 é 2-3 vezes mais sensível ao etanol do que qualquer outra isoforma. Os tipos 2, 5 e 6 são moderadamente sensíveis ao etanol e os tipos 1 e 3 são insensíveis (YOSHIMURA e TABAKOFF, 1995).

A atividade da PKA é regulada pela DARPP-32, que é abundantemente expressa em neurônios do estriado (OUIMET et al., 1984) e pode inibir proteínas quinase e fosfatase. A DARPP-32 é fosforilada no Thr-75 pela Cdk5 (proteína quinase 5 dependente de ciclina), o que gera inibição da PKA por ativação da PKI (inibidor da proteína quinase) pela DARPP-32 (BIBB et al., 1999). Este evento antagoniza os efeitos da DA no estriado.

Um dos substratos fosforilados pela $C\alpha$ da PKA no núcleo é o fator de transcrição CREB ("cAMP response element-binding protein"). A fosforilação do CREB pela PKA pode resultar em aumento da transcrição de genes que contêm o CRE ("cAMP response element" ou elemento de resposta ao AMPc) na região promotora (LONZE e GINTY, 2002). O CREB tem como alvos genes que controlam a neurotransmissão, estrutura celular, transdução de sinal, transcrição e metabolismo (LONZE e GINTY, 2002). Diversos pesquisadores sugerem que a fosforilação do CREB é crucial para manter a plasticidade sináptica normal do cérebro (FRANK e GREENBERG, 1994; GLAZEWSKI et al., 1999; JOSSELYN et al., 2001). Alguns dos genes ativados pelo CREB estão relacionados ao fator de liberação da corticotrofina, BDNF ("brain-derived neurotrophic factor" ou fator neurotrófico derivado do cérebro), Neuropeptídeo Y e outros (HEILING e KOOB, 2007; McGOUGH et al., 2004; THIELE et al., 1998; CRABBE et al., 2006).

A exposição breve ao álcool aumenta a produção de AMPc em culturas de células e preparações isoladas de cérebro (NAGY, et al., 1989; SAPRU, DIAMOND e GORDON, 1994; RABIN, EDELMAN e WAGNER, 1992; TABAKOFF et al., 1988). A exposição prolongada ao álcool resulta em uma dessensibilização adaptativa na produção de AMPc em cultura de células (NAGY et al., 1989; RABE et al., 1990; RABIN et al., 1993; GORDON, COLLIER E DIAMOND, 1986) e cérebro de camundongos (WAND et al., 1993). A diminuição na produção de AMPc pode ser devido a diminuição na quantidade e / ou atividade de diversas proteínas chave nesta via, incluindo a proteína $Gs\alpha$ (MOCHLY-ROSEN et al., 1988), a subunidade regulatória RI da PKA (DOHRMAN, DIAMOND e GORDON, 1996) e subunidades

catalíticas da PKA (COE et al., 1996; RIUS et al., 1986). Aumento da Gi também foi relatado após exposição crônica ao álcool (CHARNESS, QUERIMIT E HENTLEFF, 1988).

A subunidade catalítica da PKA $C\alpha$ transloca-se do Complexo de Golgi para o núcleo durante exposição prolongada ao álcool e permanece no núcleo enquanto o álcool estiver presente (*in vitro*) (DOHRMAN et al., 1996). Esta permanência prolongada da PKA no núcleo pode ser responsável pelas mudanças induzidas pelo álcool na expressão gênica (DIAMOND e GORDON, 1997), pois sua presença resulta na fosforilação do CREB (CONSTANTINESCU, DIAMOND E GORDON, 1999). Sugere-se que o álcool inibe a reassociação da $C\alpha$ com as subunidades regulatórias da PKA e inativa PKI ("Protein kinase inhibitor" ou inibidor de proteína quinase).

A administração aguda de psicoestimulantes aumenta a atividade da PKA e fosforilação de alvos da PKA. Em roedores, injeção aguda de cocaína aumenta a fosforilação da DARPP-32, NR1 e GluR1 mediada pela PKA no córtex pré-frontal medial e NAcc (SCHEGGI et al., 2007) e fosforilação da DARPP-32 no estriado (NISHI et al., 2000). A administração aguda de cocaína a camundongos aumenta a ativação da proteína fosfatase 2A (PP-2A) mediada pela PKA, que fosforila a DARPP-32 no sítio de fosforilação da Cdk5, Thr-75, promovendo sinalização mediada pela PKA (NISHI et al., 2000). O etanol aumenta a atividade da PKA agudamente ao inibir a recaptação de adenosina pelo transportador de nucleosídeo equilibrativo tipo I, o que aumenta os níveis extracelulares de adenosina, ativa a proteína G_{olf} acoplada a receptores de adenosina A2a, estimula AC e aumenta os níveis de AMPc (NAGY, DIAMOND e GORDON, 1991; DOHRMAN et al., 1996). Esse processo leva à migração das subunidades catalíticas da PKA para o núcleo *in vivo* (DOHRMAN et al., 1996). A administração crônica de etanol em ratos aumenta a atividade da PKA no córtex (PANDEY, ROY e MITTAL, 2001).

Há relatos de que o AMPc e a PKA contribuem para a sensibilização locomotora induzida por psicoestimulantes. Injeção de inibidor de PKA na VTA reduz a sensibilização locomotora induzida pela anfetamina; por outro lado, um ativador da PKA aumenta a sensibilização locomotora em ratos (TOLLIVER et al., 1999). O aumento da atividade do AMPc pela fosfoquina também aumenta a atividade locomotora induzida por cocaína em ratos (SCHROEDER, HUMMEL e UNTERWALD, 2004). Muitas drogas de abuso promovem aumento da atividade da

PKA na abstinência. Há evidências relacionadas à cocaína (LU et al., 2003), THC (TZAVARA et al., 2000) e morfina (CHARTOFF et al., 2003). Durante a abstinência de etanol, a fosforilação do CREB apresenta-se reduzida na amígdala central e medial (PANDEY, ROY e ZHANG, 2003).

A manipulação da atividade da PKA pode aumentar ou reduzir a auto-administração em roedores. Em ratos treinados para auto-administração de cocaína, injeções de inibidor de PKA no NAcc reduzem a auto-administração, enquanto injeção de ativador da PKA aumenta a auto-administração. A auto-administração não sofreu alterações quando os fármacos foram injetados no Caudato Putamen, indicando que os efeitos da PKA na auto-administração de cocaína estão relacionados ao NAcc. (SELF et al., 1998b). A PKA também modula o consumo de etanol. A ativação dos receptores de adenosina A2a aumenta atividade da PKA (COOPER, 2003) principalmente no NAcc, onde esses receptores são abundantemente expressos (FINK et al., 1992). A injeção sistêmica de um antagonista deste receptor reduz a auto-administração de etanol em ratos (THORSELL, JOHNSON e HEILIG, 2007). Animais que expressam uma forma de PKA menos ativa apresentam redução no consumo e preferência de etanol em comparação ao animal que não foi manipulado geneticamente (WAND et al., 2001). Por outro lado, injeção de inibidor da PKA na amígdala central aumentou o consumo e preferência (PANDEY, ROY e ZHANG, 2003). Em animais deficientes (“knock-out”) da subunidade regulatória da PKA (THIELE et al., 2000) o consumo de álcool apresenta-se aumentado; a infusão de inibidor de PKA na “concha” do NAcc aumenta o consumo voluntário (MISRA e PANDEY, 2006). Em “P-rats” (linhagem de ratos que apresenta alta preferência por álcool) os níveis de fosfo-CREB apresentam-se reduzidos em comparação aos “NP-rats” (animais que consomem menos álcool que a linhagem “P-rats”) (BELL et al., 2006). Um inibidor da PKA reverteu o fenótipo dos “NP-rats”, que consumiram mais álcool e apresentaram redução na função do CREB (PANDEY et al., 2005). Camundongos deficientes do gene que codifica o CREB apresentaram consumo aumentado de álcool em comparação a animais controle (PANDEY et al., 2004). Assim, os efeitos da PKA no comportamento de consumo variam de acordo com a região estudada, particularidades relacionadas ao protocolo e aparato experimental, espécie e linhagem animal.

Diversas drogas de abuso requerem a participação da PKA no estabelecimento da Preferência Condicionada por Lugar. A aquisição de PCL à anfetamina apresentou-se reduzida quando um inibidor da PKA foi co-administrado com a anfetamina no NAcc durante as sessões de condicionamento (BENINGER, NAKONECHNY e SAVINA, 2003). Injeções intracerebroventriculares de um inibidor da PKA, imediatamente após cada sessão de condicionamento, reduziu a consolidação da Preferência Condicionada por Lugar (CERVO et al., 1997). Microinjeções de inibidores da PKA na VTA ou no hipocampo reduzem a consolidação de Preferência Condicionada de Lugar à morfina (HARRIS et al., 2004; SHARIFZADEH et al., 2006).

1.6 Outros modelos animais para o estudo do mecanismo de recompensa

Além da atividade locomotora, quantificada em campo aberto, foram também utilizados outros modelos comportamentais para o estudo dos efeitos do álcool sobre os mecanismos de recompensa em camundongos adolescentes e adultos.

1.6.1 Preferência Condicionada de Lugar

O paradigma de PCL pode testar as propriedades motivacionais de reforçadores naturais como interação social de ratos jovens (CALCAGNETTI e SCHECHTER, 1992b), interação de ratas com filhotes (MAGNUSSON e FLEMING, 1995), interação sexual de ratos com ratas (OLDENBURGER, EVERITT e DE JONGE, 1992), água (PERKS e CLIFTON, 1997), solução adocicada (PERKS e CLIFTON, 1997; AGMO e MARROQUIN, 1997; STEFURAK e VAN DER KOOY, 1992, 1994) e comida (LEPORE et al., 1995; PERKS e CLIFTON, 1997).

O aparato de Preferência Condicionada por Lugar é utilizado para estudar os efeitos motivacionais positivos (recompensadores) e negativos (aversivos) de objetos (comida, brinquedos) ou experiências (drogas, abstinência a drogas, choque nas patas, etc) especialmente em roedores (ratos, camundongos). O procedimento

padrão envolve condicionamento Pavloviano clássico no qual uma pista ambiental distinta (estímulo condicionado positivo, “positive conditioned stimulus” ou CS+) é associada a um determinado evento (estímulo não condicionado, “unconditioned stimulus” ou US). No presente estudo a pista ambiental foi o compartimento (CS) em que o animal recebeu a injeção de álcool ou solução salina; sendo a injeção (US) o evento associado a essa pista. Como resultado dessa associação, o CS adquire a capacidade de evocar uma resposta motivacional condicionada semelhante àquela característica do US. No presente contexto, a associação do ambiente (CS) com a injeção (US) faz com que o ambiente, por si só, promova uma resposta motivacional semelhante àquela resultante da injeção (de álcool ou solução salina). Esse tipo de aprendizado permite ao indivíduo prever situações e preparar-se para eventos futuros com base na experiência prévia.

O procedimento mede o efeito motivacional condicionado ao oferecer ao animal escolha entre uma localização espacial contendo o CS+ e uma localização adjacente, que contém um estímulo que não foi associado com o US (CS-). Quando o US é recompensador, roedores tendem a aproximar-se e permanecer em contato com o CS+. Assim o estímulo promove “Conditioned Place Preference”, PCL ou Preferência Condicionada de Lugar. Porém, os roedores tendem a evitar contato com aquele ambiente se o US causa aversão (“Conditioned Place Aversion”, CPA ou Aversão Condicionada de Lugar). No presente estudo, foi medido o efeito motivacional do álcool (US). Já que o álcool é uma droga de abuso e, portanto, promove efeitos motivacionais recompensadores, é esperado que os animais queiram permanecer no ambiente em que receberam a droga (CS+), ao invés do ambiente em que receberam solução salina (CS-).

As pistas ambientais têm um papel importante na compulsão e no “craving” (fissura). Humanos associam o efeito da droga com o ambiente em que é utilizada (ROBBINS e EHRMAN, 1992). Por medir o efeito motivacional o procedimento de Preferência Condicionada por Lugar é muito empregado no estudo da neurobiologia da recompensa de drogas de abuso (BARDO e BEVINS, 2000) e recaída (PILLA et al., 1999; NEISEWANDER et al., 2000), já que pistas ambientais podem facilitar a recaída. É útil também para estudar os circuitos envolvidos na recompensa (CARR e WHITE, 1983; 1986).

Dentre os estudos mais antigos que deram origem ao PCL como conhecemos hoje estão os de Spragg (1940) e Beach (1957). Spragg (1940) deu injeções diárias

de morfina a chimpanzés. Depois que se tornaram dependentes, os chimpanzés foram treinados a escolher entre uma caixa branca contendo a seringa com morfina e uma caixa preta, contendo uma banana. Quando privados de morfina, os animais escolhiam abrir a caixa branca, mas quando recebiam sua dose diária, optavam pela caixa preta, que continha a banana. Com base nesse experimento com chimpanzés, Beach (1957) percebeu que ratos dependentes de morfina também podiam ser treinados a escolher o braço branco de um labirinto em Y, quando este era pareado com a morfina. Rossi e Reid (1976) publicaram um relato de PCL à morfina no qual o parâmetro “tempo gasto” no compartimento pareado à morfina em comparação ao tempo de permanência no compartimento pareado à solução controle foi utilizado. Com isso, os estudos de PCL que se seguiram passaram a adotar o parâmetro “tempo” como índice de preferência (BARDO e BEVINS, 2000). Posteriormente, o grupo de Christopher L. Cunningham desenvolveu uma metodologia sensível e controlada para o estudo da PCL a drogas de abuso (CUNNINGHAM e PRATHER, 1992; CUNNINGHAM, DICKINSON e OKORN, 1995; CUNNINGHAM, OKORN e HOWARD 1997; CUNNINGHAM, CLEMANS e FIDLER, 2002; CUNNINGHAM et al., 2002 ; CUNNINGHAM, 1995). Este autor utiliza principalmente camundongos da linhagem DBA.

Em 2006 Christopher L. Cunningham, Gremel e Groblewski publicaram na revista “Nature Protocols” o protocolo utilizado pelo grupo por muitos anos de pesquisa e que discute diversos aspectos relacionados ao protocolo experimental e ao aparato. Cunningham, Gremel e Groblewski (2006) descrevem neste artigo o protocolo de PCL ao álcool. Geralmente incluem 3 etapas: habituação (1 sessão de 5 minutos), condicionamento (8 ou mais sessões de 5 minutos) e teste (uma ou mais sessões de 30-60 minutos). O protocolo dura duas semanas. No dia do teste o animal tem a opção de escolher entre o compartimento associado com a injeção da droga (“positive conditioned stimulus” - CS+) ou o compartimento associado com a solução controle (“negative conditioned stimulus” - CS-), em decorrência do condicionamento Pavloviano. (Cunningham, Gremel e Groblewski, 2006). Geralmente os animais não recebem injeção no dia do teste, exceto quando o efeito do pré-tratamento de uma droga no reestabelecimento ou expressão da resposta motivacional condicionada está sendo estudada (CUNNINGHAM, DICKINSON e OKORN, 1995).

Se antes de qualquer associação de um estímulo (CS) com os ambientes do aparato (US) os animais naturalmente preferem determinada textura do chão e/ou determinada característica de parede, o experimento é enviesado. O resultado obtido no dia do teste sofrerá influência desse viés. Assim, no dia do teste o experimentador não poderá afirmar que: os animais preferiram determinado ambiente porque foi associado à droga; não preferiram o ambiente associado com o estímulo porque a droga tem efeitos aversivos. Isso ocorre porque preferências e aversões aprendidas pelos animais (antes do condicionamento) são impostas sobre preferências não aprendidas (pareamento do CS+ com o US) (CUNNINGHAM, FERREE e HOWARD, 2003). Assim, o US poderia aumentar ou reduzir a resposta motivacional não aprendida.

Segundo Cunningham Gremel e Groblewski (2006) um aparelho é considerado “não-enviesado” quando a quantidade de tempo gasta em cada compartimento é compatível com a expectativa baseada no acaso, ou seja, espera-se que cada animal permaneça cerca de 50% do tempo em cada compartimento. Além do ambiente, determinadas linhagens de animais ou animais geneticamente manipulados (“knock-out”) podem apresentar um comportamento enviesado.

Os parâmetros temporais de cada fase experimental são fundamentais para a eficiência do condicionamento (CUNNINGHAM GREMEL E GROBLEWSKI, 2006). Na maioria dos estudos o animal é colocado no compartimento imediatamente após uma injeção ip, pois as concentrações sanguíneas e cerebrais da droga estarão aumentando no início do condicionamento. Porém, dependendo da via de administração, é preciso esperar algum tempo até que a droga seja absorvida. A via ip, por exemplo, produz um efeito aversivo de curta duração seguido por um efeito recompensador duradouro (CUNNINGHAM e HENDERSON, 2000; CUNNINGHAM, OKORN e HOWARD, 1997). Em comparação, a via intragástrica produz uma absorção mais lenta (NURMI, KIIANMAA e SINCLAIR, 1994), e promove CPA na dose de 2,0 g/kg – a mesma dose que produz PCL quando o álcool é administrado por via ip em camundongos DBA (CUNNINGHAM, CLEMANS e FIDLER, 2002). O efeito aversivo inicial à administração do álcool também explica a CPA observada quando a injeção é aplicada depois que o animal é retirado do aparato; o sujeito experimental associa o CS ao efeito aversivo da injeção (CUNNINGHAM et al., 2002). Intervalos muito longos entre a injeção e a exposição ao aparato (como 60 minutos, por exemplo) não são eficazes em promover PCL (CUNNINGHAM, OKORN

e HOWARD, 1997). Uma exposição relativamente curta (5 minutos) é mais eficaz na indução de PCL quando o álcool é administrado por via ip em camundongos DBA e outras linhagens de camundongos (CUNNINGHAM e PRATHER, 1992). Porém, condicionamentos de duração mais longa (60 minutos) são mais eficazes em induzir PCL à cocaína na mesma linhagem (CUNNINGHAM et al., 1999). Cunningham, Gremel e Groblewski (2006) fazem um intervalo de pelo menos 24 horas entre cada condicionamento. Porém, alguns pesquisadores realizam 2 condicionamentos por dia (CALCAGNETTI e SCHECHTER, 1992a; TZSCHENTKE e SCHMIDT, 1997; BOLANOS et al., 1996). Cunningham, Gremel e Groblewski (2006) relatam que depois de terem feito testes de 60 minutos por muito tempo, agora fazem testes de 30 minutos na maioria dos experimentos, pois observaram preferência mais fraca por parte dos animais ao final de uma sessão tão longa. Porém, em alguns casos específicos uma sessão mais longa foi necessária para detectar um efeito (CUNNINGHAM, DICKINSON e OKORN, 1995; CUNNINGHAM, HENDERSON e BORMANN, 1998).

O CS pode agregar pistas olfativas, visuais, táteis, auditivas e elementos espaciais. Apesar disso, há evidências na literatura de que um único elemento (estímulo tátil do chão diferenciado) pode controlar a PCL (VEZINA e STEWART, 1987).

Gremel e Cunningham (2009; 2008) investigaram a participação do NAcc e amígdala no aprendizado e expressão do comportamento controlado por pistas previamente pareadas com o álcool. Quando foram realizadas lesões no NAcc e amígdala antes do condicionamento a PCL apresentou-se reduzida em comparação aos animais controle ou “sham” no dia do teste. Porém quando as lesões na amígdala e NAcc foram realizadas antes do teste, apenas a lesão na amígdala promoveu diminuição (lesão unilateral) ou aboliu completamente (lesão bilateral) a PCL. Os autores sugerem que a lesão do NAcc e amígdala antes do condicionamento promoveu danos no processo de aprendizado associativo entre a pista e os efeitos reforçadores primários do álcool, o que resultou em redução da PCL no dia do teste. As lesões realizadas antes do teste provavelmente promoveram diminuição da associação da pista com o efeito da droga ou incapacidade de trazer à memória esta associação; esse evento seria dependente da amígdala. A partir desses resultados de lesão do NAcc e amígdala, o próximo passo dos pesquisadores foi avaliar a função dos receptores DA na amígdala e dos

receptores NMDA no NAcc. Afinal, já que VTA envia aferências para a amígdala e NAcc, a expressão de PCL poderia depender da ativação de receptores nessas áreas (GREMEL e CUNNINGHAM, 2009). Além disso, a amígdala basolateral também envia aferências para o NAcc (GROENEWEGEN, WRIGHT e BEIJER, 1996). Os achados mostram que a administração do antagonista DA (antagonista D₁, D₂ e D₃) flupentixol no NAcc antes do teste não afetou a expressão de PCL. Porém, a administração do antagonista DA na amígdala basolateral e central impede a expressão da PCL. O antagonismo de receptores NMDA no NAcc pelo AP-5 antes do teste reduz a expressão de PCL (GREMEL e CUNNINGHAM, 2009).

Em relação aos receptores NMDA, Boyce-Rustay e Holmes (2006) mostraram que camundongos “knock-out” da subunidade NR2A não apresentaram PCL; os autores sugerem que essa subunidade tem uma função importante no aprendizado contextual relacionado os efeitos reforçadores do álcool.

Curiosamente, apesar das evidências de participação de estruturas do sistema dopaminérgico mesolímbico na recompensa a drogas de abuso, Dickinson et al. (2003) administraram antagonistas dopaminérgicos (SCH23390, raclopride e U99194A) a camundongos da linhagem DBA/2J antes do teste e observaram que a PCL ao álcool não foi afetada. Em comparação, quando Spina et al. (2010) administraram o antagonista D₁ SCH39166 a ratos antes das sessões de condicionamento com álcool ou acetaldeído, observaram que a PCL não se instalou. Portanto, a participação dos receptores D₁ na PCL está relacionada ao período de condicionamento, ou seja, aprendizado associativo. Este achado é corroborado e ampliado por Walter e Ettenberg (2007), que observaram que a infusão do antagonista DA flufenazina no “concha” do NAcc de ratos antes das sessões de condicionamento atenuou o desenvolvimento de PCL. Savelieva, Caudle e Miller, (2006) também demonstraram a importante participação da DA no fenômeno de PCL ao mostrarem que animais deficientes do transportador de monoaminas (DA, noradrenalina, serotonina) VMAT2, do citoplasma para a vesícula, não apresentavam PCL, ou seja, na ausência de DA vesicular que pode ser liberada na sinapse a PCL não acontece. Os receptores D2 também estão envolvidos de alguma forma com os efeitos recompensadores do álcool e aprendizado associativo, pois animais “knock-out” desses receptores não apresentam PCL (CUNNINGHAM et al., 2000).

Embora ainda sejam escassos dados relacionados ao sistema GABAérgico na modulação da PCL, Chester e Cunningham (1999) demonstraram que antagonistas GABA_A (bicuculina e picrotoxina) aumentam a magnitude da PCL, ou seja, o bloqueio de receptores GABA_A aumenta os efeitos motivacionais do álcool. Há evidências da participação do sistema opióide na manifestação da PCL. O bloqueio de receptores opióides no córtex cingulado anterior, uma região relacionada à atribuição de propriedades de incentivo motivacional às pistas relacionadas a drogas, também reduz a PCL (GREMEL, YOUNG e CUNNINGHAM, 2011). O efeito de drogas utilizadas para o tratamento da dependência ao álcool (naltrexone e acamprosato) foram testadas experimentalmente no paradigma de PCL. Cunningham et al. (1998) levantaram a hipótese de que o naltrexone poderia interferir no processo de aprendizado associativo. Caso essa proposta se confirmasse, o naltrexone seria capaz de extinguir tanto a PCL quanto a CPA. Porém o naltrexone aumentou a expressão da aversão, ou seja, dificultou a extinção da aversão. Portanto, apesar de não interferir no aprendizado associativo, o naloxone contribui para a aversão ao álcool. Recentemente, Wróbel (2011) demonstrou que a administração de naloxone antes das sessões de condicionamento atenuou a aquisição de PCL em camundongos C57. Camundongos tratados com acamprosato (utilizado para evitar a recaída ao uso de álcool) 10 minutos antes da administração de álcool (2,0g/kg), apresentaram redução no desenvolvimento de PCL (McGEEHAN e OLIVE, 2003), o que demonstra que o acamprosato pode diminuir os efeitos recompensadores do álcool.

1.6.2 Auto-Administração

Um dos primeiros pesquisadores a realizar auto-administração de álcool foi Meisch (MEISCH, WAHLSTROM e PICKENS, 1970; MEISCH e THOMPSON, 1972). Os ratos deveriam pressionar uma barra para que o álcool estivesse disponível para consumo. Meisch observou que o comportamento era persistente, ou seja, produzia reforço. Posteriormente, Meisch comprovou que o álcool e outras drogas eram reforçadores também em macacos *rhesus* (CARROLL e MEISCH, 1978; 1980; MEISCH e HENNINGFIELD, 1977; MEISCH et al., 1975; MEISCH, KLINER e

HENNINGFIELD, 1981). Samson contribuiu para o desenvolvimento do modelo de consumo voluntário de álcool em animais de laboratório (SAMSON et al., 1998) e posteriormente levantou discussões relacionadas ao mecanismo de reforço (SAMSON et al., 2000) e substratos neurais envolvidos (SAMSON, TOLLIVER e SCHWARZ-STEVENSON, 1990; SAMSON e HARRIS, 1992; SAMSON et al., 1992).

O álcool pode ser reforçador pela via de administração oral em diferentes espécies como ratos, camundongos e macacos. Pode variar de acordo com a linhagem (LESSOV et al., 2001; CAMARINI e HODGE, 2004), sexo (TAMBOUR, BROWN e CRABBE, 2008) e idade (RODD-HENRICKS et al., 2002a; 2002b) dos animais. Embora a restrição de comida seja aconselhável para que a auto-administração de algumas drogas aumente, no caso do álcool não é estritamente necessária (STEWART et al., 1996). O procedimento pode ser realizado em acesso restrito (algumas horas por dia) ou contínuo (a droga está sempre disponível) (BLEDNOV et al., 2005; LESSOV et al., 2001).

A auto-administração oral é evitada por alguns pesquisadores devido à dificuldade de o animal ingerir a droga de forma voluntária. Se a droga tiver um sabor aversivo, os animais provavelmente optarão por beber água se tiverem escolha. Os animais talvez bebam uma quantidade muito pequena da solução da droga; insuficiente para promover efeitos farmacológicos. Além disso, por via oral, o intervalo entre a ingestão e o efeito da droga, proporcionado quando ela chega ao sistema nervoso central, pode ser de mais de 5 minutos. Este intervalo é considerado muito longo para que o sujeito experimental desenvolva comportamento operante. A principal vantagem é a semelhança com o consumo do álcool em humanos (MEISCH, 2001).

Diversos pesquisadores comparam linhagens de ratos ou camundongos que consomem mais ou menos álcool em seus estudos. Camundongos da linhagem C57 consomem mais álcool que camundongos da linhagem DBA (CAMARINI e HODGE, 2004). Existem linhagens selecionadas, como ratos da linhagem “P-rats” (“Alcohol Preferring Rats” ou ratos que preferem álcool) e “NP-rats” (“Non-Preferring rats”; ratos que consomem pouco álcool em comparação à linhagem “P-rats”) (McBRIDE et al., 2005; PAUTASSI et al., 2011). Há ainda grupos de pesquisa que classificam os animais em “Addicted”, “Heavy” e “Light”; respectivamente, animais que apresentam preferência significativa pelo álcool em todas as fases experimentais em que o álcool está disponível (Livre-escolha, Re-exposição, Adulteração), animais que consomem

em nível intermediário (geralmente não apresentam consumo significativo na fase de Adulteração de sabor, quando o quinino é adicionado à solução de álcool produzindo sabor amargo), e animais que preferem água em todas as fases experimentais (RIBEIRO et al., 2008). Se os animais não consomem álcool espontaneamente devido à linhagem e condições experimentais, a sacarose pode ser adicionada à solução de para produzir um sabor mais agradável, não aversivo (CAMARINI e HODGE, 2004; WALKER e EHLERS, 2009).

Muitos pesquisadores utilizam protocolos com diversas fases experimentais semelhantes a Ribeiro et al. (2008) para mimetizar os diversos fenômenos envolvidos na dependência ao álcool em humanos. Primeiramente os animais adquirem o comportamento de auto-administração. Em seguida, faz-se um período de abstinência. A re-exposição seria semelhante à recaída em seres humanos. Finalmente, o sabor do álcool torna-se amargo com a adição de quinino. A adulteração do sabor confirma que apesar do sabor aversivo, a fissura mantém o comportamento de consumo. A auto-administração oral pode ser operante ou voluntária. A operante envolve um aparato em que o sujeito experimental deve pressionar uma barra para que determinada quantidade de álcool esteja disponível num recipiente. Em protocolos de consumo voluntário, em que garrafas estão disponíveis na gaiola moradia, o animal tem livre escolha entre duas (CAMARINI e HODGE, 2004), três (FACHIN-SCHEIT et al., 2006) ou quatro (RAEDER et al., 2008) garrafas sendo que uma das garrafas contém água e as outras são constituídas de concentrações crescentes de álcool.

O sistema DA mesolímbico está envolvido no comportamento de consumo de álcool (HODGE, SAMSON e CHAPPELLE, 1997). A administração sistêmica de antagonistas DA geralmente resulta em redução no consumo de álcool na caixa-moradia (DYR et al., 1993; PFEFFER e SAMSON, 1986) e redução do comportamento de pressionar a barra (PFEFFER e SAMSON, 1985; PFEFFER e SAMSON, 1988). Lesões de neurônios catecolaminérgicos que se projetam para o NAcc reduzem o consumo de álcool (BROWN e AMIT, 1977; MYERS e MELCHIOR, 1975; RICHARDSON e NOVAKOVSKI, 1978). A auto-administração de álcool promove alterações no NAcc. GRIFFIN, MIDDAGH e BECKER (2007) demonstraram, utilizando a técnica de microdiálise, que a auto-administração de álcool a camundongos C57 num protocolo de acesso limitado origina álcool no NAcc em níveis consistentes com a quantidade consumida. Wang et al. (2007)

demonstraram que a auto-administração de álcool promove modificações neuroplásticas no estriado dorsal de ratos; mais especificamente, fosforilação da subunidade NR2B dos receptores NMDA relacionada à aumento da atividade da Fyn Quinase (enzima que fosforila NR2B). A facilitação da atividade NMDA pelo álcool pode produzir potencialização a longo prazo, mediada por receptores AMPA (CALABRESI et al., 1992; PARTRIDGE, TANG e LOVINGER, 2000; KERR e WICKENS, 2001). Por outro lado, antagonistas NMDA diminuem o consumo de álcool numa linhagem de ratos que apresenta preferência por álcool (McMILLEN et al., 2004) e inibem a reinstalação de comportamento de busca pelo álcool (BACKSTROM e HYYTIA, 2004). O infenprodil reduz a recaída em ratos privados de álcool (VENGELIENE et al., 2005). O subtipo do receptor GLU mGLUR5 tem um papel importante no comportamento de auto-administração de álcool em camundongos C57, pois, o antagonista MTEP (3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl) ethynyl]-pyridine) reduziu o consumo de álcool de maneira dose dependente e também após repetidos períodos de privação (COWEN, KRSTEW e LAWRENCE, 2007; HODGE et al., 2006; SCHROEDER, OVERSTREET e HODGE, 2005). A transmissão GABAérgica no NAcc está envolvida com a auto-administração. HODGE, CHAPPELLE e SAMSON (1995) demonstraram que a administração de muscimol (agonista GABA_A) no NAcc reduz a resposta reforçadora num paradigma de auto-administração operante. Assim, os autores sugerem que a ativação de receptores GABA_A e transmissão GABAérgica no NAcc está envolvida na resposta reforçadora ao álcool. Manipulações do receptor opióide μ também interferem no consumo do álcool. Camundongos “knock-out” deste receptor apresentam redução no consumo de álcool (BECKER et al., 2002). Injeções intraperitoneais de naltrexone antes do acesso limitado às garrafas, em camundongos C57, reduziram o consumo de maneira dose-dependente (KAMDAR et al., 2007).

Diversos pesquisadores incluem em seus protocolos de auto-administração um ou mais períodos de abstinência. Durante esse período ocorrem neuroadaptações importantes na expressão e fosforilação de receptores GLU no estriado (RAEDER et al., 2008). Receptores GLU AMPA também foram relacionados à auto-administração e recaída (SANCHIS-SEGURA et al., 2006). O antagonismo AMPA reduziu a reinstalação e o fenômeno “alcohol deprivation effect” (Efeito da privação de álcool: consiste em consumo aumentado de álcool em comparação ao período anterior à privação). No hipocampo, a abstinência de álcool aumentou a

neurogênese e diferenciação celular em “P-rats”. Esse achado foi relacionado à restauração parcial do hipocampo devido à retirada do álcool. Em contrapartida, Stevenson et al. (2009) demonstraram que a abstinência reduz a neurogênese hipocampal em camundongos C57; e o tratamento com o antidepressivo desipramina impediu o dano hipocampal. Segundo Weiss et al. (1996) a auto-administração promove aumento de DA e serotonina no NAcc. A abstinência suprime a liberação desses neurotransmissores e a re-exposição ao álcool restaura os níveis dos neurotransmissores, porém, não completamente. Essa poderia ser uma explicação para a recaída.

1.6.3 Intoxicação com vapor de álcool e auto-administração

Além de fatores biológicos e ambientais, o histórico de exposição a drogas de abuso de um indivíduo contribui para o desenvolvimento da dependência. Por isso, no presente estudo, um protocolo de múltiplas intoxicações com álcool intercaladas com abstinência foi utilizado. Entre os episódios de intoxicação / abstinência foram inseridos períodos de consumo voluntário de álcool na caixa moradia, para avaliar o possível efeito dos episódios intoxicação / abstinência no comportamento de consumo.

Estudos anteriores demonstraram que a exposição crônica ao álcool juntamente com a experiência da abstinência aumentou o consumo voluntário de álcool na caixa moradia utilizando-se um paradigma de acesso limitado em camundongos C57 adultos (BECKER e LOPEZ, 2004). Este modelo pode ser comparado com a natureza crônica e episódica da dependência ao álcool, já que os indivíduos experimentam intoxicação devido ao consumo pesado de álcool seguido de tentativas de abstinência ou indisponibilidade da droga. Conseqüentemente, o indivíduo passa por períodos de abstinência intercalados por períodos de intoxicação. Períodos de abstinência levam animais (SPARTA et al., 2009; FINN et al., 2007; MELENDEZ, MIDDGAUGH e KALIVAS, 2006) e humanos a aumentarem o consumo quando a droga está disponível novamente. Estudos clínicos mostram que indivíduos apresentam episódios de recaída para aliviar os sintomas de abstinência. O alívio da abstinência é motivação para manutenção do consumo excessivo

(KOOB, 2003; KOOB e LE MOAL., 2001). Assim, indivíduos dependentes têm diversas oportunidades de associar o consumo de álcool com a sensação de alívio dos sintomas de abstinência.

Evidências demonstram que a intoxicação apresenta diferenças dependentes da idade. Camundongos e ratos jovens (HEFNER e HOLMES, 2007; SILVERI e SPEAR, 1998) se recuperam mais rapidamente da intoxicação que animais adultos; porém, são mais sensíveis aos efeitos deletérios da dose intoxicante de álcool (DE BELLIS et al., 2005; 2000; MONTI et al., 2005), incluindo dano cerebral (CREWS et al., 2000; SLAWECKI, THORSELL e EHLERS, 2004; WHITE e SWARTZWELDER, 2004; BROWN e TAPERT, 2004; BROWN et al., 2000).

Como discutido nesta introdução, adolescentes de várias espécies diferem dos adultos em aspectos comportamentais e neuroquímicas. Entretanto, estudos que mostram as respostas comportamentais e neuroquímicas de animais adolescentes ao tratamento prolongado com etanol são escassos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da exposição repetida de etanol em camundongos adolescentes e adultos.

2.2 Objetivos específicos

- a)** Quantificar o neurotransmissor glutamato no Núcleo Accumbens de camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol;
- b)** Quantificar o neurotransmissor dopamina e metabólitos no Núcleo Accumbens e Estriado de camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol.
- c)** Quantificar o segundo mensageiro AMPc no Estriado de camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol.
- d)** Quantificar a atividade da enzima PKA no Estriado de camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol.

e) Comparar os efeitos reforçadores do etanol entre camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol no paradigma de Preferência Condicionada por Lugar.

f) Comparar os efeitos reforçadores do etanol entre camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol no paradigma de Auto-Administração num protocolo de Livre Escolha entre duas garrafas.

g) Comparar o comportamento de consumo de camundongos adolescentes e adultos da linhagem C57, vulnerável ao consumo voluntário de álcool, num protocolo de múltiplas intoxicações com vapor de etanol seguidas de abstinência.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss Webster adolescentes (PND = 28-30 dias no começo dos experimentos) e adultos (PND = 58-60 dias no começo dos experimentos). Os animais foram alojados em grupos de 5, em caixas de polycarbonato (30 x 20 x 12,5 cm), mantidos sob temperatura constante ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00h). Todos os experimentos foram conduzidos entre 8:30 e 11:30h da manhã. Durante o procedimento de auto-administração os animais foram alojados individualmente. Água e comida foram fornecidos livremente. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.2 Drogas

O etanol (ET) (Merck do Brasil S. A., Rio de Janeiro, R.J., Brasil®) foi dissolvido em 0,9% de cloreto de sódio (solução salina fisiológica – SAL) para produzir uma solução de 20% volume/volume de etanol. A solução salina (SAL) também foi utilizada como solução controle. Todas as injeções foram administradas intraperitonealmente (ip). Animais dos grupos controle receberam volumes equivalentes de SAL.

3.3 Quantificação da atividade locomotora dos animais no campo aberto

A atividade geral dos animais foi avaliada no campo aberto (uma arena circular de madeira de 40 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura). Uma câmera de vídeo foi instalada acima dos aparatos.

Cada animal foi colocado individualmente no centro do aparelho 5 min após a injeção e a atividade locomotora foi gravada em vídeo por 5 min. A análise da distância percorrida foi quantificada (em centímetros) pelo *software* “Ethovision” (Noldus, Wageningen, Holanda).

Após cada observação, os campos abertos foram limpos com uma solução de álcool-água 5%, antes da introdução do próximo animal, a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo sujeito anterior.

3.4 Procedimentos para realização da microdiálise “*in vivo*”

3.4.1 Cirurgia estereotáxica, coleta e análise das amostras e localização da cânula

Após o tratamento com injeções ip repetidas de ET ou SAL os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação da cânula guia.

A anestesia foi induzida com 5% de isoflurano e mantida com 1,5-2,5% durante a cirurgia, utilizando-se o oxigênio para manutenção da respiração. O animal foi posicionado no estereotáxico para realização da cirurgia. O pêlo acima do crânio foi raspado e a região foi higienizada com solução de álcool iodado. Foi feita uma incisão com bisturi eletrônico para exposição do crânio. Uma incisão foi feita na posição +1,7 mm anteriormente e 0,9 mm lateralmente ao bregma (de acordo com atlas de Franklin e Paxinos, 2001), onde uma cânula guia foi inserida no núcleo accumbens, aprofundando-se aproximadamente 5 mm (CAMARINI et al., 2008). Uma outra incisão foi feita para inserção de um parafuso, o que contribuiu para ancorar a cânula ao crânio. A cânula guia e o parafuso foram fixados com resina

dentária. Tanto os parafusos quanto os instrumentos utilizados foram previamente esterilizados.

Dois dias após a recuperação da cirurgia, os animais foram colocados no sistema de coleta. A sonda do sistema (CMA/7, membrana de 1 mm de cuprofano, CMA) foi posicionada dentro da cânula guia para coleta do dialisado enquanto os animais se moviam livremente na cuba de acrílico. Os túbulos do sistema de coleta receberam líquido cérebroespinal artificial (em mM: Na: 150; K: 3,0; Ca: 1,4; Mg: 0,8; P: 1,0; Cl: 155) através de uma bomba de infusão para seringas (2µl/min), possibilitando a obtenção das amostras. Aos tubos de polipropileno utilizados para coleta foram adicionados 5,0 µl de ácido perclórico (1M) para evitar a degradação da dopamina. Doze amostras foram coletadas a cada 15 min. Primeiramente, foram coletadas 4 amostras basais. Após uma injeção intraperitoneal de etanol ou solução salina, mais 8 amostras foram coletadas.

As amostras do dialisado foram estocadas a -80° C até o momento da análise. O conteúdo de glutamato nas amostras foi determinado por CLAE acoplado a um detector eletroquímico (HPLC-ED; ESA Inc., North Chelmsford, MA). (CAMARINI et al., 2008; OLIVE, MEHMERT, HODGE, 2000). Posteriormente, os valores absolutos dos níveis de glutamato nas amostras foram convertidos em porcentagem do conteúdo basal.

Após os procedimentos de microdiálise os animais foram anestesiados com overdose de uma solução de ketamina/xilazina. O coração do animal foi exposto e uma solução de heparina foi injetada no ventrículo esquerdo. Foi realizada transfusão transcardíaca com uma solução 4% de paraformolaldeído em salina tamponada (pH 7,4). Após a perfusão o cérebro foi removido e colocado numa solução contendo 4% de paraformolaldeído e 10% de sacarose até o dia seguinte. Em seguida, os cérebros foram cortados em criostato e as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram corados pela técnica de Nissl (com tionina). A localização das cânulas no NAcc foi verificada de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (2001). Apenas animais com cânulas localizadas no NAcc foram incluídos na análise dos dados. Oito animais foram excluídos do estudo devido à localização inapropriada das cânulas.

3.4.2 Princípio da Técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O aparato para Cromatografia Líquida de Alta Resolução permite a separação de componentes dissolvidos em solução.

O reservatório de fase móvel é constituído de uma solução líquida que carrega a amostra ao longo do percurso com o auxílio de uma bomba (0,1M NaH_2PO_2 , 25% vol/vol de metanol (pH =6,75). Esta faz fluir o eluente pelo injetor, coluna e detector. A função do injetor é injetar a amostra que passará pela coluna, onde serão separados os componentes da amostra. O detector revela os elementos que constituem a amostra líquida examinada.

Cada elemento leva um tempo particular para passar pela coluna. Isso depende da interação do elemento com os componentes da coluna. Quanto mais tempo um componente fica retido na coluna, maior o pico observado. Assim, os elementos são diferenciados numa amostra conforme o pico detectado.

3.5 Dosagem de dopamina, DOPAC (Ácido 3,4-dihidroxifenilacético) e HVA (Ácido homovanílico) no Núcleo Accumbens e Estriado

Os cérebros dos animais foram imediatamente congelados em isopentano após o sacrifício e armazenados em freezer -80°C . Os encéfalos foram dissecados em criostato a -20°C . Seguindo-se as coordenadas estereotáticas do Atlas de Paxinos; Watson (2005) fatias coronais de cerca de 1mm foram selecionadas e a área de interesse (Estriado) retirada por meio de agulha ponta chata de 15 Gauge (técnica de “punch”). As fatias coronais de interesse apresentaram as coordenadas a partir do bregma +2,0 mm a +1,0 mm para o Estriado.

A técnica para determinação destas substâncias foi recentemente padronizada no laboratório da Prof. Dra. Cleópatra da Silva Planeta (Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia; Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP) e baseia-se naquelas descritas por Patel et al. (2005). Para a determinação das concentrações de dopamina, HVA e DOPAC, as amostras foram homogeneizadas em 60 μL de ácido perclórico 0,1M,

centrifugadas a 13.150 g, 10 min e 4°C. Foi injetado 40µL do sobrenadante no sistema de cromatografia. As diluições dos tecidos encefálicos foram padronizadas em experimentos preliminares para adequação da concentração das substâncias quantificadas dentro da faixa de linearidade do detector.

O sistema CLAE consiste do cromatógrafo 2465 Waters® Alliance (Waters, Milford, MA-USA) com um detector eletroquímico 2465 de carbono vítreo e coluna de fase-reversa (Symmetry C18, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm and 100-Å de diâmetro de poro da partícula; Waters). A diferença de potencial foi ajustada para 800 mV versus um eletrodo de referência de Ag/AgCl. A fase móvel, em fluxo de 1 mL/minuto consistiu de Tampão (88,5%) Ácido cítrico (50 mM), KCL (2 mM), EDTA (0,1 mM), e Ácido heptanosulfônico (1,2mM), sendo o pH ajustado para 3,2 com NaOH ; Metanol (9,4%) e Acetonitrila (2,1%). A fase móvel foi filtrada a vácuo e degaseificada por ultra-som .

A curva de calibração foi construída com soluções padrões de 2,5-200 ng/ml de dopamina e DOPAC, e 1,25-100ng/ml de HVA, injetados no cromatógrafo em triplicata. O limite de detecção e quantificação foram, respectivamente, para a dopamina: 0,5 e 1,66 ng/ml; para o DOPAC: 0,7 e 2,4 ng/ml; para o HVA: 1,9 e 6,4 ng/mL. Quando as concentrações das amostras ficavam abaixo do limite de quantificação, as mesmas eram excluídas. Por fim, as concentrações das substâncias eram corrigidas pela massa das amostras de tecido dissecadas, sendo expressas em ng da substância por mg de tecido.

3.6 Determinação dos níveis de AMPc

Foi utilizado o “kit” “Amersham Cyclic AMP (³H) Assay System®” (GE Healthcare).

3.6.1 Princípio do Ensaio

O ensaio é baseado na competição entre o AMPc da amostra e uma quantidade fixa de AMPc ligado ao ^3H ; ^3H -AMPc. Estes elementos competem pela ligação a uma proteína caracterizada por alta especificidade e afinidade pelo AMPc. Assim, a quantidade do complexo de ^3H -AMPc + proteína formada é inversamente proporcional a quantidade de AMPc presente na amostra. Em outras palavras, quanto maior a quantidade de AMPc presente na amostra, menor a quantidade do complexo $[^3\text{H}]\text{AMPc}$ + proteína, e vice-versa.

A quantificação do complexo ligado ao elemento radioativo permite o cálculo da quantidade de AMPc presente na amostra. Os valores são determinados por uma curva padrão linear.

3.6.2 Descrição dos Procedimentos

O conteúdo de AMPc do sobrenadante foi determinado por método radiométrico utilizando-se “kit” de quantificação de AMPc (Amersham®), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O método consiste na competição entre o AMPc das amostras e 180 pmol de ^3H -AMP cíclico por uma proteína ligadora de AMPc (GILMAN, 1970). A curva padrão de AMPc foi preparada por meio de diluições sucessivas da solução-estoque padrão de AMPc (1600 pmol) obtendo-se amostras padrão com 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 pmol/ml. A curva padrão de AMPc foi calculada por meio de regressão linear dos valores obtidos das amostras padrão, e o

conteúdo de AMPc das amostras experimentais foi calculado interpolando-se os valores na curva padrão de AMPc utilizando-se programa computacional GraphPad Prism® para Windows (versão 3.0, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como pmoles de AMPc por placa.

Ao tecido cerebral foi adicionado tampão (EDTA) para permitir a solubilização no vórtex e sonicator. As amostras foram então fervidas por 15 min para inativar a fosfodiesterase. Posteriormente foram preparados tubos contendo a amostra, o ^3H -AMPc, e a proteína ligadora. Foi acrescentado também o carvão ativado para evitar ligações inespecíficas. A centrifugação permitiu que apenas os complexos formados com a proteína ficassem no sobrenadante. O sobrenadante obtido recebeu líquido de cintilação para contagem de radiação emitida em amostras colocadas em placa.

3.7 Quantificação da atividade da PKA

Para quantificação da atividade da PKA foi utilizado o “kit” “PepTag Assay for Non-Radioactive Detection of Protein Kinase C or cAMP-Dependent Protein Kinase ®” (Promega Corporation, Madison, W. I., Estados Unidos).

3.7.1 Princípio do Ensaio

O ensaio utiliza um peptídeo fluorescente altamente específico para a PKA (Peptídeo A1 ou kemptide). A fosforilação do substrato específico altera a carga de +1 para -1. Esta mudança na carga permite que o substrato, em suas versões fosforilada e não-fosforilada, seja rapidamente separado em gel de agarose. A espécie fosforilada migra em direção ao eletrodo positivo, enquanto o substrato não-fosforilado migra em direção ao eletrodo negativo. Até este ponto o resultado obtido é Qualitativo. As bandas fosforiladas e também o controle negativo são cortadas do gel e derretidas em banho-maria. Posteriormente, são colocadas numa placa para leitura da absorbância. A partir do valor da absorbância, são feitos cálculos que

permitem a quantificação da atividade da PKA. Essa etapa permite um resultado Quantitativo da atividade da PKA.

3.7.2 Descrição dos Procedimentos

O tecido cerebral foi primeiramente homogeneizado no tampão de extração, feito conforme as especificações do fabricante (25 mM de Tris-HCl – pH 7,4; 0,5 mM de EDTA; 0,5 mM de EGTA; 10 mM de b-mercaptoetanol; 1 µg/ml de leupeptina; 1 µg/ml de aprotinina e PMSF: 0,5 ml da solução estoque para cada 100 ml do tampão de extração - a solução estoque era constituída de 100 mM de PMSF diluído em 100% de etanol). Foram utilizados pistilos para a homogeneização. A amostra foi centrifugada (14.000 x g; 4°C, por 5 min). O sobrenadante foi preservado para preparação das amostras. Além dos tubos que continham as amostras, foram preparados o controle positivo (não continha amostra de tecido; mas sim a enzima PKA fornecida pelo fabricante) e o controle negativo (não continha amostra de tecido ou enzima PKA fornecida pelo fabricante). A todos os tubos foi acrescentado o peptídeo A1 (kemptide), que é fosforilado pela PKA. Assim, a PKA das amostras fosforilou o peptídeo em questão conforme a atividade da PKA de cada amostra. Semelhantemente, a PKA do tubo “controle positivo” (cuja atividade era previamente conhecida) também fosforilou o peptídeo. Nenhuma reação ocorreu no tubo “controle negativo”. As amostras foram colocadas num gel horizontal para separação de amostras com peptídeo fosforilado e com peptídeo não-fosforilado. Obteve-se com esse procedimento um resultado Qualitativo. As bandas fosforiladas de interesse foram cortadas do gel, derretidas e preparadas para o plaqueamento. A absorbância foi lida e os valores foram utilizados para se calcular a atividade da PKA de cada amostra. Obteve-se com esse procedimento um resultado Quantitativo.

3.8 Preferência Condicionada por Lugar

O aparato da PCL consiste de uma caixa retangular (46,5 x 12,7 x 12,7 cm) dividida em três compartimentos separados por portas do tipo guilhotina. O central é cinza e tem piso liso. Outro compartimento possui paredes brancas e piso de tela reticulada; o último compartimento possui paredes pretas e piso de grades.

Os estudos de PCL envolveram uma sessão de habituação, 8 sessões de condicionamento e uma sessão teste.

No primeiro dia, os animais foram colocados no aparato por 5 min, 1 minuto após uma injeção de salina com acesso a todos os compartimentos. Este procedimento é denominado “habituação” e consiste no conhecimento do aparato para evitar possíveis interferências relacionadas à exploração de um ambiente desconhecido nas sessões de condicionamento e teste. Além disso, a sessão de habituação permite verificar se existe alguma preferência não condicionada entre os animais. Durante as sessões de condicionamento, o pareamento com a droga foi alternado com salina. Dentro de cada grupo experimental, metade dos animais recebeu a droga no compartimento preto e a outra metade no compartimento branco e vice-versa para salina. Os animais foram colocados no centro com acesso aos dois compartimentos, 1 minuto após a injeção. Ao entrarem no compartimento que deveria ser pareado com a substância em questão, foram neste confinados por 5 min (CUNNINGHAM GREMEL e GROBLEWSKI, 2006). O condicionamento durou oito dias (4 dias com etanol alternados por 4 dias com salina). No dia do teste, os animais foram colocados no centro com livre acesso para todos os compartimentos. A quantidade de tempo gasto em cada compartimento foi registrada por 30 min. Como não houve preferência por um dos compartimentos no dia da habituação, a preferência condicionada foi medida pela percentagem de tempo gasto no compartimento pareado com a droga em relação ao tempo total gasto nos dois compartimentos.

Quadro 1 - Protocolo de Preferência Condicionada por Lugar

GRUPOS	D1 Hab	D2, D4, D6 e D8 Cond (5 min)	D3, D5, D7 e D9 Cond (5 min)	D10 teste
ET-J	5 min de livre acesso	A) Preto: ET(n/2) B) Branco: ET (n/2)	A) Branco: SAL (n/2) B) Preto: SAL (n/2)	30 min de livre acesso
ET-A		A) Preto: ET (n/2) B) Branco: ET (n/2)	A) Branco: SAL (n/2) B) Preto: SAL (n/2)	
SAL-J		A) Preto: ET (n/2) B) Branco: ET (n/2)	A) Branco: SAL (n/2) B) Preto: SAL (n/2)	
SAL-A		A) Preto: ET (n/2) B) Branco: ET (n/2)	A) Branco: SAL (n/2) B) Preto: SAL (n/2)	

3.9 Auto-administração de etanol

A auto-administração foi monitorada utilizando-se o teste de preferência por duas garrafas; uma contendo água+sacarose (Solução Controle) e outra contendo água+sacarose+etanol (Solução de Etanol). Esse procedimento foi descrito detalhadamente por Samson (1986), no qual fizemos modificações com base em experiências anteriores com auto-administração (CAMARINI e HODGE, 2004; MELIS et al., 2002; FACHIN-SCHEIT et al., 2006). O etanol 95% (Sigma ®) foi diluído em água para preparação das soluções de etanol.

Este protocolo é constituído por 4 fases: Livre Escolha, Abstinência, Re-exposição e Adulteração. Foram calculados o “Consumo” (g/kg) e a “Preferência” por etanol:

Consumo:
$$\frac{\text{concentração de etanol na solução} \times \text{volume consumido de etanol}}{\text{Peso (g)} / 1000}$$

Preferência:
$$\frac{\text{volume consumido de etanol}}{\text{volume total consumido (solução de etanol + solução controle)}} \times 100$$

Livre Escolha: A cada 4 dias as concentrações das soluções de sacarose e etanol foram alteradas conforme a tabela que se segue. O período em que os animais

tinham disponível a solução que continha 10% de etanol foi de 8 dias, a fim de se estabelecer um consumo “estável” dessa solução. Os animais foram pesados a cada 48 horas, para que posteriormente pudéssemos calcular o quanto cada animal bebeu da solução de etanol em relação ao seu peso (medida de “Consumo”). As quantidades de álcool e água consumidas foram calculadas com base na diferença entre o peso inicial e final de cada garrafa a cada 48h. Dessa forma, obtivemos 2 medições de cada concentração e 4 medições quando a concentração de 10% foi atingida. Foi feita a média das medições de cada concentração para a análise estatística.

Quadro 2 - Fase de Livre Escolha (Protocolo de Auto-Administração)

	SOLUÇÃO DE ETANOL		SOLUÇÃO CONTROLE
	CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE	CONCENTRAÇÃO DE ETANOL	CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE
DIAS 1-4	10%	2%	10%
DIAS 5-8	8%	4%	8%
DIAS 9 -12	6%	6%	6%
DIAS 13-16	4%	8%	4%
DIAS 17-24	2%	10%	2%

Abstinência: Os animais tiveram acesso apenas à água durante 8 dias.

Re-exposição: os animais tiveram novamente acesso à Solução de Etanol (Etanol 10% / Sacarose 2%) e Controle (Sacarose 2%) por 8 dias. O volume consumido de cada solução foi pesado, assim como os animais, a cada 48h.

Adulteração: para a Solução Controle foi mantida a concentração de 2% de sacarose. A Solução de Etanol continha 2% de sacarose, 10% de etanol e 0,004 g/L (FACHIN-SCHEIT et al., 2006) de quinino anidro, criando uma solução de gosto amargo aversivo.

3.10 Auto-administração em animais expostos a sucessivas sessões de intoxicação crônica com vapor de etanol e abstinência

Quadro 3 - Protocolo de Intoxicação Crônica com vapor de etanol e abstinência:

	SEG	TER	QUA	QUI	SEX	SAB
BASAL	garrafas colocadas às 13h	Quantificação das garrafas às 13h				quantificação e retirada das garrafas às 13h
CICLO I	Injeção de ET ou C + 16h vapor / 8h abstinência Coleta de sangue (MA)					
TESTE 1	garrafas colocadas às 13h	Quantificação das garrafas às 13h				quantificação e retirada das garrafas às 13h
CICLO II	Injeção de ET ou C + 16h vapor / 8h abstinência Coleta de sangue (MA)					
TESTE 2	garrafas colocadas às 13h	Quantificação das garrafas às 13h				quantificação e retirada das garrafas às 13h
Coleta de sangue de todos os animais e sacrifício						

3.10.1 Auto-administração de etanol

O etanol (95% v/v) foi dissolvido em água destilada para o preparo de uma solução de 15% de etanol. A solução controle utilizada foi água de torneira.

Os animais foram alojados individualmente e expostos ao paradigma de livre escolha entre duas garrafas (solução de etanol 15% x solução controle). Foi um procedimento de 5 dias em que as garrafas eram colocadas na segunda-feira às 13h e a última quantificação era realizada no sábado às 13h. Logo em seguida as garrafas eram retiradas e os animais recebiam apenas água até a próxima sessão de auto-administração.

A quantidade de água e etanol consumidos foram quantificadas diariamente, assim como o peso corpóreo dos animais. Estas quantificações permitiram que fossem calculados o volume consumido em relação ao peso corpóreo (g/kg) e a preferência pela solução de etanol. Quando as garrafas com as soluções eram removidas da gaiola para quantificação, sempre às 13h, eram substituídas por garrafas similares.

As soluções sempre estavam frescas e eram oferecidas em temperatura ambiente. A posição das garrafas era alternada diariamente. Os animais receberam água e comida livremente ao longo do experimento.

3.10.2 Exposição a sessões de intoxicação crônica com vapor de etanol seguidas de abstinência

Após a primeira semana experimental (Consumo Basal), em que os animais foram expostos ao paradigma de livre-escolha entre duas garrafas, grupos de animais adolescentes e adultos foram subdivididos nos grupos “Múltiplas Abstinências (MA)” e “Controle (CTR)”. Os grupos MA receberam 4 ciclos (de segunda-feira a quinta-feira) de 16h de exposição contínua ao vapor de etanol em câmaras de inalação, com um período de 8h separando cada exposição. Os animais dos grupos CTR passaram pelo mesmo procedimento; porém, foram colocados em

câmaras com ar nas horas correspondentes a exposição ao etanol para os outros animais.

As câmaras de inalação de vapor de etanol (ou ar) tinham 60 x 36 x 60 cm de medida. Em cada uma cabia 6 gaiolas.

O etanol (95%) do sistema da câmara era volatilizado e misturado com ar fresco. O nível de etanol na câmara era de 7 litros/min. Nessas condições os níveis de álcool no sangue dos animais é de 150-200 mg/dl em camundongos C57 (LOPEZ e BECKER, 2003).

Antes dos animais dos grupos MA serem colocados nas câmaras de inalação, a intoxicação era iniciada pela administração ip de etanol (1,6 g/kg; 8% w/v) juntamente com pirazole (1 mmol/kg), que é um inibidor da álcool desidrogenase, para estabilizar a concentração de álcool no sangue. As duas drogas eram injetadas em um volume de 20 ml/kg (ou 0,2 ml/g) de peso corpóreo. Animais dos grupos C receberam injeções de solução salina 0,9% e pirazole antes de serem colocados na câmara de ar.

Dentro das câmaras de vapor as condições de alojamento foram idênticas àquelas do biotério, ou seja, a gaiola dos animais alojados individualmente, com água e comida, era colocada dentro da câmara.

Os animais foram submetidos a esse procedimento nas 2 semanas (Ciclo I e Ciclo II) que foram intercaladas com as 3 semanas de auto-administração (Basal, Teste 1 e Teste 2).

3.10.3 Dosagem de etanol nas câmaras de inalação de vapor

A concentração de etanol nas câmaras de inalação foi monitorada diariamente (8h). Amostras do ar foram coletadas com uma seringa através de um pequeno orifício na parede da câmara. A amostra de ar era então transferida para tubos Venoject® (Terumo Corporation, Tokyo, Japão) conectados a um analisador. A concentração de etanol nas câmaras era expressa em mg/litro de ar.

3.11 Dosagem de etanol no sangue

Amostras de sangue foram obtidas dos animais expostos ao vapor de etanol (MA) 2 vezes por semana (terça-feira e quinta-feira) nas semanas de exposição ao vapor (Ciclo I e Ciclo II). Assim que os animais foram retirados das câmaras de inalação as amostras de sangue foram coletadas do plexo retro orbital em tubos capilares contendo heparina e centrifugadas a 14000 rpm por 15 min. Uma amostra de 10 µl do sobrenadante resultante (plasma) foi utilizada para um ensaio enzimático realizado pelo Analox® (Analox Instruments, Lunenburg, MA, USA). O ensaio é baseado na conversão de etanol a acetaldeído pela álcool desidrogenase. A quantidade de oxigênio consumida na reação é diretamente proporcional à quantidade de substrato inicialmente presente. Amostras de sangue de todos os animais também foram obtidas ao final do experimento, após o período “Teste 2.

Amostras de sangue também foram obtidas de animais adolescentes e adultos que receberam tratamento repetido com injeções de etanol ou solução salina (Experimento 4.1). Quinze e 60 min após injeção de etanol, amostras de sangue foram obtidas do plexo retro-orbital. Aos 180 min após a injeção os animais foram sacrificados e o sangue do tronco foi utilizado para determinação dos níveis de etanol no sangue.

3.12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software “STATÍSTICA”, versão 7. A análise utilizada está descrita para cada experimento a seguir. Em todas as análises estatísticas desta Tese foi considerado o valor de $p < 0,05$.

Delineamentos Experimentais,

Resultados e

Discussões Parciais

4 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS, RESULTADOS E DISCUSSÕES PARCIAIS

4.1 Quantificação de glutamato no núcleo accumbens de camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol

4.1.1 Delineamento Experimental

Sensibilização Comportamental

Camundongos Swiss adolescentes (J) e adultos (A) foram divididos em quatro grupos com 12 animais cada (J-SAL, J-ET, A-SAL e A-ET) no início do experimento. Nos dois primeiros dias que antecederam o tratamento os animais foram expostos ao campo aberto (CA) 5 min após uma injeção de solução controle (solução salina 0,9%). A atividade locomotora foi registrada por 5 min. Este procedimento permitiu a habituação dos animais ao campo aberto. Posteriormente, os animais foram tratados por 15 dias consecutivos com injeções intraperitoneais de 1,8 g/kg de etanol (ET) ou solução salina 0,9% (SAL). A atividade locomotora em campo aberto foi registrada no primeiro, oitavo e décimo quinto dias, 5 min após a injeção, por 5 min.

Quadro 4 - Protocolo de Sensibilização Comportamental

GRUPOS	(2 dias)	1-15 *
	Habituação	Tratamento
SAL-J/A	SAL	SAL
ET-J/A	SAL	ET

*Exposição ao CA nos dias experimentais 1, 8 e 15.

Este protocolo foi utilizado em todos os experimentos que envolveram sensibilização comportamental.

Dois grupos controle adicionais (animais adolescentes e adultos; n=9 no início do experimento) foram tratados repetidamente com injeções de solução salina e receberam injeção de solução salina também no momento da coleta do dialisado

Microdiálise

Animais tratados de acordo com o item “Sensibilização Comportamental” foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação da cânula guia, 2 dias após o final do tratamento. Três dias após a cirurgia, as sondas foram implantadas e as amostras coletadas. Após a coleta de 4 amostras basais, todos os animais receberam uma injeção de etanol (1,8 g/kg) ou solução salina e mais 8 amostras foram coletadas. Dessa forma, os animais receberam injeção desafio de etanol ou solução salina 5 dias após o final do tratamento repetido. (Ver o item 3.4 para uma revisão da metodologia). Após o experimento, os animais foram sacrificados para obtenção de cortes histológicos que permitiram localizar a cânula. Oito animais foram excluídos do experimento, pois a cânula estava localizada fora do Núcleo Accumbens.

Concentração de etanol no sangue

Para investigar a possibilidade de que a concentração de etanol no sangue poderia variar conforme a idade e possível correlação dos níveis de etanol no sangue com a quantidade de glutamato, um grupo separado de animais foi tratado exatamente como descrito no item “Sensibilização Comportamental” (n=8, por grupo). No dia experimental “desafio”, correspondente ao momento da coleta do dialisado, amostras de sangue foram obtidas 15, 60 e 180 min após a injeção de 1,8 g/kg de etanol, conforme descrito em 3.10.3.

Análise estatística

Para o experimento de sensibilização comportamental foi utilizada a ANOVA de 2 vias (idade x tempo) para medidas repetidas seguida do test post-hoc de Newman-Keuls para analisar o período da habituação. A ANOVA de 3 vias (idade x tratamento x tempo) para medidas repetidas, seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls foi utilizada para analisar o período do tratamento repetido. Portanto, os períodos experimentais “Habituação” e “Tratamento” foram analisados separadamente – exceto neste experimento (4.1), quando um grupo de animais extras foi tratado somente com solução salina (figura 1A), pois a variável “tratamento” era inexistente. Os experimentos a seguir, que também incluem sensibilização comportamental, foram analisados dessa forma.

Para comparação das amostras basais do dialisado foi utilizada a ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x tempo) para medidas repetidas seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls. Também foi aplicada a ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x tempo) para medidas repetidas seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls para comparar as amostras coletadas após a injeção de etanol entre si. Para cada grupo experimental foi calculada a média das 4 amostras basais para que as amostras experimentais (coletadas após a injeção de etanol) fossem comparadas a esse valor, que foi considerado “100%” para a representação gráfica. Para essa comparação, foi utilizada a ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x tempo). Em alguns casos, foi realizada uma ANOVA de 1 via (tempo) para cada grupo separadamente, com o objetivo de comparar as amostras experimentais (após a injeção desafio), obtidas ao longo do tempo, com o valor basal daquele grupo.

Para análise estatística da concentração de etanol no sangue foi utilizada a ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x tempo) para medidas repetidas seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls.

4.1.2 Resultados

Atividade Locomotora

Figura 1 - Distância percorrida (cm) de animais adolescentes (J) e adultos (A) tratados com injeções intraperitoneais repetidas de 1,8 g/kg de etanol (ET) ou solução salina (SAL) por 15 dias consecutivos (Tratamento). Nos 2 dias que antecederam esse tratamento os animais receberam injeção de solução salina e foram habituados ao campo aberto (Habituação). ANOVA de duas vias (idade x tempo) seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls (Habituação); o período de tratamento foi analisado pela ANOVA de 3 vias (idade x tratamento x tempo) (figura 1B) ou 2 vias (idade x tempo) (figura 1A). Foi utilizado o teste post-hoc de Newman-Keuls. O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n=12 animais por grupo (figura 1B)

n=9 animais por grupo (figura 1A)

○ $p < 0,05$ em comparação a hab. 1

● $p < 0,05$ em relação aos grupos tratados com solução salina, no mesmo dia experimental

□ $p < 0,05$ em comparação ao mesmo grupo experimental (A-ET) no primeiro dia de tratamento, trat. 1.

A figura 1 representa a atividade locomotora de animais adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol (1,8 g/kg) ou solução salina por 15 dias consecutivos. A atividade locomotora foi quantificada nos 2 dias de habituação que antecederam o tratamento repetido, no primeiro dia de tratamento (tratamento agudo), na metade do tratamento (8º) e no último dia de tratamento (15º dia).

Em relação ao procedimento de Habituação da figura 1B a ANOVA de 2 vias (idade x tempo) para medidas repetidas seguida do teste post-hoc Newman-Keuls revelou efeito do tempo [$F(1,44)=26,03$; $p<0,05$], indicando habituação ao aparato. De fato, no segundo dia de habituação todos os grupos apresentaram diminuição significativa da locomoção em relação ao primeiro dia.

A ANOVA de 3 vias (idade x tratamento x tempo) para medidas repetidas seguida do teste post-hoc Newman-Keuls revelou diferenças significativas também no período do tratamento (figura 1B). Foi detectado efeito do fator tratamento [$F(1,44)=51,54$; $p<0,05$] que revelou aumento significativo na atividade locomotora em camundongos tratados repetidamente com etanol em comparação aos animais tratados repetidamente com solução salina, mostrando que o etanol possui efeito estimulante nessa dose. Esse efeito foi confirmado pela interação dos fatores tratamento x tempo [$F(2,88)=3,77$; $p<0,05$]. Também foi detectada interação dos fatores idade x tratamento x tempo [$F(2,88)=3,14$; $p<0,05$] que revelou aumento significativo na atividade locomotora de animais adultos tratados com etanol no 15º dia de tratamento em comparação ao 1º dia de tratamento. Camundongos adolescentes não apresentaram diferenças na atividade locomotora ao longo dos 15 dias de tratamento. Esse resultado sugere que animais adultos, mas não adolescentes, desenvolveram sensibilização comportamental ao etanol.

A análise da atividade locomotora dos grupos controle (figura 1A) indicou habituação ao aparato. Nos demais dias experimentais os animais exibiram atividade locomotora reduzida em comparação à hab. 1. De fato, a ANOVA de 2 vias (idade x tempo) seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls revelou efeito do tempo [$F(4,48)=6,39$; $p<0,05$]. Não foi observado efeito da idade ou interação entre os fatores idade x dias.

Níveis de Glutamato no Núcleo Accumbens

Figura 2 - A figura ilustra os níveis de glutamato no núcleo accumbens, coletado pela técnica de microdiálise. Cinco dias após o tratamento repetido de 15 dias com injeções intraperitoneais de 1,8 g/kg de etanol ou solução salina os animais foram colocados no sistema de microdiálise para coleta de amostras a cada 15 min. Quatro amostras foram coletadas antes da injeção intraperitoneal de 1,8 g/kg de etanol (Amostras Basais); oito amostras foram coletadas após a injeção desafio (Amostras Experimentais). A média das amostras basais foi considerada "100%" para comparação com as amostras experimentais.

ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x tempo) seguida do teste post-hoc Newman-Keuls (Amostras Basais analisadas separadamente. Amostras Experimentais comparadas à media dos valores basais e entre si).

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão. (n=9-11 animais por grupo).

○ $p < 0,05$ em comparação ao nível basal

● $p < 0,05$ em comparação ao grupo J-ET

Níveis de Glutamato no Núcleo Accumbens
(Animais tratados repetidamente com solução salina, injeção desafio de salina)

Figura 3 - A figura ilustra os níveis de glutamato no núcleo accumbens, coletado pela técnica de microdiálise. Cinco dias após o tratamento repetido de 15 dias com injeções intraperitoneais de solução salina os animais foram colocados no sistema de microdiálise para coleta de amostras a cada 15 min. Quatro amostras foram coletadas antes da injeção intraperitoneal de solução salina (Amostras Basais); oito amostras foram coletadas após a injeção (Amostras Experimentais). A média das amostras basais foi considerada “100%” para comparação com as amostras experimentais. ANOVA de 2 vias (idade x tempo) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls (Amostras Basais analisadas separadamente. Amostras Experimentais comparadas à media dos valores basais e entre si). O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão. n=9 animais por grupo.

A figura 2 ilustra os níveis de glutamato no núcleo accumbens de animais adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol ou solução salina por 15 dias consecutivos e que receberam injeção desafio de etanol 5 dias após o tratamento repetido. A ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x tempo) seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls, realizada para analisar as 4 amostras basais de glutamato, não revelou diferenças significativas entre os grupos. As médias $\pm$ erro padrão dos níveis de glutamato das 4 amostras basais foram: Adolescente-SAL: $0,153 \pm 0,08 \mu\text{M}$; Adolescente-ET: $0,185 \pm 0,06 \mu\text{M}$; Adulto-SAL: $0,192 \pm 0,05 \mu\text{M}$; Adulto-ET: $0,13 \pm 0,12 \mu\text{M}$.

As médias $\pm$ erro padrão das quatro amostras basais dos grupos controle (adolescentes e adultos tratados repetidamente com injeções de SAL e que receberam SAL no momento da coleta) foram: Adolescente: $0,192 \pm 0,04 \mu\text{M}$; Adulto: $0,196 \pm 0,02 \mu\text{M}$. Não foram reveladas diferenças significativas entre os grupos (figura 3).

A ANOVA de três vias (idade x tratamento prévio x tempo), realizada para as 12 amostras coletadas após desafio com etanol (figura 2), indicou efeito significativo da idade [$F(1,36)=7,93$; $p<0,05$], tempo [$F(11,396)=6,1$; $p<0,05$], interação dos fatores idade x tempo [$F(11,396)=2,19$; $p<0,05$] e interação dos fatores idade x tratamento prévio x tempo [$F(11,396)=3,92$; $p<0,05$]. A análise da interação idade x tratamento revelou que camundongos adolescentes tratados repetidamente com etanol (J-ET) apresentaram níveis mais elevados de glutamato do que camundongos adolescentes tratados repetidamente com solução salina (J-SAL). Animais adultos apresentaram relação inversa. A análise post-hoc da interação idade x tratamento prévio x tempo revelou que em animais do grupo J-ET um desafio subsequente de etanol produziu aumento nos níveis extracelulares de glutamato acima do último valor basal 15 min após a injeção desafio de etanol. Em comparação, animais adultos (A-ET) apresentaram redução nos níveis de glutamato extracelular em comparação ao valor basal 45 min após o desafio com etanol. O grupo J-ET apresentou um pico de aumento de $196,1 \pm 40\%$ nos níveis extracelulares de glutamato no núcleo accumbens após desafio com etanol em comparação ao valor basal; em comparação, o grupo A-ET apresentou um pico de redução de $52,2 \pm 6,2\%$ nos níveis extracelulares de glutamato no núcleo accumbens após o desafio com injeção de etanol. Uma ANOVA de 2 vias (idade x tempo) realizada entre os

grupos de camundongos adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol revelou efeito da idade [$F(1,22)=33,73$; $p<0,05$] e interação idade x tempo [$F(11,242)=5,49$; $p<0,05$]. Comparações post-hoc da interação dos fatores mostraram que camundongos adultos tratados previamente com etanol (A-ET) apresentaram menores níveis de glutamato extracelular do que camundongos adolescentes (J-ET) de 15-75 min após o desafio com etanol. Uma ANOVA de 2 vias realizada entre os grupos tratados com solução salina (J-SAL e A-SAL) e que receberam injeção desafio de etanol não revelou efeito da idade ou interação dos fatores idade x tempo. Portanto, não foram observadas diferenças entre os grupos J-SAL e A-SAL. A análise post-hoc da interação idade x tratamento prévio x tempo mostrou pico dos níveis de glutamato acima do valor basal 15 min após a injeção de etanol do grupo J-SAL ($153 \pm 13,5\%$) e 30 min após a injeção de etanol no grupo A-SAL ($169,3 \pm 18,7\%$). A ANOVA de 1 via para medidas repetidas realizada para cada grupo separadamente - J-ET [$F(11,121)=3,29$; $p<0,05$]; A-ET [$F(11,121)=4,69$; $p<0,05$]; J-SAL [$F(11,88)=6,95$; $p<0,05$] e A-SAL [$F(11,66)=2,76$; $p<0,05$] – confirmaram os respectivos picos nos níveis extracelulares de glutamato.

A ANOVA de 2 vias (idade x tempo) realizada entre os grupos controle (animais adolescentes e adultos tratados e desafiado com solução salina) não revelou efeito da idade ou do tempo, nem interação entre os fatores, demonstrando falta de efeito do manuseio no estresse provocado pela injeção nos níveis extracelulares de glutamato no núcleo accumbens (figura 3).

Tabela 1 - Concentração de etanol no sangue de animais adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol ou solução salina e que receberam injeção desafio de etanol 5 dias após o tratamento repetido

Grupos	15 min	60 min	180 min
Adolescente-SAL	206,68±14,89	130,21±19,63	7,69±2,19
Adolescente-ET	226,29±7,48	140,49±14,69	7,34±0,69
Adulto-SAL	208,08±22,13	163,00±19,05	20,44±6,17
Adulto-ET	241,70±5,66	149,95±14,32	10,12±0,37

Concentração de etanol no sangue expresso em mg/dl; média ± erro padrão

A análise estatística da concentração de etanol no sangue não revelou efeitos significativos da idade ou tratamento quando os grupos foram comparados. Foi observado efeito significativo do tempo [$F(2,56)=260,2$; $p<0,05$], consistente com a depuração plasmática de etanol no sangue.

Figura 4 - Diagrama de secções coronais do atlas de Franklin e Paxinos (2001) mostrando as localizações aproximadas das cânulas de microdiálise no Núcleo Accumbens. Os números à direita representam a distância a partir do bregma em mm (B).

4.1.3. Discussão parcial

Os resultados demonstram que camundongos Swiss adultos desenvolveram sensibilização comportamental após administração repetida de 1,8 g/kg de etanol. Camundongos adolescentes apresentaram uma tendência a uma maior resposta locomotora com a primeira injeção de etanol, em comparação a camundongos adultos, o que pode ter mascarado a resposta sensibilizada ao tratamento repetido com etanol. A literatura demonstra respostas comportamentais contraditórias à psicoestimulantes quando roedores adolescentes e adultos são comparados. Observa-se, por exemplo, resposta locomotora aumentada ou reduzida à cocaína ou anfetamina (CAMARINI et al., 2008; CATLOW e KIRSTEIN, 2005; LANIER e ISAACSON, 1977; LAVIOLA et al., 1995; SPEAR e BRICK, 1979; WITT, 1994). O intenso desenvolvimento neural no período da adolescência pode contribuir, em parte, para a variabilidade das respostas comportamentais a drogas de abuso. O presente resultado de atividade locomotora está de acordo com achados de nosso laboratório (FARIA et al., 2008) e outros que utilizam camundongos da linhagem DBA/2J (STEVENSON, BESHEER e HODGE, 2008).

Observamos que a sensibilização comportamental foi inversamente proporcional aos níveis extracelulares de glutamato no NAcc após o desafio com etanol. Ou seja, em camundongos adolescentes, que não apresentaram evidência de sensibilização comportamental ao etanol, um desafio subsequente de etanol aumentou os níveis extracelulares de glutamato no NAcc. Em comparação, camundongos adultos, que apresentaram sensibilização comportamental, exibiram redução nos níveis extracelulares de glutamato no NAcc após subsequente desafio com etanol.

No dia do desafio os animais estavam no aparato de microdiálise para coleta das amostras. Devido a esta questão metodológica, não foi possível quantificar a atividade locomotora quando os animais receberam injeção desafio de etanol. Porém sugerimos que há uma correlação entre o último dia de tratamento repetido e o dia do desafio, pois demonstramos previamente que um período de abstinência não modificou o padrão de resposta comportamental a uma injeção desafio de etanol em camundongos adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol

(FARIA et al., 2008). Tem-se demonstrado que a sensibilização comportamental ao etanol é duradoura (LESSOV e PHILLIPS, 1998).

Estudos recentes demonstraram que os níveis extracelulares de glutamato no NAcc dependem da dose de etanol utilizada e linhagem do animal (DAHCHOUR et al., 2000; KAPASOVA e SZUMLINSKI, 2008; SELIM e BRADBERRY, 1996; SZUMLINSKI et al., 2005; 2008). Baixas doses de etanol geralmente elevam os níveis extracelulares de glutamato no NAcc (LOMINAC et al., 2006; MOGHADDAM e BOLINAO, 1994), enquanto doses mais elevadas reduzem os níveis de glutamato extracelular nessa região (MOGHADDAM e BOLINAO, 1994). Recentemente, Kapasova e Szumlinski (2008) demonstraram diferenças entre linhagens nos níveis extracelulares de glutamato no NAcc após administração aguda e repetida de etanol. Neste estudo, a microdiálise foi conduzida na linhagem de camundongos C57BL/6J, que apresenta preferência por etanol (consome espontaneamente), e na linhagem DBA2/J, que não apresenta preferência por etanol. Além da diferença em relação ao consumo de etanol, essas linhagens também diferem na resposta comportamental locomotora a injeções ip de etanol. Enquanto animais da linhagem DBA2/J apresentam sensibilização ao efeito estimulante locomotor do etanol, em camundongos da linhagem C57BL/6J esse fenômeno não é observado. As autoras demonstraram que camundongos da linhagem C57BL/6J apresentaram uma resposta glutamatérgica sensibilizada ao etanol após tratamento repetido enquanto animais da linhagem DBA2/J não apresentaram esse efeito. Em comparação, nossos dados demonstraram que camundongos adultos, os quais sensibilizaram, não apresentaram níveis aumentados de glutamato extracelular no NAcc. Por outro lado, camundongos adolescentes, que não sensibilizaram, exibiram aumento dos níveis de glutamato no NAcc em resposta ao tratamento repetido.

Dahchour e De Witte (2000) também mostraram diferenças nos níveis extracelulares de glutamato, pela técnica de microdiálise, em ratos com alta x baixa sensibilidade ao etanol. Respectivamente, “high alcohol sensitive ou HAS” (apresentam tempo de sono mais longo devido ao etanol) e “low alcohol sensitive ou LAS” (apresentam tempo de sono mais curto devido ao etanol). Animais adolescentes apresentam menor tempo de sedação que animais adultos (HEFNER e HOLMES, 2007). Após injeção de etanol Dahchour e De Witte (2000) observaram níveis de glutamato reduzidos em animais HAS e níveis mais elevados de glutamato em animais LAS. Portanto, o glutamato está relacionado, em parte, com a

determinação genética da sensibilidade ao etanol. O etanol exerce seus efeitos, em parte, alterando a neurotransmissão glutamatérgica. Este mecanismo é corroborado por Dahchour e De Witte (2003), que demonstraram que o acamprosato, medicamento utilizado para evitar a recaída, produz redução na quantidade de glutamato no núcleo accumbens de ratos em abstinência. Esses achados demonstram que tanto a exposição quanto a abstinência ao etanol promovem aumento nos níveis de glutamato no NAcc. Acrescentam-se a essas evidências achados que demonstram alteração da recaptação do glutamato (MELENDEZ et al., 2005; OTHMAN et al., 2002; SMITH, 1997; SMITH e NAURATILOVA, 1999).

A projeção DA da VTA para o NAcc é essencial para o reforço e a recompensa e a aferência GLU que se projeta do CPF para o NAcc tem um papel importante nas respostas neuroquímicas emitidas por esta estrutura. Durante a adolescência o CPF está sofrendo neuroadaptações peculiares. O aumento nos níveis extracelulares de glutamato em resposta à injeção desafio de etanol pode resultar da excitabilidade aumentada de aferências glutamatérgicas que partem do CPF para o NAcc em resposta à exposição ao etanol no cérebro em desenvolvimento. Independentemente do mecanismo, o glutamato em níveis aumentados está disponível para ativar receptores e promover neuroplasticidade. Segundo Siggins et al. (2003), receptores NMDA de neurônios de ratos dependentes de etanol apresentam sensibilidade aumentada, o que sugere “up-regulation” de receptores, disponíveis para serem ativados e promover neuroplasticidade.

Em suma, demonstramos que há uma relação inversa entre o desenvolvimento de sensibilização comportamental induzida pelo etanol e a capacidade de uma injeção desafio de etanol subsequente a um tratamento repetido em aumentar os níveis extracelulares de glutamato no NAcc de animais adolescentes e adultos. Estudos com cocaína mostram que uma característica chave da circuitaria de busca pela droga é o aumento da liberação de glutamato na região “cerne” do núcleo accumbens pelas aferências provenientes do córtex pré-límbico (McFARLAND e KALIVAS, 2001; MCLAUGHLIN e SEE, 2003; DI CIANO e EVERITT, 2004; FUCHS et al., 2004). Em conclusão, o glutamato tem um papel importante na sensibilização comportamental ao etanol e a resposta glutamatérgica ao tratamento repetido com o etanol é dependente da idade.

4.2 Quantificação de dopamina, DOPAC e HVA no Núcleo Accumbens e Estriado de camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol

4.2.1 Delineamento Experimental

Camundongos Swiss adolescentes (J) e adultos (A) foram divididos em quatro grupos com 7-10 animais cada (J-SAL, J-ET, A-SAL e A-ET) no início do experimento e tratados conforme o item “4.1.1”. Os grupos tratados com etanol receberam injeção de 2,0 g/kg para o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Cinco dias após o término do tratamento, todos os animais receberam uma injeção desafio de 2,0 g/kg de etanol e, após 5 min, foram expostos ao campo aberto por 5 min. Trinta min após a injeção os animais foram sacrificados e o cérebro foi imediatamente congelado em isopentano. Posteriormente, as estruturas de interesse (Núcleo Accumbens e Estriado) foram retiradas pela técnica de “punch” para quantificação de dopamina pelo método de CLAE.

Para análise da atividade locomotora foi utilizada a ANOVA de 2 vias (idade x tempo) para o período da Habituação; ANOVA de 3 vias (idade x tratamento x tempo) para o período de tratamento repetido e ANOVA de 2 vias (Idade x tratamento prévio) para o Desafio.

A análise estatística utilizada para quantificar os níveis de dopamina e metabólitos foi a ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc Newman-Keuls.

4.2.2 Resultados

Figura 5 - Distância percorrida (cm) por animais adolescentes (J) e adultos (A) tratados com injeções intraperitoneais repetidas de 2,0 g/kg de etanol (ET) ou solução salina (SAL) por 15 dias consecutivos (Tratamento). Nos 2 dias que antecederam esse tratamento os animais receberam injeção de solução salina e foram habituados ao campo aberto (Habituação).

ANOVA de duas vias (idade x tempo) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls (Habituação); ANOVA de três vias (idade x tratamento x tempo) seguida de teste post-hoc Newman Keuls (Tratamento).

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n= 7-10 animais por grupo

○ p<0,05 em comparação a “Hab 1”

● p<0,05 em relação aos grupos tratados com solução salina, no mesmo dia experimental

□ p<0,05 em comparação ao primeiro dia de tratamento, trat. 1.

+ p<0,05 em comparação a trat. 8

Figura 6 - Distância percorrida (cm) de animais adolescentes (J) e adultos (A) que, 5 dias após o tratamento repetido, receberam injeção “Desafio” de 2,0 g/kg de etanol. ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls.

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n= 7-10 animais por grupo

- $p < 0,05$ em relação aos grupos tratados com solução salina, no mesmo dia experimental

A figura 5 ilustra a atividade locomotora de animais adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol (2,0 g/kg) ou solução salina por 15 dias consecutivos. A atividade locomotora foi quantificada nos 2 dias de habituação que antecederam o tratamento repetido, no primeiro dia de tratamento (tratamento agudo), na metade do tratamento (8º) e no último dia de tratamento (15º dia)

A ANOVA de 2 vias (idade x tempo) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls revelou diferenças significativas entre o primeiro e o segundo dia de Habituação. Foi observado efeito do tempo [$F(1,34)=79,0128$; $p<0,05$]. Todos os grupos apresentaram atividade locomotora reduzida no segundo dia de Habituação em comparação ao primeiro dia. Este resultado indica que os animais exploraram menos o aparelho no segundo dia, ou seja, o ambiente deixou de ser considerado algo novo a ser explorado.

A ANOVA de 3 vias (idade x tratamento x tempo) seguida do teste post-hoc Newman-Keuls revelou efeito do fator tratamento [$F(1,32)=50,0433$; $p<0,05$], do fator tempo [$F(2,64)=36,3446$; $p<0,05$] e interação entre os fatores tempo x tratamento [$F(2,64)=37,2920$; $p<0,05$]. Animais adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol (J-ET e A-ET) apresentaram evidência de sensibilização comportamental. Nos dias experimentais tratamento 8 e 15 estes animais apresentaram atividade locomotora significativamente aumentada em comparação ao primeiro dia de tratamento (Trat 1). Nos dias experimentais tratamento 8 e 15 o grupo A-ET apresentou atividade locomotora significativamente aumentada em comparação ao seu grupo controle (A-SAL). O grupo J-ET também apresentou atividade locomotora significativamente aumentada em comparação ao controle (J-SAL) em trat. 15 e muito próxima da significância em trat. 8. ($p=0,070$).

No dia experimental “Desafio” observou-se efeito do tratamento prévio pela ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls [$F(1,32)=19,9932$]. Animais adolescentes e adultos tratados previamente com etanol (J-ET e A-ET) apresentaram atividade locomotora significativamente aumentada em comparação a animais tratados anteriormente com solução salina (J-SAL e A-SAL).

Figura 7 - A figura ilustra a quantidade de dopamina em tecido de animais adolescentes e adultos. Cinco dias após o tratamento repetido de 15 dias com injeções intraperitoneais de 2,0 g/kg de etanol ou solução salina todos os animais receberam injeção desafio de etanol e foram sacrificados para obtenção do tecido.

ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls.

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n= 7-10 animais por grupo

○ $p < 0,05$ em comparação aos grupos de animais adolescentes

● $p < 0,05$ em relação ao grupo A-SAL

Figura 8 - A figura ilustra a quantidade de DOPAC em tecido de animais adolescentes e adultos. Cinco dias após o tratamento repetido de 15 dias com injeções intraperitoneais de 2,0 g/kg de etanol ou solução salina todos os animais receberam injeção desafio de etanol e foram sacrificados para obtenção do tecido.

ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls.

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n= 7-10 animais por grupo

○ $p < 0,05$ em comparação aos grupos de animais adolescentes

● $p < 0,05$ em relação ao grupo A-SAL

Figura 9 - A figura ilustra a quantidade de HVA em tecido de animais adolescentes e adultos. Cinco dias após o tratamento repetido de 15 dias com injeções intraperitoneais de 2,0 g/kg de etanol ou solução salina todos os animais receberam injeção desafio de etanol e foram sacrificados para obtenção do tecido.

ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls.

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n= 7-10 animais por grupo

○ $p < 0,05$ em comparação aos grupos de animais adolescentes

● $p < 0,05$ em relação ao grupo A-SAL

Figura 10 - A figura ilustra a quantidade de DOPAC / DA em tecido de animais adolescentes e adultos. Cinco dias após o tratamento repetido de 15 dias com injeções intraperitoneais de 2,0 g/kg de etanol ou solução salina todos os animais receberam injeção desafio de etanol e foram sacrificados para obtenção do tecido.

ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls.

O gráfico representa as médias ± erro padrão.

n= 7-10 animais por grupo

○ p<0,05 em comparação aos grupos de animais adolescentes

Figura 11 - A figura ilustra a quantidade de HVA / DA em tecido de animais adolescentes e adultos. Cinco dias após o tratamento repetido de 15 dias com injeções intraperitoneais de 2,0 g/kg de etanol ou solução salina todos os animais receberam injeção desafio de etanol e foram sacrificados para obtenção do tecido.

ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls.

O gráfico representa as médias ± erro padrão.

n= 7-10 animais por grupo

▣ p<0,05 em relação ao grupo J-ET

Figura 12 - A figura ilustra a quantidade de DOPAC + HVA / DA em tecido de animais adolescentes e adultos. Cinco dias após o tratamento repetido de 15 dias com injeções intraperitoneais de 2,0 g/kg de etanol ou solução salina todos os animais receberam injeção desafio de etanol e foram sacrificados para obtenção do tecido.

ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls.

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n= 7-10 animais por grupo

○ $p < 0,05$ em comparação aos grupos de animais adolescentes

● $p < 0,05$ em relação ao grupo J-SAL

Dopamina

No Núcleo Accumbens a ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc Newman-Keuls revelou efeito da idade [$F(1,31)=93,9787$; $p<0,05$], do tratamento [$F(1,31)=17,9583$; $p<0,05$] e interação entre os fatores idade x tratamento [$F(1,31)=9,6716$; $p<0,05$]. Animais adultos apresentaram níveis de dopamina mais elevados que animais adolescentes. Animais adultos tratados previamente com etanol (A-ET) apresentaram níveis de dopamina diminuídos em comparação a animais adultos previamente tratados com salina (A-SAL); no dia do desafio todos os animais receberam uma injeção desafio de etanol.

No estriado, foi observado efeito da idade somente [$F(1,31)=89,5067$; $p<0,05$]. Animais adultos apresentaram níveis de DA mais elevados que animais adolescentes.

DOPAC

No Núcleo Accumbens a ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc Newman-Keuls revelou efeito da idade [$F(1,31)=86,2691$; $p<0,05$], do tratamento [$F(1,31)=17,8333$; $p<0,05$] e interação dos fatores idade x tratamento [$F(1,31)=12,0447$; $p<0,05$]. Animais adultos apresentaram níveis mais elevados de DOPAC em relação a animais adolescentes. Animais adultos, previamente tratados com etanol e que receberam injeção desafio de etanol (A-ET), apresentaram níveis reduzidos de DOPAC em comparação ao respectivo grupo controle (A-SAL), que recebeu tratamento agudo de etanol no dia do desafio.

No estriado, a ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc Newman-Keuls revelou efeito da idade [$F(1,31)=152,1613$; $p<0,05$]. Animais adultos apresentaram níveis mais elevados de DOPAC que os animais adolescentes.

HVA

No Núcleo Accumbens, a ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls revelou efeito da idade [$F(1,31)=83,2815$; $p<0,05$] e do tratamento [$F(1,31)=8,0928$; $p<0,05$]. Animais adultos apresentaram níveis de HVA mais elevados que animais adolescentes. Animais do grupo A-ET apresentaram níveis de HVA reduzidos com comparação ao grupo A-SAL.

A ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls revelou efeito da idade [$F(1,31)=137,7919$; $p<0,05$] nos níveis de HVA no estriado. Animais adultos apresentaram níveis mais elevados de HVA no Estriado que animais adolescentes.

Em suma, os níveis de dopamina, DOPAC e HVA apresentaram-se mais elevados em animais adultos em comparação a animais adolescentes em ambas as estruturas (Núcleo Accumbens e Estriado). Porém, no Núcleo Accumbens, observou-se que animais adultos tratados repetidamente com etanol e que receberam injeção desafio de etanol (A-ET) apresentaram níveis reduzidos de dopamina e seus metabólitos em comparação ao grupo A-SAL que, no dia do desafio, recebeu etanol pela primeira vez (tratamento agudo).

DOPAC / DA

No Núcleo Accumbens a ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls revelou efeito da idade [$F(1,28)=28,7132$; $p<0,05$]. Animais adultos apresentaram menor quantidade de DOPAC / DA no NAcc em comparação a animais adolescentes.

No Estriado não foram observadas diferenças significativas entre os grupos da razão DOPAC / DA.

HVA / DA

No Núcleo Accumbens não foram observadas diferenças significativas entre os grupos da razão HVA / DA.

No estriado a ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls mostrou efeito da idade [$F(1,31)=14,5063$; $p<0,05$]. Animais adultos tratados previamente com etanol (A-ET) apresentaram maior razão HVA / DA em comparação ao grupo J-ET.

DOPAC + HVA / DOPAMINA – Núcleo Accumbens

A ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls revelou efeito da idade [$F(1,27)=30,5543$; $p<0,05$] e interação entre os fatores idade x tratamento prévio [$F(1,27)=4,5864$; $p<0,05$]. Os grupos constituídos por animais adultos (A-SAL e A-ET) apresentaram níveis menores de

DOPAC + HVA / DA em relação aos grupos de animais adolescentes (J-SAL e J-ET). Animais jovens, tratados repetidamente com etanol (J-ET) apresentaram maiores níveis de DOPAC + HVA / DA que animais da mesma idade que, no dia do desafio, recebiam tratamento agudo com uma injeção de etanol (J-SAL).

DOPAC + HVA / DOPAMINA – Estriado

A ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls não revelou diferenças significativas entre os grupos.

4.2.3 Discussão Parcial

O aumento da atividade locomotora em campo aberto, induzida por drogas de abuso, está sujeita a diversas variáveis como espécie e linhagem animal, pistas ambientais e dose utilizada (LESSOV et al., 2001; STEVENSON, BESHEER e HODGE, 2008; FARIA et al., 2008). Em experimentos realizados em nosso laboratório, temos observado que a resposta estimulante aguda do etanol varia muito em animais adolescentes. Com o intuito de aprimorar nosso protocolo de observação comportamental decidimos utilizar a dose de 2,0 g/kg de etanol. A intenção foi diminuir o efeito teto estimulante encontrado com uma dose mais baixa (1,8 g/kg) e tentar obter dados mais homogêneos. Entranto, essa variabilidade parece ser decorrente do turbilhão de mudanças neuroquímicas e neuroanatômicas que ocorrem neste período e, de acordo com nossas observações, os animais adolescentes parecem ser mais sensíveis a pequenas alterações, tanto em relação a dose, ambiente ou protocolo experimental, o que acaba produzindo uma variação maior na resposta comportamental do aquela observada em adultos. Dessa forma, optamos por aumentar a dose para 2,0 g/kg, a qual tem sido amplamente utilizada por diversos pesquisadores para o desenvolvimento de sensibilização comportamental ao etanol (pegar ref intro). Um fator determinante na resposta comportamental aos efeitos estimulantes do etanol em adolescentes, parece ser o número de exposições ao campo aberto. O pareamento diário das injeções de etanol ao campo aberto induz um efeito de tolerância, ao passo que a diminuição do número de pareamentos pode induzir ausência ou menor sensibilização comportamental do que a observada em adultos. De acordo com o protocolo utilizado neste projeto, camundongos adolescentes e adultos apresentaram desenvolvimento de sensibilização comportamental. Nos dias experimentais trat. 8 e trat. 15 camundongos adolescentes e adultos tratados com etanol apresentaram atividade locomotora significativamente aumentada em comparação ao primeiro dia de tratamento (trat. 1). Entretanto, os adolescentes apresentaram uma sensibilização mais atenuada. Esse padrão também tem sido observado pelo grupo do Dr. Etienne Quertermont, da Bélgica (comunicação pessoal).

Vários estudos em roedores indicam que o etanol aumenta o disparo de neurônios dopaminérgicos (BRODIE, 2002; MEREU, FADDA e GESSA, 1984),

promovendo aumento da dopamina no NAcc (IMPERATO e DI CHIARA, 1986; TANG et al., 2003). A administração aguda e crônica de etanol está associada com aumento na síntese e liberação de dopamina dos terminais mesolímbicos e nigroestriatais (DI CHIARA e IMPERATO, 1988; YOSHIMOTO et al., 1991; WEISS et al., 1993; NESTBY et al., 1997). Embora outros autores tenham correlacionado o aumento da dopamina nessas regiões com o aumento da atividade locomotora (MEYER, MESHUL e PHILLIPS, 2009; MORICE et al., 2010), a administração repetida de etanol induziu um efeito de tolerância aos efeitos indutores da liberação de dopamina pelo etanol. Uma crítica a este trabalho refere-se ao fato de não termos medido os níveis de dopamina em animais tratados com salina, a fim de certificarmos se o etanol induziu um aumento na liberação de dopamina após administração aguda.

Tanto no estriado quanto no núcleo accumbens, os níveis de dopamina e dos metabólitos DOPAC e HVA apresentaram-se mais elevados em animais adultos do que em animais adolescentes após desafio com etanol, independentemente do tratamento prévio. Nakano e Mizuno (1996) e Philpot e Kirstein (2004) sugeriram existir diferenças entre as idades na degradação enzimática da dopamina no estriado e NAcc, o que poderia explicar, em parte, esse achado.

Entre os animais adultos, foi observada também uma diferença determinada pelo tratamento repetido nos níveis de dopamina, DOPAC e HVA somente no NAcc. Os animais tratados repetidamente com etanol (A-ET) apresentaram níveis menores de dopamina, DOPAC e HVA após 5 dias de abstinência em comparação ao grupo A-SAL, após receberem uma injeção de etanol (dia do desafio). SOUZA-FORMIGONI et al. (1999) sugeriram que a sensibilização comportamental ao etanol está relacionada a aumento dos auto-receptores D2, pois animais que apresentaram sensibilização comportamental ao etanol apresentaram aumento de cerca de 40% no “binding” desses receptores no estriado. Assim, podemos sugerir que o aumento da dopamina promovido pela administração repetida de etanol gera neuroadaptação na função do auto-receptor D2. O aumento do “binding” desse receptor promove aumento na recaptação de dopamina. Essa neuroadaptação parece ser duradoura, uma vez que, no dia do desafio, observamos redução dos níveis de dopamina, DOPAC e HVA em animais adultos tratados repetidamente com etanol (A-ET). Budygin et al. (2007) observaram que a exposição crônica ao etanol (num protocolo de inalação de vapor de etanol) em ratos aumentou a recaptação de dopamina tanto

no NAcc quanto no estriado. Dessa forma, ocorreu “downregulation” dos níveis elevados de dopamina promovidos pelo etanol. Porém, estes autores não observaram diferença na sensibilidade do auto-receptor dopaminérgico D2 entre animais expostos ao vapor de etanol e animais do grupo controle. Em macacos, esse mesmo grupo de pesquisa observou aumento da recaptação de dopamina no estriado após exposição crônica ao etanol (BUDYGIN et al., 2003), o que seria uma adaptação do sistema para compensar o aumento de dopamina promovido pelo etanol, aumentando a sensibilidade dos auto-receptores D2. (GRACE, 2000). Alterações no auto-receptor D2 podem ser observadas ou não, dependendo da via de administração e tempo de exposição ao etanol, principalmente. No caso da auto-administração, por exemplo, pelo menos 6 semanas de consumo são necessárias para promover aumento na expressão de receptores D2 no rato (TAJUDDIN e DRUSE, 1996), pois 4 ou 5 semanas não promovem alterações significativas (DJOUMA e LAWRENCE, 2002; PELLEGRINO e DRUSE, 1992). Evidências *in vitro* (DICKINSON et al., 1999; MAYFIELD e ZAHNISER, 2001) e *in vivo* (WU et al., 2002) mostram que o auto-receptor D2 participa da regulação da atividade do transportador de dopamina (DAT).

Animais adolescentes tratados repetidamente com etanol (J-ET) ou solução controle (J-SAL), e que receberam injeção desafio de etanol após 5 dias de abstinência, não apresentaram diferenças significativas em relação às dosagens em qualquer das estruturas. Em ratos adolescentes, Philpot, Wecker, Kirstein (2009) notaram aumento de dopamina após uma única injeção de etanol. Em nosso estudo, será necessário verificar se o etanol agudo promove aumento de dopamina, comparados a um grupo controle, em animais adolescentes. A sensibilização comportamental dos animais adolescentes manifestou-se de maneira mais branda que em animais adultos (J-ET x A-ET); portanto, a quantidade de DA terminal estaria reduzida em animais adolescentes, proporcionalmente à atividade locomotora observada, se considerarmos uma correlação da quantidade de dopamina com a atividade locomotora (MEYER et al., 2009; MORICE et al., 2010).

Há relatos de diferenças dependentes da idade na função do auto-receptor D2. O auto-receptor D2 é menos sensível à estimulação no indivíduo adolescente em comparação ao adulto (ANDERSEN, 2002) e o transportador, que regula a recaptação de dopamina, também sofre alterações na expressão ao longo da adolescência (TARAZI, TOMASINI e BALDESSARINI et al., 1998).

Há controvérsias sobre a capacidade do etanol em alterar a função do transportador de dopamina. Estudos clínicos mostraram que alguns tipos de alcoólatras tem função alterada de receptores D2 e DAT (LAINE et al., 2001; NOBLE, 1996), porém, ainda há controvérsias sobre esse achado (VOLKOW et al., 1996). Segundo Jones Garris e Wightman (1995) e Jones et al.(1996) o etanol crônico não altera a afinidade do transportador pela DA.

Encontramos algumas diferenças relacionadas às razões calculadas para a dopamina e seus metabólitos (DOPAC e HVA). Alguns achados sugerem maior renovação (“turn-over”) de DA por animais adolescentes no NAcc, como a razão DOPAC/DA, que apresentou-se mais elevada nos grupos de animais adolescentes em comparação aos grupos de adultos no NAcc; não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao estriado. A relação DOPAC+HVA/DA também apresentou-se mais elevada em animais adolescentes no NAcc. Nessa quantificação também foi detectado efeito do tratamento entre os animais adolescentes, pois o grupo J-ET apresentou valor mais elevado em comparação ao grupo J-SAL, que recebeu etanol pela primeira vez no dia do desafio; no estriado não foram detectadas diferenças entre os grupos. Já a relação HVA/DA apresentou diferenças entre os grupos tratados com etanol no estriado, onde apresentou-se mais elevada em animais adultos em comparação a animais adolescentes. Para esta relação não foram detectadas diferenças entre os grupos no NAcc.

Em suma, esse experimento demonstrou que animais adolescentes e adultos apresentam sensibilização comportamental ao etanol, sendo o fenômeno mais brando em animais adolescentes. A sensibilização locomotora não apresentou correlação direta com as dosagens de dopamina e metabólitos no NAcc e estriado. Entretanto, tanto no NAcc quanto no Estriado as quantidades de DA, DOPAC e HVA mostraram-se mais elevadas em animais adultos, sugerindo menor sensibilidade dos adolescentes aos efeitos indutores da liberação de dopamina pelo etanol. No NAcc, o grupo A-ET, tratado repetidamente com etanol, apresentou quantidades reduzidas de DA, DOPAC e HVA em comparação ao grupo A-SAL, que recebeu injeção aguda de etanol no desafio. Os cálculos das razões entre a dopamina e seus metabólitos revelou evidências de maior renovação de dopamina em animais jovens em comparação a animais adultos, lembrando que os animais foram sacrificados 30 min após a injeção desafio de etanol.

4.3 Quantificação dos níveis de AMPc e atividade da PKA no estriado de camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol

4.3.1 Delineamento Experimental

Camundongos Swiss adolescentes (J) e adultos (A) foram divididos em quatro grupos com 24-26 animais cada (J-SAL, J-ET, A-SAL e A-ET) no início do experimento e tratados conforme o item “4.1.1” para o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Os grupos tratados com etanol receberam injeção de 2,0 g/kg para o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Cinco dias após o tratamento repetido, metade dos animais de cada grupo recebeu uma injeção desafio de 2,0 g/kg de etanol e os demais receberam injeção de solução salina. Cinco minutos após a injeção, os animais foram expostos ao campo aberto para quantificação da atividade locomotora por 5 minutos. Todos os animais foram sacrificados 30 minutos após a injeção.

O encéfalo dos animais foi retirado e o estriado foi dissecado. A estrutura foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e posteriormente armazenada em freezer -80° C até o momento do ensaio. Parte dos estriados obtidos foram utilizados para a dosagem dos níveis de AMPc e parte para quantificação da atividade da PKA (Ver itens 3.6 e 3.7, que descrevem a metodologia dos ensaios).

A análise estatística utilizada para o dia experimental “desafio” foi a ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x injeção desafio), seguida do teste post-hoc Newman-Keuls.

Para comparação dos níveis de AMPc e atividade da PKA entre os grupos estudados também foi utilizada uma ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x injeção desafio) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls.

4.3.2 Resultados

Figura 13 - Distância percorrida (cm) de animais adolescentes (J) e adultos (A) tratados com injeções intraperitoneais repetidas de 2,0 g/kg de etanol (ET) ou solução salina (SAL) por 15 dias consecutivos (Tratamento). Nos 2 dias que antecederam esse tratamento os animais receberam injeção de solução salina e foram habituados ao campo aberto (Habituação).

ANOVA de duas vias (idade x tempo) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls (Habituação); ANOVA de três vias (idade x tratamento x tempo) seguida de teste post-hoc Newman Keuls (Tratamento).

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n=24-26 animais por grupo.

○ $p < 0,05$ em comparação a hab. 1

● $p < 0,05$ em relação aos grupos tratados com solução salina, no mesmo dia experimental

□ $p < 0,05$ em comparação ao primeiro dia de tratamento, trat. 1.

Figura 14 - Atividade locomotora de animais jovens e adultos tratados com etanol ou solução salina 0,9% por 15 dias consecutivos. A figura ilustra que metade dos animais de cada grupo recebeu injeção desafio de 2,0g/kg de etanol ou solução salina no desafio, ou seja, 5 dias após o final do tratamento repetido. ANOVA de três vias (idade x tratamento prévio x desafio) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls. O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão. n=11-13 animais por grupo

○ $p < 0,05$ em comparação aos grupos desafiados com solução salina 0,9%

● $p < 0,05$ em relação ao grupo A-SAL

A figura 13 ilustra a atividade locomotora de animais adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol (2,0 g/kg) ou solução salina por 15 dias consecutivos. A atividade locomotora foi quantificada nos 2 dias de habituação que antecederam o tratamento repetido, no primeiro dia de tratamento (tratamento agudo), na metade do tratamento (8º) e no último dia de tratamento (15º dia).

A ANOVA de 2 vias (idade x tempo) seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls revelou efeito do tempo [$F(1,100)=106,674$; $p<0,05$] no período experimental “Habituação”. No segundo dia de habituação os animais apresentaram atividade locomotora significativamente reduzida em comparação ao primeiro dia, o que mostra habituação ao aparato.

A análise do período de tratamento repetido (Trat 1 – Trat 15) revelou efeito do tratamento [$F(1,98)=95,3670$; $p<0,05$], tempo [$F(2,196)=46,5243$; $p<0,05$], interação dos fatores idade x tratamento [$F(1,98)=4,3257$; $p<0,05$] e interação dos fatores tempo x tratamento [$F(2,196)=59,9754$; $p<0,05$]. Animais adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol (J-ET e A-ET) apresentaram atividade locomotora significativamente aumentada em trat. 8 e trat. 15 em comparação ao primeiro dia de tratamento (Trat 1). Em trat. 8 e trat. 15 esses grupos também apresentaram atividade locomotora significativamente aumentada em comparação a seus respectivos grupos controle (J-SAL e A-SAL) tratados repetidamente com injeções de solução salina.

No dia experimental “Desafio” (figura 14), em que metade dos animais recebeu injeção de etanol e a outra metade recebeu injeção de solução salina, foi detectado efeito do tratamento prévio [$F(1,90)=6,8426$; $p<0,05$], desafio [$F(1,90)=27,1106$; $p<0,05$] e interação dos fatores tratamento x injeção desafio [$F(1,90)=6,8870$; $p<0,05$] (ANOVA de 3 vias: idade x tratamento prévio x desafio). Animais dos grupos tratados previamente com etanol (J-ET e A-ET) e que receberam injeção desafio de etanol apresentaram atividade locomotora significativamente aumentada em comparação aos animais que receberam o mesmo tratamento prévio, mas foram desafiados com solução salina. O grupo de animais A-ET, que recebeu injeção desafio de etanol apresentou atividade locomotora significativamente aumentada também em comparação ao grupo de animais adultos que também recebeu injeção desafio de etanol, mas foi tratado previamente com solução salina (A-SAL), o que demonstra expressão da sensibilização comportamental. Por outro lado, a atividade locomotora dos animais adolescentes

pré-tratados com etanol não diferiu daquela dos animais pré-tratados com salina, no dia do desafio.

Figura 15 - Dosagem de AMPc no estriado de animais adolescentes (J) e adultos (A) que, 5 dias após o tratamento repetido, receberam injeção “Desafio” de 2,0 g/kg de etanol ou solução salina.

ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x desafio) seguida de teste post-hoc de Duncan.

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n=6-7 animais por grupo.

● $p < 0,05$ em relação aos grupos de mesma idade e desafio, porém tratados repetidamente com solução salina.

A figura 15 ilustra a quantidade de AMPc de animais adolescentes e adultos que, após tratamento repetido com etanol ou solução salina, receberam injeção desafio de etanol ou solução salina.

A ANOVA de 3 vias (idade x tratamento x desafio) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls revelou efeito do tratamento [$F(1,40)=5,9369$; $p<0,05$] e interação das variáveis idade x tratamento x desafio [$F(1,40)=5,0171$].

Entre os grupos desafiados com etanol, animais jovens tratados repetidamente com etanol apresentaram atividade locomotora significativamente aumentada em comparação a animais jovens tratados repetidamente com solução salina (J-ET x J-SAL).

Entre os grupos desafiados com solução salina, animais adultos tratados repetidamente com etanol, apresentaram atividade locomotora significativamente aumentada em relação a animais adultos, tratados repetidamente com solução salina (A-ET x A-SAL).

Assim, os grupos de animais que apresentaram aumento nos níveis de AMPc foram adolescentes tratados repetidamente com etanol e que, após abstinência receberam injeção desafio de etanol (J-ET) e animais adultos, também tratados repetidamente com etanol (A-ET), mas que estavam abstinentes de etanol no dia do desafio, pois receberam injeção desafio de salina.

Figura 16 - Atividade da PKA no estriado de animais adolescentes (J) e adultos (A) que, 5 dias após o tratamento repetido, receberam injeção “Desafio” de 2,0 g/kg de etanol ou solução salina. ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x desafio) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls. O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão. n=6-7 animais por grupo. ○ $p < 0,05$ em relação aos grupos desafiados com solução salina.

A figura 16 ilustra a atividade da PKA de animais adolescentes e adultos que, após tratamento repetido com etanol ou solução salina, receberam injeção desafio de etanol ou solução salina.

A ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x desafio) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls revelou efeito da injeção desafio [$F(1,40)=6,5750$; $p<0,05$]. De fato, os grupos que receberam injeção desafio de etanol apresentaram aumento da atividade da PKA.

4.3.3 Discussão Parcial

Assim como no experimento anterior, após o tratamento repetido com etanol, animais adolescentes (J-ET) e adultos (A-ET) apresentaram atividade locomotora significativamente aumentada em comparação ao primeiro dia de tratamento (trat. 15 x trat. 1), caracterizando a sensibilização comportamental. Entretanto, a sensibilização comportamental observada nos animais adolescentes foi de maior magnitude do que a dos adultos.

No dia da injeção desafio, em que metade dos animais de cada grupo (J-SAL, J-ET, A-SAL e A-ET) recebeu injeção desafio de solução controle e a outra metade recebeu injeção de etanol, somente os adultos exibiram expressão da sensibilização.

Em relação aos níveis de AMPc, o tratamento repetido com etanol aumentou os níveis de AMPc. Entre os grupos desafiados com solução salina, observou-se que o grupo A-ET apresentou maiores níveis de AMPc no estriado que o grupo A-SAL, sugerindo que a retirada do etanol após um tratamento prolongado aumenta os níveis de AMPc no animal adulto. Em adolescentes, foi observado aumento de AMPc com o tratamento repetido de etanol e injeção desafio de etanol apesar de não ter sido detectada diferença nos níveis de dopamina. Entretanto, observa-se uma tendência a aumento da atividade de PKA. Assim, sugerimos que o indivíduo adolescente está mais vulnerável às neuroadaptações promovidas pelo aumento de AMPc na recaída, enquanto o indivíduo adulto está mais vulnerável durante a abstinência.

Um importante mecanismo pelo qual o etanol regula a sinalização promovida pelo AMPc envolve a estimulação de isoformas específicas da AC (Adenilil Ciclase) pelo etanol. Entre as 9 isoformas de AC conhecidas, a AC7 é 2-3 vezes mais sensível ao etanol do que qualquer outra isoforma. Sua distribuição no cérebro é restrita, sendo o NAcc uma das regiões onde é mais encontrada (MONS et al., 1998). As isoformas 2, 5 e 6 são moderadamente sensíveis ao etanol; são insensíveis ao etanol as isoformas 1 e 3 (YOSHIMURA e TABAKOFF, 1995).

O AMPc tem um papel importante na ativação da PKA, o que pode resultar em transcrição de genes relacionados à neuroplasticidade. Um interessante estudo de ontogenia (SUGAWA e MAY, 1993) demonstrou que ratos jovens (3 meses)

apresentam maiores níveis de AMPc do que ratos idosos (40 meses) no estriado. No núcleo accumbens não foram observadas diferenças.

A redução do CREB, devido à redução do funcionamento da via AMPc / PKA está relacionada com aumento da auto-administração e vice-versa (PANDEY et al., 2004; KIM et al., 2011). A literatura carece de estudos que demonstrem a produção de AMPc e PKA após tratamento repetido com injeções de etanol; estudos que comparem idades diferentes são ainda mais escassos. O trabalho de Yang, Horn e Wand (1998) é um ótimo exemplo de que a ativação a via AMPc / PKA / CREB na exposição aguda funciona de maneira diferente da exposição crônica. A forma fosforilada do CREB aumentou cerca de 180% no estriado após a exposição aguda de ratos ao etanol (álcool na dieta). Após exposição crônica ao etanol (álcool na dieta), a indução de fosforilação do CREB estava significativamente atenuada (50%) após injeção desafio de etanol (injeção ip de 2,5 g/kg). O complexo “CRE” (região em que o CREB deve ligar-se para promover transcrição gênica), também estava reduzido após a injeção desafio, em animais expostos cronicamente ao etanol. A expressão de c-fos, modulada pelo CREB, também estava reduzida nessas condições.

Nossos resultados indicam que a idade pode ser um fator que determina em que momento do estado de dependência o indivíduo é mais vulnerável às alterações neuroplásticas relacionadas ao AMPc resultantes do abuso de etanol.

Em relação à atividade da PKA no estriado, independentemente do tratamento prévio, animais que receberam injeção desafio de etanol apresentaram maior atividade da PKA. Esse achado está de acordo com a observação de Dohrman, Diamond e Gordon (1996), que demonstrou *in vivo* que as subunidades catalíticas da PKA eram deslocadas das subunidades regulatórias e migravam para o núcleo enquanto o etanol estivesse presente. A PKA sintetizada pela célula permanece no complexo de Golgi até que um estímulo (AMPc) ative essa enzima. De acordo com essa evidência, podemos sugerir que a PKA permanece ativada enquanto houver efeito do etanol no estriado. Em nossas condições experimentais, a PKA provavelmente estava ativada após a injeção de etanol em cada dia de tratamento repetido e, como demonstrado, no dia do desafio com etanol. A PKA regula muitos processos vitais pela fosforilação reversível de proteínas. Esses processos incluem metabolismo celular, expressão gênica, desenvolvimento da célula e tecidos, morfogênese, excitabilidade neural e condutividade de canais

iônicos. A sinalização aberrante da via AMPc / PKA pode contribuir para numerosos processos patológicos, inclusive a dependência (STRATAKIS e CHO-CHUNG, 2002).

4.4 Efeitos reforçadores do etanol, no paradigma de preferência condicionada por lugar, em camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol

4.4.1 Delineamento Experimental

Cinco dias após o final do tratamento repetido com etanol, conforme descrito em “4.1.1” camundongos Swiss adolescentes e adultos foram sujeitos ao protocolo de Preferência Condicionada por Lugar conforme descrito no item 3.8. Tanto para o desenvolvimento da sensibilização comportamental quanto para o condicionamento (Preferência Condicionada de Lugar) foi utilizada a dose de 2,0 g/kg de etanol. Os grupos foram constituídos de 13-14 animais.

Tanto para análise dos resultados de Preferência Condicionada de Lugar no dia experimental “Habituação” quanto no dia experimental “Teste” foi realizado o “teste-t” para medidas independentes. Para a “Habituação” o teste-t foi utilizado para comparar o tempo de permanência no compartimento preto com chão de barras x branco com chão de grades para cada grupo experimental. No dia do teste, comparou-se o tempo de permanência no compartimento associado aos efeitos do etanol x compartimento associado à solução salina para cada grupo experimental.

4.4.2 Resultados

Figura 17 - Distância percorrida (cm) de animais adolescentes (J) e adultos (A) tratados com injeções intraperitoneais repetidas de 2,0 g/kg de etanol (ET) ou solução salina (SAL) por 15 dias consecutivos (Tratamento). Nos 2 dias que antecederam esse tratamento os animais receberam injeção de solução salina e foram habituados ao campo aberto (Habituação).

ANOVA de duas vias (idade x tempo) seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls (Habituação); ANOVA de três vias (idade x tratamento x tempo) seguida de teste post-hoc de Newman Keuls (Tratamento).

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n=14-15 animais

○ p<0,05 em comparação a hab 1.

● p<0,05 em relação ao primeiro dia de tratamento, trat. 1.

□ p<0,05 em comparação ao mesmo grupo em trat. 8..

■ p<0,05 em relação ao grupo J-ET, no mesmo dia experimental.

A Figura 17 ilustra a atividade locomotora de animais adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol (2,0 g/kg) ou solução salina por 15 dias consecutivos. A atividade locomotora foi quantificada nos 2 dias de habituação que antecederam o tratamento repetido, no primeiro dia de tratamento (tratamento agudo), na metade do tratamento (8º) e no último dia de tratamento (15º dia).

A ANOVA de 2 vias (idade x tempo) para medidas repetidas seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls, realizada para analisar o período da habituação, revelou efeito do tempo [$F(1,460)=41,178$; $p<0,05$]. De fato, observou-se que os animais apresentaram atividade locomotora significativamente diminuída no segundo dia de habituação em comparação ao primeiro.

A ANOVA de três vias (idade x tratamento x tempo) para medidas repetidas utilizada para analisar o período de tratamento, revelou efeito dos fatores tratamento [$F(1,188)=29,1290$; $p<0,05$] e tempo [$F(2,967)=39,1357$; $p<0,05$]; interação dos fatores tratamento x tempo [$F(2,113)=46,0060$; $p<0,05$] e, finalmente, interação dos fatores idade x tratamento x tempo [$F(2,128)=5,1802$; $p<0,05$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que nos dias experimentais trat. 8 e trat. 15 a atividade locomotora de animais jovens e adultos tratados com etanol estava significativamente aumentada em comparação ao primeiro dia de tratamento (trat. 1). Porém, em trat. 15 observou-se que animais adultos apresentavam atividade locomotora significativamente aumentada em comparação aos adolescentes. No dia experimental trat. 15 observou-se também que o grupo A-ET apresentou atividade locomotora aumentada em comparação ao dia experimental trat. 8”, o que não foi observado no grupo de animais adolescentes (J-ET).

Figura 18 - Tempo de permanência (em porcentagem) de camundongos Swiss adolescentes e adultos expostos ao paradigma de Preferência Condicionada por Lugar no dia experimental “Habituação”.
 Teste t para comparação do tempo de permanência no compartimento preto / chão de grade x branco / chão de tela.
 O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.
 n=11-14 animais.

Figura 19 - Tempo de permanência (em porcentagem) de camundongos Swiss adolescentes e adultos expostos ao paradigma de Preferência Condicionada por Lugar no dia experimental “Teste”.
 Teste t para comparação do tempo de permanência no compartimento pareado com etanol x compartimento pareado com solução salina.
 O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.
 n=11-14 animais por grupo.

● $p < 0,05$ em comparação ao compartimento pareado com solução salina.

As Figuras 18 e 19 ilustram, respectivamente os dias de “Habituação” e “Teste” do experimento de Preferência Condicionada por Lugar.

Na “Habituação” não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. No “Teste”, o teste-t não pareado revelou que animais dos grupos J-ET e A-SAL apresentaram PCL ($p < 0,05$), ou seja, preferência por permanecer por mais tempo no compartimento associado aos efeitos do etanol.

4.4.3 Discussão Parcial

Tanto animais adolescentes quanto adultos apresentaram desenvolvimento de sensibilização comportamental (aumento da atividade locomotora após tratamento repetido com a mesma dose de determinada droga). Porém, esse fenômeno foi mais exacerbado em animais adultos que em animais adolescentes.

No teste de PCL observou-se que animais previamente tratados com etanol na adolescência (J-ET) desenvolveram PCL, o que não aconteceu com animais da mesma idade pertencentes ao grupo controle (J-SAL). O resultado sugere que uma história prévia de contato com etanol é importante para que animais adolescentes apresentem PCL. Indivíduos que foram expostos ao etanol nesta fase crítica do desenvolvimento são mais propensos à associação das pistas ambientais ao efeito da droga posteriormente. Em comparação, o grupo A-SAL desenvolveu PCL, ao passo que os A-ET não desenvolveram, ou seja, parece haver um efeito de tolerância aos efeitos reforçadores do etanol em animais previamente expostos à droga na fase adulta.

A estimulação locomotora e PCL não estão necessariamente correlacionados. Risinger et al. (1994) utilizaram camundongos classificados de acordo com o desenvolvimento de atividade locomotora em “FAST” e “SLOW” e observaram o desenvolvimento de PCL em ambas as linhagens.

Observamos que camundongos adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol apresentaram desenvolvimento da sensibilização comportamental locomotora, porém tem-se denotado regularmente uma menor sensibilidade dos adolescentes a este efeito. Já em relação à PCL, o efeito é o oposto, os grupos de animais jovens tratados com etanol previamente (J-ET) e adultos pré-tratados com solução salina (A-SAL) foram os que apresentaram PCL. Evidências mostram que o desenvolvimento de PCL varia com a idade. Em ratos da linhagem “Sprague-Dawley” Philpot, Badanich e Kirstein (2003) observaram que animais adultos não apresentaram PCL com diversas doses de etanol testadas. No PND25 os animais apresentaram PCL a baixas doses (0,2 g/kg; 0,5 g/kg) e aversão nas doses mais elevadas (1,0 g/kg e 2,0 g/kg). No PND45 a PCL foi observada nas doses moderadas (0,5 g/kg e 1,0 g/kg) e aversão na dose de 2,0 g/kg. No PND35 e PND60 a PCL não foi detectada em dose alguma. A literatura ainda carece de

achados que relacionem o desenvolvimento de PCL à pré-exposição ao etanol tanto na adolescência quanto na vida adulta, como o presente estudo.

O núcleo accumbens está relacionado ao desenvolvimento de PCL ao etanol (GREMEL e CUNNINGHAM, 2008). A lesão do núcleo accumbens antes das sessões de condicionamento impediu o desenvolvimento da PCL, o que demonstra que o mecanismo depende da participação dessa estrutura. Gremel e Cunningham (2009) também relacionaram a aquisição de PCL aos receptores NMDA presentes no núcleo accumbens. Num experimento em que o antagonista AP-5 foi administrado diretamente no núcleo accumbens houve bloqueio da expressão da PCL. Gremel, Young e Cunningham (2011) observaram importante envolvimento do córtex cingulado anterior no desenvolvimento de PCL. Esta é uma das áreas ativadas por pistas ambientais, como demonstrado em estudos de imagem em humanos (EVERITT e ROBINS, 2005; SEE, 2002) e, portanto, reflete o efeito das pistas no incentivo motivacional. A proposta desses pesquisadores, de infundir um antagonista opióide nessa região antes do teste resultou em ausência de PCL. Portanto, os receptores glutamatérgicos no córtex cingulado anterior tem um papel importante no processamento de eventos recompensadores. O córtex cingulado anterior está anatomicamente conectado à amígdala e núcleo accumbens (GABBOTT et al., 2005), ou seja, faz parte de um circuito que regula a expressão da busca pelo etanol induzida por pistas. Curiosamente, apesar das evidências de participação de estruturas do sistema dopaminérgico mesolímbico na recompensa a drogas de abuso, Dickinson et al. (2003) administraram antagonistas dopaminérgicos (SCH23390, raclopride e U99194A) a camundongos da linhagem DBA/2J antes do teste e observaram que a PCL ao etanol não foi afetada. Camundongos tratados com acomprosato (utilizado para evitar a recaída ao uso de álcool) 10 minutos antes da administração de etanol (2,0g/kg), apresentaram redução no desenvolvimento de PCL (McGEEHAN e OLIVE, 2003), o que demonstra que o acomprosato pode diminuir os efeitos recompensadores de etanol. Apesar de o mecanismo de ação do acomprosato não ser ainda totalmente compreendido, tem-se demonstrado que um provável mecanismo seja inibir a excitabilidade neuronal mediada pelo antagonismo glutamatérgico, via modulação da atividade de receptores NMDA (SCOTT et al., 2005). Neste sentido, é interessante observar que os adolescentes apresentaram um aumento substancial da atividade glutamatérgica após administração repetida de etanol (Experimento “4.1”), enquanto

os adultos pré-tratados com etanol tiveram diminuição da atividade glutamatérgica no núcleo accumbens. Portanto, a atividade glutamatérgica nesta região parece ter um papel importante na PCL ao etanol.

É interessante também observar que os adolescentes tratados repetidamente com etanol que exibiram PCL, também apresentaram níveis aumentados de AMPc.

Neste primeiro experimento, seguimos o protocolo de Cunningham, Gremel e Groblewski et al. (2006), que geralmente utiliza camundongos da linhagem DBA. Em futuros experimentos pretendemos incorporar a sugestão de Risinger e Oakes (1996), que trabalhou com camundongos Swiss. Os autores utilizaram diversas doses de etanol para produzir PCL (1,0 g/kg; 2,0 g/kg; 3,0 g/kg; 4,0 g/kg) e 4 sessões de condicionamento a mais que nosso estudo. No primeiro teste, observaram PCL nas doses mais elevadas (3,0 e 4,0 g/kg). No segundo teste, ao final do experimento, a PCL foi evidente para todas as doses utilizadas. Já que o desenvolvimento de PCL varia de acordo com a espécie, linhagem, tempo de condicionamento e idade, nossa proposta é prolongar o tempo de condicionamento para tornar mais evidente o desenvolvimento de PCL em camundongos Swiss, adolescentes e adultos, e verificar se as diferenças encontradas são dependentes de dose e tempo de condicionamento.

4.5 Efeitos reforçadores do etanol em camundongos Swiss adolescentes e adultos previamente expostos a tratamento repetido com injeções de etanol no paradigma de auto-administração num protocolo de livre escolha entre duas garrafas

4.5.1 Delineamento Experimental

Cinco dias após o final do tratamento descrito em “4.1.1” camundongos swiss adolescentes e adultos foram sujeitos ao protocolo de Auto-Administração (Livre Escolha Entre Duas Garrafas) conforme descrito no item 3.9. Para o desenvolvimento da sensibilização comportamental foi utilizada a dose de 2,0 g/kg de etanol.

Foi utilizada a ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x concentração de etanol), na fase de instalação do consumo, em que as concentrações de etanol foram aumentando gradualmente. Considerando que esse experimento possui várias fases, foi utilizada a medida repetida para comparações específicas, assim como a ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) para comparações em que a concentração de etanol deixava de ser uma variável. Essas comparações específicas estão descritas na análise dos resultados.

4.5.2 Resultados

Figura 20 - Distância percorrida (cm) de animais adolescentes (J) e adultos (A) tratados com injeções intraperitoneais repetidas de 2,0 g/kg de etanol (ET) ou solução salina (SAL) por 15 dias consecutivos (Tratamento). Nos 2 dias que antecederam esse tratamento os animais receberam injeção de solução salina e foram habituados ao campo aberto (Habituação).

ANOVA de duas vias (idade x tempo) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls (Habituação); ANOVA de três vias (idade x tratamento x tempo) seguida de teste post-hoc Newman Keuls (Tratamento).

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n=11-12 animais por grupo.

○ $p < 0,05$ em comparação a hab. 1

● $p < 0,05$ em relação aos animais tratados com solução salina, no mesmo dia experimental

□ $p < 0,05$ em comparação ao primeiro dia de tratamento, trat. 1..

A Figura 20 representa a atividade locomotora de animais adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol (2,0 g/kg) ou solução salina por 15 dias consecutivos. A atividade locomotora foi quantificada nos 2 dias de habituação que antecederam o tratamento repetido, no primeiro dia de tratamento (tratamento agudo), na metade do tratamento (8º) e no último dia de tratamento (15º dia).

A ANOVA de 2 vias (idade x tempo) realizada para analisar o período da “Habituação” revelou efeito do tempo [$F(1,43)=7,0926$; $p<0,05$]. Em “Hab 2” os animais apresentaram atividade locomotora reduzida em comparação a hab. 1, o que indica habituação ao aparato. A ANOVA de 3 vias (idade x tratamento x tempo) revelou efeito do tratamento [$F(1,41)=77,581$; $p<0,05$], do fator tempo [$F(2,82)=6,941$] e interação dos fatores tempo x tratamento [$F(2,82)=9,415$; $p<0,05$] para o período experimental “Tratamento”.

Nos dias experimentais trat. 8 e trat. 15 animais jovens e adultos tratados com ET apresentaram atividade locomotora aumentada em comparação a seus respectivos grupos controle, tratados com solução salina. Em trat. 8 e trat. 15 os grupos J-ET e A-ET apresentaram atividade locomotora significativamente aumentada em comparação ao primeiro dia de tratamento, o que caracteriza a sensibilização comportamental.

Figura 21 - O gráfico representa o consumo (g/kg) de etanol (2%, 4%, 6%, 8% e 10%) em animais adolescentes (J) e adultos (A) expostos ao protocolo de livre escolha entre duas garrafas após tratamento repetido com salina ou etanol. Após um período de abstinência, os animais foram re-expostos à solução de etanol 10% (AB). Na última fase de exposição, a solução foi adulterada com quinino (QUI). O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão. n=9-11 animais por grupo.

- $p < 0,05$ em comparação aos animais jovens, para a mesma medição
- $p < 0,05$ em comparação aos animais de mesma idade, porém tratados com solução salina
- $p < 0,05$ em comparação ao mesmo grupo em 10%(2)

Figura 22 - O gráfico representa a preferência pelas soluções de etanol (2%, 4%, 6%, 8% e 10%) em animais adolescentes (J) e adultos (A) expostos ao protocolo de livre escolha entre duas garrafas após tratamento repetido com salina ou etanol. Após um período de abstinência, os animais foram re-expostos à solução de etanol 10% (AB). Na última fase de exposição, a solução foi adulterada com quinino (QUI).

O gráfico representa as médias $\pm$ erro padrão.

n=9-11 animais por grupo.

○ $p < 0,05$ em comparação aos animais jovens, para a mesma medição.

● $p < 0,05$ em comparação aos animais de mesma idade, porém tratados com solução salina.

As Figuras 20 e 21 ilustram o Consumo e a Preferência por etanol respectivamente, de animais adolescentes e adultos tratados previamente com injeções repetidas de etanol ou solução salina.

A análise estatística do Consumo de etanol pela ANOVA de 3 vias (idade x tratamento prévio x concentração de etanol) (Figura 21) mostrou aumento no consumo (g/kg) da solução de etanol com o aumento da concentração de etanol [$F(8,296)=65,4$; $p<0,05$]. A interação dos fatores idade x concentração [$F(8,296)=3,58$; $p<0,05$] indicou menor consumo de etanol entre os adolescentes, na concentração de 10% antes do período de abstinência, comparados aos adultos. A análise dos dados de consumo de etanol a 10%, após o período de abstinência, (com ou sem quinino) não mostrou diferenças entre os animais adolescentes e adultos, sugerindo que os animais adolescentes passaram a consumir mais etanol após a abstinência. A interação dos fatores tratamento prévio x concentração [$F(8,296)=4,11$; $p<0,05$] indicou que na última fase da exposição às soluções (fase de adulteração com quinino), os animais tratados previamente com etanol consumiram mais solução de etanol 10% do que aqueles tratados previamente com salina. Uma vez que o quinino não é considerado uma substância de sabor agradável, essa diferença encontrada durante essa fase do experimento se deve ao maior tempo de exposição aos efeitos do etanol. Essa diferença não foi detectada entre os animais adultos. Uma análise longitudinal (ANOVA de uma via para medidas repetidas) de cada grupo indicou que os animais adolescentes pré-tratados com salina apresentaram aumento de consumo de etanol até que a solução de etanol atingisse a concentração de 6%. A partir dessa concentração, o consumo se estabilizou [$F(8,80)=20,78$; $p<0,05$]. Os adultos pré-tratados com salina atingiram um pico de consumo com a concentração de 10% de etanol pré-abstinência [$F(8,64)=13,71$; $p<0,05$]. Os animais adolescentes pré-tratados com etanol apresentaram um padrão de consumo diferencial. Houve um aumento gradativo de consumo até atingir a concentração de 6%, que se estabilizou (entre 6% e 10%). Entretanto, após o período de abstinência, observou-se um aumento gradual do consumo comparado ao último período de exposição à solução de etanol 10% (pré-abstinência) [$F(8,80)=17,64$; $p<0,05$]. Em relação aos animais adultos pré-tratados com etanol, os mesmos aumentaram o consumo de etanol até que a solução de etanol atingisse a concentração de 8%. A partir dessa concentração, o consumo se estabilizou [$F(8,72) = 21,85$; $p<0,05$].

A Figura 22 ilustra a Preferência de animais tratados com 15 injeções de etanol ou solução salina 0,9% e posteriormente expostos ao paradigma de livre escolha entre duas garrafas.

A análise estatística da preferência pelo etanol pela ANOVA de 3 vias para medidas repetidas (idade x tratamento prévio x concentração) mostrou diferenças estatísticas para o fator concentração [$F(8,296)=5,17$; $p<0,05$], para a interação idade x concentração [$F(8,296)=2,91$; $p<0,05$] e para a interação pré-tratamento x concentração [$F(8,296)=2,22$; $p<0,05$]. O aumento da concentração de etanol diminuiu a preferência pelo álcool entre os camundongos a partir da concentração de etanol 8%, comparado com as concentrações de 2 e 4%. A interação idade x concentração revelou que os animais adolescentes apresentaram menor preferência à concentração de etanol 8 e 10% em comparação às concentrações de 2 e 4%, antes do período de abstinência. Essa diferença desapareceu após a abstinência. Entre os animais adultos, não houve alteração na preferência entre as diferentes concentrações. Observou-se um aumento da preferência pela concentração de etanol 10% (durante a segunda exposição a essa concentração) em adultos comparados aos adolescentes. Como foi detectada diferença estatística na interação pré-tratamento x concentração, analisamos, separadamente, as diferenças entre os grupos para cada concentração, usando uma ANOVA de 2 vias (idade x tratamento prévio) para cada concentração. Não foram encontradas diferenças estatísticas nas concentrações 2%, 4%, 6% e 8%. A análise dos dados referentes à concentração de 10% (1ª. exposição) revelou que os animais adultos apresentaram maior preferência comparados aos adolescentes [$F(1,37)=4,71$; $p<0,05$]. Resultado semelhante foi detectado com a 2ª. exposição de etanol 10% [$F(1,37)=11,84$; $p<0,05$]. Essas diferenças relacionadas à idade desapareceram após o período de abstinência. A análise dos dados de preferência relativa ao último período de exposição ao etanol (10% de etanol + quinino) indicou uma diferença de pré-tratamento [$F(1,37)=8,32$; $p<0,05$]. Os animais pré-tratados com etanol (durante a adolescência ou na vida adulta) apresentaram maior preferência pelo etanol do que aqueles que receberam solução salina.

4.5.3 Discussão Parcial

Assim como nos experimentos anteriores, animais adolescentes e adultos, tratados repetidamente com etanol, apresentaram o fenômeno de sensibilização comportamental, sendo a magnitude da sensibilização comportamental em adolescentes menor do que a observada em adultos.

Em relação aos dados de consumo, observamos que a exposição dos animais a uma concentração mais alta de etanol (10%) revelou uma diferença de consumo dependente da idade. Os animais adultos, independente do pré-tratamento, consumiram mais etanol 10%, relativo ao peso corpóreo, comparados aos adolescentes. Após um período de abstinência, essa diferença desapareceu, ou seja, a abstinência promoveu aumento do consumo em animais adolescentes tratados previamente com etanol. Quando o sabor da solução foi alterado, ou seja, tornou-se amargo devido à presença do quinino, os animais do grupo J-ET mantiveram o consumo aumentado em comparação ao grupo de animais J-SAL. Este, provavelmente, é o achado mais interessante de nosso estudo, pois demonstra a vulnerabilidade do indivíduo à recaída quando exposto ao etanol no período da adolescência. No período de livre-escolha, quando os animais adolescentes tinham à sua disposição soluções de etanol, a fissura pela droga não se manifestou. Entretanto, a história prévia de exposição ao etanol durante a adolescência interagiu com as mudanças induzidas pela abstinência e promoveu um aumento na fissura pela droga, com conseqüente aumento gradual no consumo de etanol, mesmo quando a solução estava alterada por quinino.

O modelo de auto-administração é um dos modelos mais aceitos e relevantes para a dependência ao álcool, visto que mimetiza a motivação para buscar a droga, ou seja, a escolha espontânea do sujeito experimental pelo consumo da droga. A técnica de microdiálise permitiu que Griffin, Middaugh e Becker (2007) observassem as concentrações de etanol no núcleo accumbens de camundongos C57BL/6J (B6) enquanto bebiam etanol voluntariamente.

Apenas alguns pesquisadores realizam tratamento com injeções repetidas anteriormente ou algum outro tipo de exposição prévia ao etanol. Alguns estudos com animais adultos demonstram que a pré-exposição ao etanol pode modificar o consumo (CAMARINI e HODGE, 2004) ou sensibilização locomotora (LESSOV et

al., 2001) posteriormente. No presente estudo, demonstramos que um histórico de pré-exposição ao etanol alterou a preferência pela droga, ou seja, animais pré-tratados com etanol, independente da idade, apresentaram maior preferência pelo etanol do que aqueles pré-tratados com salina. Entretanto, é importante salientar que essa maior preferência induzida pela exposição prévia com etanol só foi observada após um período de abstinência. O “efeito da privação de álcool” (EPA) é um aumento temporário na razão de consumo de etanol/total de fluido ingerido e no consumo voluntário de soluções de etanol sobre as condições basais de beber voluntário, quando o acesso ao etanol é reinstalado após um período de privação de álcool. Esse modelo tem sido usado como modelo de recaída e fissura. Apesar de o modelo requerer vários períodos de abstinência (SPANAGEL e HÖLTER, 2000), Rodd-Henricks et al. (2000) mostraram que após um único período de privação (por 2, 4, 6 ou 8 semanas), os animais privados exibem um aumento nos níveis de consumo de etanol relativo às condições basais de beber.

A literatura ainda carece de estudos com animais adolescentes. A proposta desse estudo foi observar se a exposição ao etanol no período da adolescência (tratamento com injeções repetidas) poderia alterar o consumo ou preferência ao etanol posteriormente.

Há poucos estudos de auto-administração com animais adolescentes (HEFNER e HOLMES, 2007; SIEGMUND et al., 2005; TAMBOUR, BROWN e CRABBE, 2008; VETTER, DOREMUS-FITZWATER e SPEAR, 2007; WALKER, WALKER e EHLERS, 2008). Tambour, Brown e Crabbe (2008) utilizaram um protocolo de exposição à droga, seguido de privação e re-exposição. Observaram que camundongos adolescentes foram mais vulneráveis ao consumo de etanol em comparação a animais adultos em todas as fases experimentais. Vetter, Doremus-Fitzwater e Spear (2007) acompanharam o consumo do álcool por ratos da adolescência até a idade adulta. Durante a adolescência, os indivíduos consumiam mais que adultos. Porém, conforme foram alcançando a idade adulta, passaram a consumir tanto quanto animais adultos.

Podemos comparar nossos achados com os poucos estudos em que ratos adolescentes foram previamente expostos ao etanol antes de serem sujeitos à auto-administração. Walker e Ehlers (2009) separaram o comportamento de busca (“drug-seeking”) do comportamento de utilizar (“drug-taking”) o etanol. Propuseram ao sujeito experimental percorrer um caminho (buscar) para obter (beber) o etanol, ou

seja, um engajamento numa tarefa motivacional. Animais adolescentes treinados nessa tarefa apresentaram consumo aumentado num protocolo de livre escolha entre duas garrafas na idade adulta, ou seja, a tarefa motivacional contribuiu para o aumento do consumo. Rodd-Henricks et al. (2002a;b) permitiram que ratos tivessem acesso ao etanol do PND 30-60. No PND 75 esses animais foram colocados num aparato em que, ao pressionar a barra, eram recompensados com etanol. Animais expostos ao etanol na adolescência apresentaram aquisição mais rápida do comportamento de pressionar a barra em comparação a animais adultos, além de maior resistência para extinguir esse comportamento quando o etanol deixou de ser fornecido como recompensa. Esses autores associaram a rápida aquisição do comportamento com a saliência do incentivo motivacional (etanol). O aprendizado associativo participa do processo de aquisição desse comportamento (KATNER, MAGALONG e WEISS, 1999). O resultado mais interessante de nosso experimento denota do fato de que animais com uma história prévia de exposição ao etanol durante a adolescência, passaram a consumir mais etanol, após um período de abstinência. Este dado é corroborado por Siegmund et al. (2005), que também observou aumento no consumo de etanol após a abstinência por ratos. Nosso experimento é somado aos achados já descritos, mostrando a vulnerabilidade do indivíduo adolescente ao consumo do etanol e vulnerabilidade para recaída. Essa diferença em comparação ao indivíduo adulto, provavelmente está relacionada às particularidades relacionadas ao processo de maturação de substratos neurais na adolescência, que refletem peculiaridades dos processos motivacionais e de aprendizado associativo.

Sari, Bell e Zhou (2006) propuseram que, em protocolos de auto-administração mais longos, os níveis de dopamina reduzem progressivamente. Esta hipótese pode explicar o aumento do consumo progressivo do consumo pelos animais na fase de livre escolha. O aumento do consumo de etanol após a abstinência, observado em animais adolescentes, pode ser motivado pela diminuição da liberação de dopamina no núcleo accumbens durante a abstinência. A redução da dopamina pode contribuir para os sintomas de abstinência (KOOB e VOLKOW, 2010; MELIS, SPIGA e DIANA, 2005; TREVISAN et al., 1998). Weiss et al. (2006) observaram que a re-exposição restaurou os níveis de dopamina no núcleo accumbens, mas falhou em restaurar completamente. Dessa forma, os animais estariam mais motivados a consumir o etanol para manter os níveis ótimos

de dopamina nessa região. A inibição da liberação de dopamina promovida pelo auto-receptor dopaminérgico D2 pode contribuir para o estado de hipodopaminergia durante a abstinência (PERRA et al., 2011). O alívio dos sintomas de abstinência promove aumento do consumo. Sugere-se também participação do fator de liberação da corticotrofina no aumento do consumo na re-exposição, pois o antagonismo desta função reduz a auto-administração (FUNK et al., 2006; SPARTA et al., 2009).

A auto-administração induz modificações na neurotransmissão (WOLFFGRAMM e HEYNE, 1995; FADDA e ROSSETTI, 1998; LITTLETON, 2001), controle da emoção (GRAY e McNAUGHTON, 2000) e processos de aprendizado (KALIVAS e VOLKOW, 2005). Nestby et al. (1999) observaram em cortes de caudato putamen, mas não de núcleo accumbens, que a produção de AMPc estimulada pelo receptor D1 pós-sináptico estava aumentada após auto-administração de etanol. O consumo de etanol causou aumento da reatividade de neurônios dopaminérgicos terminais no núcleo accumbens, mas não no caudato putamen. As neuroadaptações em receptores promovidas pelo consumo contínuo são diferentes daquelas promovidas pela abstinência. Num estudo de autoradiografia, Sari, Bell e Zhou (2006) perceberam que animais expostos a um protocolo contínuo de auto-administração e animais que passaram por repetidas privações apresentaram aumento na densidade de receptores dopaminérgicos D1 no “cerne” do núcleo accumbens e de receptores D2 na “concha” e no “cerne” do núcleo accumbens. Porém, apenas o grupo que passou por privações apresentou também aumento da densidade de receptores D1 na amígdala e receptores D2 no estriado dorsal. Os autores compararam, na discussão do artigo, diversos protocolos de auto-administração e propuseram que a densidade desses receptores varia conforme o tempo de consumo, características do protocolo e concentração de etanol consumida. Além de alteração em receptores, a atividade dos neurônios dopaminérgicos é regulada por diversos neurotransmissores que também sofrem neuroadaptações promovidas pelo etanol (MORIKAWA e MORRISETT, 2010).

Enquanto alguns estudos mostram correlação negativa entre auto-administração e sensibilização locomotora (PHILLIPS et al., 1995) outros mostram correlação positiva (CAMARINI, NOGUEIRA PIRES e CALIL et al., 2000a; LESSOV et al., 2001). Ribeiro et al. (2008) observaram desenvolvimento de sensibilização comportamental (aumento da atividade locomotora) induzida pelo etanol

independentemente da classificação dos animais conforme o padrão de consumo em “Dependente”, “Consumo Pesado” e “Consumo Leve”. Portanto, o padrão de consumo não se correlacionou com os achados de atividade locomotora induzida pelo etanol. Evidências demonstram que os substratos neurais envolvidos no aumento da atividade locomotora não são exatamente os mesmos envolvidos no consumo voluntário de etanol. Afinal, no paradigma de auto-administração o animal “escolhe” se beberá ou não da solução de etanol. Por outro lado, a injeção aplicada pelo experimentador não é uma opção. A comparação do comportamento das linhagens de camundongos C57 e DBA provavelmente está entre os melhores exemplos de que tal correlação não pode ser esperada. Afinal, camundongos C57 consomem espontaneamente o etanol e dificilmente desenvolvem sensibilização locomotora, já camundongos DBA apresentam sensibilização locomotora, mas não consomem voluntariamente (LESSOV et al., 2001).

4.6 Comportamento de consumo de camundongos adolescentes e adultos da linhagem C57, vulnerável ao consumo voluntário de álcool, num protocolo de múltiplas intoxicações com vapor de etanol seguidas de abstinência

4.6.1 Delineamento Experimental

O experimento envolveu 5 fases e durou 5 semanas conforme descrito no item 3.10. Três semanas de livre escolha entre 2 garrafas (Basal, Teste 1 e Teste 2) foram intercaladas por 2 semanas de inalação de etanol (grupos MA) ou somente ar (grupos CTR), definidas como Ciclo I e Ciclo II. Após a primeira semana experimental (Consumo Basal), em que os animais foram expostos ao paradigma de livre-escolha entre duas garrafas, grupos de animais adolescentes e adultos foram subdivididos nos grupos “Múltiplas Abstinências (MA)” e “Controle (CTR)”. Os grupos MA receberam 4 ciclos (de segunda-feira a quinta-feira) de 16h de exposição contínua ao vapor de etanol em câmaras de inalação, com um período de 8h separando cada exposição. Os animais dos grupos CTR passaram pelo mesmo procedimento; porém, foram colocados em câmaras com ar nas horas correspondentes a exposição ao etanol para os outros animais. Assim, foram constituídos 4 grupos experimentais: J-CTR, J-MA, A-CTR e A-MA; constituídos de 9-12 animais cada.

Nas fases de comportamento de beber (Basal, Teste 1 e Teste 2) camundongos adolescentes e adultos beberam etanol voluntariamente num paradigma de livre escolha entre 2 garrafas por 5 dias consecutivos como previamente descrito no item 3.9. As fases de inalação (Ciclo I e Ciclo II) duraram 4 dias e os animais foram expostos ao vapor de etanol (MA) ou ar (CTR) por 64h ao todo (16h por dia, por 4 dias; 8h de intervalo entre as exposições).

Antes de serem colocados nas câmaras de inalação, animais adolescentes e adultos receberam uma injeção de etanol + pirazole (MA) ou apenas pirazole (CTR).

O delineamento experimental empregado permitiu a análise do consumo em três períodos: Basal, Teste 1 e Teste 2. Esses dois últimos períodos corresponderam a sessões de consumo que aconteceram após uma primeira e

segunda intoxicação com etanol seguida de abstinência; respectivamente, o Ciclo I e o Ciclo II.

O consumo de etanol (g/kg) e a preferência durante cada período de consumo (Basal, Teste 1 e Teste 2) foram analisados pela ANOVA de 3-vias (idade x tratamento x dias) sendo “dias” a medida repetida. As médias do consumo semanal também foram utilizadas para análise. O teste post-hoc utilizado foi o Newman-Keuls. Os valores de concentração de álcool no sangue obtidos de animais adolescentes e adultos durante a exposição ao vapor foram analisados por uma ANOVA de 2 vias (idade x ciclo) seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls. Ao final do experimento, quando amostras de sangue foram obtidas de todos os grupos, os dados foram analisados por uma ANOVA de 2-vias (idade x tratamento) e teste post-hoc de Newman-Keuls.

4.6.2 Resultados

Figura 23 - A figura ilustra todos os dias dos períodos experimentais de consumo num paradigma de livre escolha entre duas garrafas; camundongos C57 adolescentes e adultos.

ANOVA de três vias (idade x tratamento x dias) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls.

n=9-12 animais por grupo.

● p<0,05 em comparação aos respectivos grupos controle.

Figura 24 - A figura ilustra as médias semanais dos períodos experimentais de consumo num paradigma de livre escolha entre duas garrafas; camundongos C57 adolescentes e adultos.
ANOVA de três vias (idade x tratamento x período) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls.
n=9-12 animais por grupo.
● $p < 0,05$ em comparação aos respectivos grupos controle.
○ $p < 0,05$ em comparação ao período Basal.

Figura 25 - A figura ilustra todos os dias dos períodos experimentais de consumo num paradigma de livre escolha entre duas garrafas; camundongos C57 adolescentes e adultos. ANOVA de três vias (idade x tratamento x dias) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls.
n=9-12 animais por grupo.
● $p < 0,05$ em comparação aos respectivos grupos controle.
○ $p < 0,05$ em relação aos animais adolescentes.

Figura 26 - A figura ilustra as médias semanais dos períodos experimentais de consumo num paradigma de livre escolha entre duas garrafas; camundongos C57 adolescentes e adultos.
ANOVA de três vias (idade x tratamento x período) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls.
n=9-12 animais por grupo.
● $p < 0,05$ em comparação ao grupo J-MA.
○ $p < 0,05$ em relação ao período Basal.

As figuras 23 e 24 representam o consumo de etanol (g/kg). Os valores foram obtidos a partir do cálculo da quantidade de etanol consumida pelos animais proporcionalmente ao peso corpóreo. A figura 23 representa o consumo de etanol (g/kg) e ilustra cada dia experimental, enquanto a figura 24 representa a média dos dados semanais de cada período de consumo. A ANOVA de 3 vias (idade x tratamento x dias) revelou efeito dos dias [$F(14,504)=56,826$; $p<0,05$] e interação dos fatores dias x tratamento [$F(14,504)=3,067$; $p<0,05$]; (figura 24). De fato, diferenças significativas entre os tratamentos foram detectadas ao longo dos dias. Não foi observado efeito da idade (figuras 23 e 24), ou seja, animais adolescentes e adultos apresentaram o mesmo padrão de consumo no protocolo utilizado. A ANOVA de 3 vias seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls não revelou diferença significativa alguma no consumo (g/kg) de etanol entre os grupos durante o período de consumo Basal (figuras 23 e 24). A ANOVA de 3 vias (período x tratamento x idade) seguida pelo teste post-hoc Newman-Keuls indicou aumento significativo no consumo (g/kg) pelos grupos MA (Adolescentes e Adultos) e também pelos respectivos grupos controle (Adolescentes e Adultos) nos períodos de teste em comparação ao período de consumo Basal (figura 24). Este resultado é indicado pelo efeito do fator período [$F(2,72)=202,673$; $p<0,05$] e interação dos fatores período x tratamento [$F(2,72)=8,392$; $p<0,05$]. O aumento no consumo pelos grupos controle sugere que a abstinência por si só, mesmo na ausência da intoxicação com vapor, promove aumento no consumo. Porém, a exposição ao vapor promoveu aumento do consumo em animais adolescentes e adultos (MA) em comparação aos grupos não expostos (figura 24) em Teste 1 e Teste 2. Diferenças significativas entre os grupos não foram detectadas quando o período Teste 1 foi comparado com Teste 2 (figura 24).

A preferência pelo álcool também foi calculada (figuras 25 e 26). A ANOVA de 3 vias (idade x tratamento x dias) revelou efeito do fator “dias” [$F(14,504)=24,483$; $p<0,05$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou diversas diferenças entre os grupos ao longo dos dias experimentais (figura 25). Quando os dias experimentais foram colabados para análise, a ANOVA de 3 vias seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls revelou efeito do período experimental [$F(2,72)=115,446$; $p<0,05$]. De fato, todos os grupos exibiram aumento da preferência pelo etanol nos períodos de teste em comparação ao período de consumo Basal. Não foram detectadas diferenças entre Teste 1 e “Teste 2”.

Figura 27 - Concentração de etanol no sangue de animais adolescentes e adultos dos grupos MA nos períodos de exposição ao vapor de etanol seguido de abstinência.

ANOVA de duas vias (idade x tempo) seguida de teste post-hoc Newman-Keuls.

n=9-12 animais por grupo.

- $p < 0,05$ em comparação aos animais adolescentes
- $p < 0,05$ em comparação ao mesmo grupo em Ciclo I.

Concentração de Etanol no Sangue (após "Teste 2")

Figura 28 - Concentração de etanol no sangue de animais adolescentes e adultos de todos os grupos experimentais após o Teste 2.
ANOVA de 2 vias seguida de teste post-hoc Newman-Keuls.
n=9-12 animais por grupo.
○ $p < 0,05$ em comparação ao grupo CTR-adolescente.

A figura 27 apresenta os valores de CES obtidas de amostras coletadas de animais dos grupos MA nos dois períodos de ciclo. Quando os dois períodos de ciclo foram comparados, a ANOVA de 2 vias (ciclo x idade) revelou interação dos fatores ciclo x idade [$F(1,19)=19,579$; $p<0,05$]. De fato, a CES apresentou variação relacionada ao ciclo e idade dos animais. A análise post-hoc (Newman-Keuls) revelou que no primeiro ciclo animais adultos apresentaram CES mais elevadas que animais adolescentes. Porém, no segundo ciclo, animais adultos apresentaram menor CES em comparação a animais adolescentes e em comparação ao próprio grupo no primeiro ciclo, sugerindo um efeito de tolerância. Não foram observadas diferenças significativas entre os ciclos quando os valores de CES de animais adolescentes foram comparados. Este resultado sugere que os animais adolescentes não apresentaram tolerância.

Ao final do experimento, quando os animais foram expostos ao paradigma de livre-escolha entre duas garrafas pela última vez (Teste 2), amostras de sangue foram coletadas antes que os animais fossem sacrificados (figura 28). A ANOVA de 2 vias (idade x tratamento) revelou efeito do fator idade – colocar no gráfico. A análise post-hoc Newman-Keuls revelou que animais adultos do grupo controle apresentaram maior CES em comparação a animais adolescentes, também do grupo controle (CTR). Diferenças significativas não foram detectadas entre animais adolescentes e adultos expostos às múltiplas intoxicações seguidas de abstinência (MA).

Figura 29 - Peso corpóreo de animais adolescentes e adultos expostos (MA) ou não (CTR) à múltiplas intoxicações com vapor de etanol.
 ANOVA de 3 vias seguida de teste post-hoc Newman-Keuls
 n=9-12 animais por grupo.
 ● p<0,05 em comparação ao respectivo grupo controle.

Animais adolescentes e adultos que foram expostos ao vapor de etanol (MA) apresentaram redução significativa no peso corpóreo ao final dos ciclos. Essas diferenças deixaram de ser observadas na semana seguinte, em que os animais consumiam etanol no paradigma de livre escolha entre 2 garrafas. Esses resultados são revelados pela ANOVA de 3 vias (dias x tratamento x idade) seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls que mostrou efeito do fator dias [$F(22,792)=65,811$; $p<0,05$], interação dos fatores idade x dias [$F(22,792)=31,939$; $p<0,05$] e interação dos fatores dias x tratamento [$F(22,792)=12,985$; $p<0,05$]. A figura 29 ilustra essa variação no peso corpóreo em camundongos adolescentes e adultos ao longo dos dias experimentais. É possível observar que essa variação está relacionada ao tratamento, já que animais dos grupos MA apresentaram redução no peso corpóreo em comparação aos respectivos grupos controle.

4.6.3 Discussão Parcial

Os animais dos grupos controle, adolescentes e adultos, apresentaram consumo aumentado de etanol em Teste 1 e Teste 2 em comparação ao período de consumo Basal. Esses animais não foram expostos às múltiplas intoxicações seguidas de abstinência (injeção de etanol + vapor de etanol / abstinência); mas permaneceram abstinentes do consumo de etanol nos períodos em que os outros grupos experimentais foram expostos à inalação. Assim, o aumento do consumo nos grupos controle mostra que a abstinência induzida pelo consumo voluntário de etanol, por si só, promoveu aumento no consumo de etanol.

Animais dos grupos experimentais (adolescentes e adultos expostos à intoxicação / abstinência) apresentaram consumo aumentado em Teste 1 e Teste 2 em comparação ao período Basal e em comparação aos respectivos grupos controle, sugerindo uma adição do efeito de abstinência mais a tolerância induzida pela intoxicação do vapor de álcool. Não foram detectadas diferenças significativas entre os períodos Teste 1 e Teste 2.

Estudos anteriores corroboram nossos achados. Animais adolescentes e adultos aumentam o consumo após a privação num paradigma de livre escolha entre duas garrafas (TAMBOUR, BROWN e CRABBE., 2008; SIEGMUND et al., 2005) ou auto-administração operante (RODD-HENRICK et al., 2002a,b). Possíveis mecanismos relacionados a este achado podem ser as modificações promovidas pelo etanol nos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico e glutamatérgico, que são fundamentais para o mecanismo de recompensa (CHAMBERS, TAYLOR e POTENZA, 2003). Weiss et al. (1996) sugeriram que o déficit na liberação de dopamina no NAcc devido à abstinência promove motivação para a auto-administração quando a droga é oferecida novamente. O consumo de etanol restaura os níveis de dopamina no NAcc. RAEDER et al. (2008) detectou alterações relacionadas ao sistema glutamatérgico no estriado. Esses autores observaram que diversas fases de privação de etanol aumentam a atividade e promovem modificações na quantidade de RNAm (RNA mensageiro) que codifica diversas subunidades NMDA. Alguns autores destacaram a participação do Fator de Liberação da Corticotrofina no aumento do consumo de etanol observado após a abstinência. Um antagonista do Fator de Liberação de Corticotrofina impediu que os

animais apresentassem o comportamento de pressionar a barra exacerbadamente após a abstinência (SPARTA et al., 2009) e aumentassem o consumo após exposição ao vapor de etanol (FINN et al., 2007).

As propriedades reforçadoras do etanol podem ser observadas quando os animais têm a oportunidade de associar o consumo de etanol com o alívio dos sintomas de abstinência (MEISCH, 2001). Devido à natureza crônica e episódica do alcoolismo, muitos indivíduos dependentes experimentam múltiplos episódios de abstinência e consumo pesado, intoxicação. Dessa forma, para muitos indivíduos dependentes, a experiência de abstinência repetida pode ser especialmente relevante para refinar os substratos motivacionais e promover a instalação do comportamento de busca pela droga e consumo (“drug-seeking” e “drug-taking”) (BECKER e LOPEZ, 2004).

Estudos anteriores demonstraram que este modelo de múltiplas exposições ao vapor de etanol / abstinência promoveu aumento no consumo de etanol em animais C57 adultos (BECKER e LOPEZ, 2004; LOPEZ e BECKER, 2005) no Teste 1 e Teste 2 em comparação ao período de consumo basal. Nosso presente estudo corrobora os estudos anteriores ao confirmar os resultados encontrados em animais adultos. Porém, diferenças importantes devem ser notadas entre os protocolos. Em estudos anteriores (BECKER e LOPEZ, 2004) os animais permaneceram no período Basal por aproximadamente um mês com o objetivo de estabilizar o consumo, mas no presente estudo um protocolo de 5 dias de consumo Basal foi utilizado. De outra forma, os animais adolescentes teriam alcançado a idade adulta nos períodos de teste. Mesmo fazendo essa adaptação, não observamos diferenças significativas entre os grupos no período de consumo Basal; além disso, o aumento no consumo de etanol por todos os grupos foi observado.

Os animais nunca foram privados de água durante o estudo, portanto, o aumento no consumo de etanol não pode ser justificado pela sede (um fator natural de motivação), mas sim pelo comportamento de busca pela droga. Este fato foi previamente comprovado por Becker e Lopez (2004) que ofereceram solução de sacarose ao invés de etanol e não observaram aumento no consumo.

O metabolismo do etanol depende da dose de etanol administrada (LOPEZ et al., 2003; QUETERMONT, GREEN e GRANT, 2003), via de administração, tempo de exposição ao etanol (DIAZ-GRANADOS e GRAHAM, 2007), espécie, linhagem e idade (CHUNG et al., 2008). No presente estudo, quando a via de administração foi

a inalação de etanol, a concentração de álcool no sangue observada foi em torno de 200 mg/dl. Em comparação, quando o etanol foi ingerido pelos animais (auto-administração), os valores de concentração de álcool no sangue ficaram em torno de 20 mg/dl. A concentração de álcool no sangue também apresentou variação dependente da idade.

A concentração de álcool no sangue foi quantificada durante os períodos de inalação de vapor (Ciclo I e Ciclo II) em amostras de sangue coletadas dos grupos expostos ao vapor (adolescentes e adultos). Quando o Ciclo I e o Ciclo II foram comparados, não foram observadas alterações no metabolismo do etanol em animais adolescentes. Porém, na primeira exposição ao vapor (Ciclo I), animais adultos apresentaram concentração de etanol no sangue aumentada em comparação aos animais adolescentes. Este achado sugere que animais adultos metabolizam o etanol mais lentamente que animais adolescentes. Na segunda exposição ao vapor (Ciclo II) animais adultos apresentaram concentração de etanol no sangue reduzida em comparação a animais adolescentes e em comparação a eles mesmos (Ciclo II x Ciclo I). Este resultado sugere que, na segunda exposição ao vapor de etanol, os animais adultos foram capazes de metabolizar o etanol mais rapidamente que animais adolescentes e também mais rapidamente que a primeira vez que foram expostos ao vapor de etanol. Essa diminuição nos níveis de álcool no sangue reflete a indução enzimática induzida pelo etanol, levando à tolerância farmacocinética de seus efeitos. É interessante observar que os adolescentes não apresentaram esse efeito.

A concentração de etanol no sangue também foi quantificada ao final do experimento. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de animais adultos. Animais adultos, expostos ou não ao protocolo de intoxicação apresentaram concentração de etanol no sangue aumentada em comparação aos grupos de animais adolescentes. Diferenças significativas foram observadas quando o grupo Adulto-controle foi comparado ao grupo Adolescente-controle. Ou seja, os adultos apresentaram um metabolismo mais lento do que os adolescentes.

É relevante notar que animais adultos apresentaram o mesmo padrão de consumo de etanol apesar das diferenças metabólicas observadas. Este achado é corroborado por nosso grupo (CARRARA-NASCIMENTO et al., 2011) e STEVENSON, BESHEER e HODGE (2008). Esses trabalhos mostraram existir diferenças comportamentais na atividade locomotora de animais adolescentes e

adultos, induzida pela administração de etanol, porém, sem encontrar diferenças na concentração de etanol no sangue. Essas observações sugerem que o comportamento dos animais adolescentes e adultos não está necessariamente relacionado com a concentração de etanol no sangue.

Evidências anteriores demonstram que após algum tempo de tratamento com etanol os animais apresentam redução na concentração de etanol no sangue (LINSENBARDT et al., 2009; STEVENSON BESHEER e HODGE 2008). Estas evidências também são corroboradas por Zuba et al., (2002) que mostraram que a taxa de eliminação de etanol por pacientes dependentes (freqüentemente expostos ao álcool) é maior que a de indivíduos que bebem socialmente. Os autores atribuíram esse achado à indução enzimática promovida pelo etanol. No presente estudo, na segunda exposição ao vapor de etanol (Ciclo II), animais adultos apresentaram redução na concentração de etanol no sangue em comparação a animais adolescentes e em comparação a eles mesmo no Ciclo I. Este resultado sugere que, numa segunda exposição ao vapor de etanol, os animais adultos foram capazes de metabolizar o etanol mais rapidamente que os adolescentes e mais rapidamente do que a primeira vez que foram expostos ao vapor de etanol. Linsenbardt et al. (2009) mostraram que quando a concentração de etanol no sangue foi analisada novamente, após dias de injeções consecutivas de etanol, tanto animais adolescentes quanto adultos apresentaram redução nos níveis de álcool no sangue em comparação à coleta realizada após a primeira injeção de etanol (tratamento agudo). Porém, esse achado não foi observado nos animais adolescentes do presente estudo. A via de administração e diferenças entre protocolos devem ser consideradas.

As amostras de sangue coletadas após o Teste 2 revelaram que animais adolescentes metabolizaram o etanol mais rapidamente que animais adultos. Estudos anteriores corroboram nossos achados. Lopez e Becker (2003) notaram que após uma única injeção de 2,5 g/kg de etanol animais C57 adultos exibiram maior quantidade de etanol no sangue em comparação a adolescentes. Chung et al. (2008) observaram aumento na concentração de álcool no sangue de ratos adultos em comparação a jovens, e eliminação mais rápida após uma única injeção intraperitoneal de 2,5 g/kg de etanol. Os autores também observaram que a atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH-2 e ADH-3) no fígado estava mais elevada em animais jovens em comparação a animais adultos. Linsenbardt et al.

(2009) também observaram que camundongos C57BL6/2J se recuperam mais rapidamente do que adultos de uma dose elevada de etanol (4,0 g/kg), que é intoxicante e produz LORR (“Loss of righting reflex” ou perda do reflexo postural). Estes autores também avaliaram a farmacocinética e observaram uma coincidência com a LORR, pois animais adultos apresentaram níveis mais elevados de concentração de etanol no sangue que animais adolescentes. Morris et al. (2010) observaram que, em uma escala de intoxicação por etanol, animais adultos sofreram mais dos efeitos descritos que animais adolescentes. Esses achados sugerem que animais jovens se recuperam mais rapidamente da intoxicação por etanol que animais adultos.

Apenas grupos expostos à intoxicação (adolescentes e adultos) apresentaram alguma redução no peso ao final dos ciclos. Porém, os animais recuperaram o peso corpóreo no começo da semana seguinte, quando foram expostos ao protocolo de livre escolha entre duas garrafas novamente. Portanto, a intoxicação reduziu o peso corpóreo dos animais (DIAZ-GRANADOS e GRAHAM, 2007).

Em suma, os principais achados do presente experimento demonstram que a abstinência do consumo de etanol promove aumento no consumo em camundongos adolescentes e adultos. Sucessivas exposições à intoxicação / abstinência levam a potencialização desse efeito em animais adolescentes e adultos. Não foram observadas diferenças no comportamento de consumo entre animais adolescentes e adultos. Porém, animais adultos apresentaram diminuição na concentração de etanol no sangue após o segundo ciclo de intoxicação / abstinência. O aumento no consumo em animais abstinentes, quando o etanol foi oferecido novamente, provavelmente ocorreu devido a neuroadaptações promovidas pelo consumo seguido de abstinência, que aumentou a motivação para o comportamento de consumo. O aumento do consumo em animais expostos à intoxicação / abstinência em comparação a indivíduos expostos ao ar somente, provavelmente é devido a neuroadaptações geradas pela abstinência. Diferenças entre as idades no metabolismo de etanol podem ser explicadas por diferenças na quantidade e atividade das enzimas que metabolizam o etanol.

Discussão Geral

5 DISCUSSÃO GERAL

O objetivo deste trabalho foi caracterizar alterações comportamentais e neuroquímicas promovidas pelo etanol relacionadas à transmissão dopaminérgica e glutamatérgica. As abordagens neuroquímicas relacionadas à neurotransmissão glutamatérgica e dopaminérgica foram, respectivamente: a liberação de glutamato no Núcleo Accumbens e a quantidade de dopamina no Núcleo Accumbens e Caudato Putamen, a quantificação do AMPc no estriado e a atividade da PKA no estriado. Para possibilitar tais quantificações neuroquímicas ocasionadas por neuroadaptações promovidas pelo etanol foi utilizado um protocolo de sensibilização comportamental constituído de tratamento repetido com etanol por 15 dias consecutivos, 5 dias de abstinência e injeção desafio. Esse protocolo também foi utilizado como tratamento prévio de animais adolescentes e adultos no estudo dos efeitos reforçadores do etanol, com o objetivo de avaliar se a exposição prévia ao etanol durante a adolescência pode alterar o comportamento de consumo e o desenvolvimento de preferência condicionada por lugar. As diferentes facetas dos comportamentos induzidos pelo etanol podem ser examinadas usando diferentes modelos animais. O efeito de privação de etanol (EPE), definido como um aumento no consumo absoluto de álcool e na razão de consumo de álcool/consumo total de fluido observado com a reinstalação ao acesso de álcool após um período de abstinência, tem sido usado como modelo de fissura e recaída. Neste projeto, estudamos a influência de ciclos de intoxicação seguidos de abstinência no comportamento de consumo em animais adolescentes e adultos.

Observamos diversas diferenças comportamentais e neuroquímicas entre animais adolescentes e adultos em todos os experimentos realizados; atribuímos essas diferenças ao processo de maturação cerebral pelo qual está passando o indivíduo adolescente, conforme explanado na Introdução e argumentado em cada discussão parcial.

Nos experimentos em que os animais foram tratados com 2,0 g/kg de etanol, observamos desenvolvimento de sensibilização comportamental em animais adolescentes e adultos, ou seja, a atividade locomotora apresentou-se significativamente aumentada no último dia de tratamento repetido (trat. 15) em comparação ao primeiro (trat. 1). Nesses experimentos animais adolescentes

apresentaram uma magnitude menor deste fenômeno comparados aos animais adultos.

O tratamento repetido com etanol seguido de abstinência promoveu neuroadaptações diferenciadas em animais adolescentes e adultos na liberação de glutamato no NAcc, quantificada pela técnica de microdiálise, após desafio com etanol para todos os grupos. Enquanto animais adolescentes apresentaram aumento dos níveis de glutamato no Núcleo Accumbens após injeção desafio de etanol, animais adultos apresentaram diminuição. Podemos sugerir que, apesar do etanol em baixas doses antagonizar as propriedades do receptor NMDA, a adaptação do sistema ao tratamento repetido e abstinência promoveu aumento da liberação de glutamato no Núcleo Accumbens em animais adolescentes que receberam injeção desafio de etanol. Podemos sugerir também que as sinapses estão sendo fortalecidas pela ação do glutamato (potencialização a longo prazo, plasticidade) e, portanto, animais adolescentes estão mais vulneráveis às neuroadaptações promovidas pelo etanol apesar de não terem apresentado evidência de sensibilização locomotora. É importante enfatizar que a dependência é considerada uma doença dependente de processos de aprendizagem (HYMAN, 2005). Investigações celulares e moleculares têm revelado semelhanças entre as ações de drogas de abuso e formas de aprendizagem e memória (HYMAN e MALENKA, 2001) e substratos moleculares envolvidos na plasticidade neuronal que permeia a sensibilização e a aprendizagem são a dopamina e o glutamato (HYMAN, 2005; WOLF, 2002).

Foi possível estabelecer uma relação entre sensibilização comportamental e liberação de glutamato no núcleo accumbens. Nossos dados (CARRARA-NASCIMENTO et al., 2011) e os relatos de Kapasova e Szumlinski (2008) reforçam a hipótese da participação do sistema glutamatérgico na sensibilização comportamental ao etanol. Mais especificamente, os estudos mostraram uma relação inversa entre o desenvolvimento da sensibilização induzida pelo etanol e a capacidade de uma injeção desafio de etanol aumentar os níveis extracelulares de glutamato no núcleo accumbens. Considerando-se que a pré-exposição ao etanol durante a adolescência pode promover um aumento no consumo de álcool quando os animais tornam-se adultos, estas descobertas podem ser particularmente relevantes para explicar a maior vulnerabilidade em se desenvolver problemas relacionados a drogas em adultos expostos ao etanol durante a adolescência.

Inclusive, os paradigmas experimentais relacionados ao reforço e recompensa (Preferência Condicionada por Lugar e Auto-Administração) revelaram a vulnerabilidade do indivíduo adolescente à dependência. A exposição prévia desses animais ao etanol, durante a adolescência foi um fator crucial para a manifestação da vulnerabilidade ao consumo de etanol e preferência pelo ambiente pareado com etanol. O grupo de animais que foi tratado repetidamente com etanol na adolescência (J-ET) apresentou desenvolvimento de PCL, o que não aconteceu com o adolescente que não foi tratado previamente com etanol (J-SAL) nem com o grupo de animais adultos, expostos ao etanol previamente (A-ET). Esse achado sugere que a exposição ao álcool na adolescência torna o indivíduo mais propenso à associação de pistas ambientais (contexto) ao efeito do etanol posteriormente. Portanto, a exposição ao etanol na adolescência facilitou o aprendizado associativo (contexto + álcool). Atribuímos esse achado a alterações em substratos neurais relacionados à recompensa induzidos pelo álcool no período da adolescência que, provavelmente, promoveram a facilitação do aprendizado associativo posteriormente. Os dados de preferência pelo etanol no paradigma de livre escolha entre duas garrafas revelaram importante efeito da exposição prévia tardiamente, após um período de abstinência. Apesar do sabor amargo do quinino, animais adolescentes e adultos expostos ao tratamento repetido previamente apresentaram preferência pelo etanol. Além disso, a abstinência promoveu aumento gradual do consumo (g/kg) em indivíduos adolescentes; os que foram tratados previamente com etanol mantiveram consumo aumentado mesmo quando a solução de etanol foi alterada com quinino. Este achado mostra que o indivíduo é vulnerável à recaída quando exposto ao etanol na adolescência.

Finalmente, o efeito de múltiplas intoxicações seguidas de abstinência no consumo de animais adolescentes e adultos foi comparado. A abstinência, por si só, promoveu aumento do consumo em animais adolescentes e adultos, provavelmente porque o etanol restaura os níveis de dopamina no Núcleo Accumbens, e associação dos efeitos do etanol com o alívio dos sintomas de abstinência. Porém as intoxicações seguidas de abstinência exacerbaram ainda mais esse efeito. Esse modelo pode ser útil para estudar o fenômeno do consumo pesado seguido de períodos de abstinência. O indivíduo pode ter este comportamento de consumo porque está tentando deixar o comportamento de beber ou porque bebe ocasionalmente e, nesses momentos faz uso pesado do álcool. Os períodos de

abstinência nesse padrão de consumo podem promover neuroadaptações duradouras, relacionadas à instalação da dependência. Nesse procedimento de inalação de vapor de etanol, utilizando-se animais da linhagem C57 foram observadas diferenças no metabolismo do álcool entre animais adolescentes e adultos. Enquanto na segunda semana de exposição ao vapor animais adultos foram capazes de metabolizar o etanol mais rapidamente que no primeiro ciclo, animais adolescentes não apresentaram essa adaptação, provavelmente relacionada às enzimas que metabolizam o etanol.

O tratamento repetido com etanol seguido de abstinência promoveu neuroadaptações diferenciadas em animais adolescentes e adultos na quantificação em tecido de DA, DOPAC e HVA no NAcc e Caudato Putamen após desafio com etanol para todos os grupos. Os resultados sugerem que, 30 minutos após a injeção desafio de etanol, animais adultos apresentam maiores quantidades de DA, DOPAC e HVA no NAcc e Caudato Putamen. Os resultados mostraram também quantidades reduzidas de DA, DOPAC e HVA no NAcc de animais adultos tratados repetidamente com etanol em comparação aos animais adultos que recebiam tratamento agudo de etanol no dia do desafio. Os resultados sugerem que animais jovens apresentam mais renovação de dopamina que animais adultos, ou seja, existe uma diferença relacionada ao fator idade no metabolismo da dopamina.

O tratamento repetido com etanol seguido de abstinência também promoveu modificações na via AMPc/PKA relacionadas aos fatores idade e tratamento. A quantidade de AMPc no estriado apresentou-se aumentada em animais adolescentes e adultos tratados repetidamente com etanol, porém, em situações experimentais diferenciadas. Em animais adolescentes observou-se aumento de AMPc quando os animais receberam injeção desafio de etanol, após 5 dias de abstinência. Já em animais adultos, o aumento do AMPc foi observado no grupo desafiado com solução salina, ou seja, abstinente de etanol. A literatura carece de achados que possam ser comparados e discutidos juntamente com nossos dados. Porém, devemos considerar que o aumento do AMPc está relacionado a uma série de eventos intracelulares como a ativação da PKA e conseqüente ativação do CREB e transcrição gênica relacionada à neuroadaptações duradouras promovidas por drogas de abuso. Diante disso, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas diferenciadas entre indivíduos adolescentes e adultos são necessárias, assim como o desenvolvimento de fármacos que possam impedir tais neuroadaptações

duradouras em cascatas intracelulares. A atividade da PKA apresentou-se aumentada em animais desafiados com etanol. Observamos que após a injeção de etanol a PKA é ativada e, portanto, pode desencadear cascatas de eventos intracelulares que incluem a ativação do CREB e transcrição gênica.

Esta discussão pode ser finalizada valorizando cada modelo comportamental utilizado no estudo dos efeitos recompensadores do etanol. A quantificação da atividade locomotora (sensibilização comportamental) contribui para o estudo da sensibilização neural, ou seja, neuroadaptações plásticas que levam o indivíduo do uso para o abuso. O modelo de auto-administração e preferência condicionada por lugar permitem ao sujeito experimental um comportamento voluntário de consumo ou busca pelo contexto associado ao etanol, ou seja, estuda-se a busca pela recompensa. O modelo de intoxicação crônica seguida de abstinência e sua influência no consumo constitui num modelo importante nos padrões de consumo de indivíduos dependentes. A literatura ainda carece de estudos com indivíduos adolescentes nesses modelos.

Esse trabalho abordou também importantes quantificações neuroquímicas que também carecem de estudos com animais adolescentes, como a quantificação dos neurotransmissores dopamina e glutamato em importantes estruturas cerebrais relacionadas ao desenvolvimento de dependência, e dos segundos mensageiros AMPc e atividade da PKA.

Como demonstrado em nossos resultados, o animal adolescente apresenta: desenvolvimento de sensibilização comportamental ao etanol; aumento dos níveis de glutamato e renovação aumentada de dopamina no Núcleo Accumbens quando recebe injeção desafio de etanol; aumento na quantidade de AMPc e atividade da PKA no estriado quando recebe injeção desafio de etanol (após abstinência); preferência por consumir etanol se foi exposto ao etanol na adolescência, mesmo se a solução apresentar sabor amargo; vulnerabilidade para aumentar o consumo de etanol após a abstinência; o indivíduo mantém o consumo elevado mesmo após adulteração do sabor se tiver sido exposto ao etanol previamente, na adolescência; apresenta preferência pelo compartimento associado aos efeitos recompensadores do etanol se foi previamente exposto, na adolescência; apresenta aumento do consumo na abstinência e aumento ainda mais exacerbado se exposto a um protocolo de sucessivas intoxicações seguidas de abstinência.

Esses dados são argumentos mais que justificáveis para empenho na pesquisa de dependência ao etanol em indivíduos adolescentes. A elucidação de aspectos mecanicísticos característicos desse período do desenvolvimento contribuem para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas - farmacológicas ou não. Afinal, quanto mais cedo o indivíduo inicia o uso, maiores as chances de progredir para o abuso posteriormente.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- ✓ Camundongos Swiss machos, adolescentes e adultos desenvolvem sensibilização comportamental na dose de 2,0 g/kg de etanol. Porém, o adolescente apresenta fenômeno menos exacerbado que o animal adulto.
- ✓ Na dose de 1,8 g/kg de etanol camundongos adultos apresentam desenvolvimento de sensibilização comportamental e camundongos adolescentes não apresentam evidência de sensibilização comportamental.
- ✓ Diferenças no desenvolvimento de sensibilização comportamental ao etanol por animais adolescentes e adultos não estão relacionadas à diferenças no metabolismo de etanol.
- ✓ Diferenças entre as idades estudadas na quantidade de glutamato liberada no Núcleo Accumbens não estão relacionadas à diferenças no metabolismo de etanol.
- ✓ Animais adolescentes e adultos apresentam diferenças na resposta glutamatérgica ao tratamento repetido com etanol.
- ✓ Animais adolescentes são mais vulneráveis às neuroadaptações promovidas pelo etanol devido ao aumento da liberação de glutamato no Núcleo Accumbens.
- ✓ A dopamina e seus metabólitos estão presentes em maior quantidade em animais adultos tratados repetidamente com etano e que receberam injeção desafio de etanol e em animais adultos tratados agudamente com etanol no Núcleo Accumbens e Caudato Putamen.
- ✓ No Núcleo Accumbens, animais adultos tratados repetidamente com etanol e que receberam injeção desafio de etanol apresentam níveis reduzidos de dopamina e seus metabólitos em comparação a animais adultos tratados agudamente com etanol.
- ✓ Animais adolescentes apresentam maior renovação da dopamina, ou seja, existem diferenças relacionadas à idade no metabolismo da dopamina.
- ✓ No animal adolescente tratado repetidamente com etanol o desafio com etanol após abstinência promove aumento de AMPc no estriado.
- ✓ No animal adulto tratado repetidamente com etanol a abstinência promove aumento de AMPc.
- ✓ A PKA é ativada após injeção desafio de etanol.

- ✓ A exposição ao etanol no período da adolescência torna o indivíduo vulnerável à associação de pistas ambientais ao efeito recompensador do etanol.
- ✓ A exposição prévia ao etanol promove preferência pela solução de etanol num protocolo de livre escolha entre duas garrafas em animais adolescentes e adultos.
- ✓ A abstinência torna o indivíduo adolescente vulnerável à recaída; animais adolescentes, expostos ou não ao etanol previamente, apresentam consumo aumentado (g/kg) quando o etanol é oferecido novamente.
- ✓ O consumo de etanol se mantém elevado pelo animal exposto ao etanol na adolescência após abstinência, mesmo com a adulteração do sabor com quinino, mostrando que a exposição prévia na adolescência pode promover consumo pesado de etanol posteriormente.
- ✓ A abstinência do consumo promove aumento da quantidade de etanol consumida; múltiplas intoxicações seguidas de abstinência promovem consumo ainda mais elevado.
- ✓ Animais adultos metabolizam o etanol mais rapidamente na segunda exposição à múltiplas intoxicações seguidas de abstinência comparados aos adolescentes.
- ✓ Em conclusão, as diferenças comportamentais e neuroquímicas observadas nestes estudos em animais tratados com etanol durante a adolescência, comparados aos adultos, podem ser determinantes para explicar a maior vulnerabilidade dos adolescentes à dependência.

Referências

REFERÊNCIAS*

ADDOLORATO, G. Effectiveness and safety of baclofen for maintenance of alcohol abstinence in alcohol-dependent patients with liver cirrhosis: randomised, double-blind controlled study. **Lancet** v. 370, p. 1915-1922, 2007.

ADINOFF, B. Neurobiologic processes in drug reward and addiction. **Harv Rev Psychiatry** v. 12, p. 305–320, 2004.

AGMO, A. ; MARROQUIN, E. Role of gustatory and post-ingestive actions of sweeteners in the generation of positive affect as evaluated by place preference conditioning. **Appetite** v. 29, p. 269-289, 1997.

AHLENIUS, S. et al. Antagonism by alpha methyltyrosine of the ethanol-induced stimulation and euphoria in man. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 14, p. 586-91, 1973.

ANAGNOSTARAS, S.G.; ROBINSON, T.E. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. **Behav. Neurosci.** v. 110, p. 1397-414 1996.

ANDERSEN, S. L. et al. Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. **Synapse** v. 37 p. 167–169, 2000.

ANDERSEN, S.L. Changes in the second messenger cyclic AMP during development may underlie motoric symptoms in attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Behav. Brain. Res.** v. 130, p. 197–201, 2002.

ANTELMAN, S.M. et al. Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. **Science** v. 207, p. 329–331, 1980.

ARIAS, C. et al. Ethanol induces locomotor activating effects in preweanling Sprague-Dawley rats. **Alcohol** v. 43, p. 13-23; 2009.

BÄCKSTRÖM P; HYYTIA P. Ionotropic glutamate receptor modulate cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 28, p. 558–565, 2004.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002
BADANICH, K. A.; MALDONADO, A. M.; KIRSTEIN, C. L. Chronic ethanol exposure during adolescence increases basal dopamine in the nucleus accumbens septi during adulthood. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 31, p. 895–900, 2007.

BADIANI, A.; BROWMAN, K.E.; ROBINSON, T.E. Influence of novel versus home environments on sensitization to the psychomotor stimulant effects of cocaine and amphetamine. **Brain Res.** v. 674, p. 291-298, 1995.

BADIANI; A., ANAGNOSTARAS; S.G., ROBINSON; T.E. The development of sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine is enhanced in a novel environment. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 117, p. 443-52, 1995.

BADIANI, A. et al. Amphetamine-induced behavior, dopamine release, and c-fos mRNA expression: modulation by environmental novelty. **J. Neurosci.** v. 18, p. 10579-10593, 1998.

BADIANI, A.; OATES, M.M.; ROBINSON, T.E. Modulation of morphine sensitization in the rat by contextual stimuli. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 151, p. 273-82, 2000.

BADIANI, A. et al. Environmental modulation of the response to amphetamine: dissociation between changes in behavior and changes in dopamine and glutamate overflow in the rat striatal complex. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 151, p. 166-74, 2000.

BADIANI, A.; ROBINSON, T.E. Drug-induced neurobehavioral plasticity: the role of environmental context. **Behav. Pharmacol.** v. 15, p. 327-39, 2004.

BAKER, D.A.; et al. Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. **Nat. Neurosci.** v. 6, p. 743-9, 2003.

BARBIER, E. et al. Effects of prenatal and postnatal maternal ethanol on offspring response to alcohol and psychostimulants in long evans rats. **Neuroscience** v. 161, p. 427-40, 2009.

BARBIER, E. et al. Long-term alterations in vulnerability to addiction to drugs of abuse and in brain gene expression after early life ethanol exposure. **Neuropharmacology**. v. 55, p. 1199-211, 2008.

BARDO, M.T.; BEVINS, R.A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? **Psychopharmacology** v. 153, p. 31-43, 2000.

BARDO, M.T.; DONOHEW, R.L.; HARRINGTON, N.G. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. **Behavioral Brain Research** v. 77, p. 23-43, 1996.

BARNES, T. D. et al. Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. **Nature** v. 437, p. 1158-1161, 2005.

BARROT, M. et al. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 99, p. 11435-40, 2002.

BARTZOKIS, G. et al. Age-related changes in frontal and temporal lobe volumes in men: a magnetic resonance imaging study. **Arch. Gen. Psychiatry** v. 58, p. 461–465, 2001.

BEACH, H.D. Morphine addiction in rats. **Can. J. Psychol.** v. 11, p. 104–112, 1957.

BECHARA, A. Neurobiology of decision-making: risk and reward. **Semin Clin Neuropsychiatry** v. 6, p. 205–216; 2001.

BECHARA, A.; DOLAN, S.; HINDES, A. Decision making and addiction. Part II. Myopia for the future or hypersensitivity to reward? **Neuropsychologia** v. 40, p. 1690–705, 2002.

BECK, K. H.; THOMBS, D. L.; SUMMONS, T. G. The social context of drinking scales: Construct validation and relationship to indicants of abuse in an adolescent population. **Addictive Behaviors** v. 18, p. 159–169, 1993.

BECKER, A. et al. Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptor-deficient mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** v. 365 p. 296-302, 2002.

BECKER, H.C.; LOPEZ, M.F. Increased ethanol drinking after repeated chronic ethanol exposure and withdrawal experience in C57BL/6 mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 28, p. 1829-38, 2004.

BELL, R.L. et al. The alcohol preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking. **Addict. Biol.** v. 11, p. 270–288, 2006.

BENAVIDES, D.R.; BIBB, J.A. Role of Cdk5 in drug abuse and plasticity. **Ann N Y Acad. Sci.** v. 1025, p. 335-44, 2004.

BENINGER, R.J.; NAKONECHNY, P.L.; SAVINA, I. cAMP-dependent protein kinase and reward-related learning: intraaccumbens Rp-cAMPS blocks amphetamine produced place conditioning in rats. **Psychopharmacology (Berl.)** v. 170, p. 23–32, 2003.

BERRIDGE, K.C.; ROBINSON, T.E. Parsing reward. **Trends in Neurosciences** v. 26, p. 507–513, 2003.

BERRIDGE, K.C.; ROBINSON, T.E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Res. Rev.** v. 28, p. 309–69, 1998.

BIBB, J.A. et al. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. **Nature** v. 402, p. 669-71, 1999.

BLAHA, C.D. et al. Stimulation of the ventral subiculum of the hippocampus evokes glutamate receptor-mediated changes in dopamine efflux in the rat nucleus accumbens. **Eur. J. Neurosci.** v. 9, p. 902-11, 1997.

BLAKEMORE, S. J. The social brain in adolescence. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 9, p. 267–277, 2008.

BLEDNOV, Y.A. et al. Hybrid C57BL/6J x FVB/NJ mice drink more alcohol than do C57BL/6J mice. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 29, p. 1949-58, 2005.

BLEDNOV, Y.A. et al. Mice lacking metabotropic glutamate receptor 4 do not show the motor stimulatory effect of ethanol. **Alcohol** v. 34, p. 251-9, 2004.

BOLANOS, C. A. et al. Effects of the kappa-opioid receptor agonist U 50 488 on morphine-induced place preference conditioning in the developing rat. **Eur. J. Pharmacol.** v. 317, p. 1-8, 1996.

BOLLA, K.I.; CADET, J.L.; LONDON, E.D. The neuropsychiatry of chronic cocaine abuse. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.** v. 10, p. 280–89, 1998.

BOUDREAU, A.C.; WOLF, M.E. Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. **J. Neurosci.** v. 25, p. 9144-51, 2005.

BOURGEOIS, J. P.; GOLDMAN-RAKIC, P. S.; RAKIC, P. Synaptogenesis in the prefrontal cortex of rhesus monkeys. **Cereb. Cortex** v. 4, p. 78–96, 1994.

BOYCE-RUSTAY, J.M.; HOLMES, A. Ethanol-related behaviors in mice lacking the NMDA receptor NR2A subunit. **Psychopharmacology (Berl)** v. 187, p. 455-66, 2006.

BRANDON, E. P.; IDZERDA, R. L.; McKNIGHT, G. S. PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection. **Curr. Opin. Neurobiol.** v. 7, p. 397– 403, 1997.

BREESE, G. R. et al. Ethanol-induced locomotor stimulation in rats after thyrotropin-releasing hormone. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 229, p. 731-737, 1984.

BROADBENT, J.; KAMPMUELLER, K.M.; KOONSE, S.A. Expression of behavioral sensitization to ethanol by DBA/2J mice: the role of NMDA and non-NMDA glutamate receptors. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 167, p. 225-34, 2003.

BRODIE, M.S. Increased ethanol excitation of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area after chronic ethanol treatment. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 26, p. 1024-30, 2002.

BROWN, S. A.; TAPERT, S. F. Adolescence and the trajectory of alcohol use: basic to clinical studies. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1021, p. 234–244, 2004.

BROWN, S.A. et al. Neurocognitive functioning of adolescents: effects of protracted alcohol use. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 24, p. 164-171, 2000.

BROWN, Z.W.; AMIT, Z. The effects of selective catecholamine depletions by 6-hydroxydopamine on ethanol preference in rats. **Neurosci. Lett.** v. 5, p. 333-6, 1977.

BUDYGIN, E.A. et al. Chronic ethanol exposure alters presynaptic dopamine function in the striatum of monkeys: a preliminary study. **Synapse** v. 50, p. 266–268, 2003.

BUDYGIN, E.A. et al. Effects of chronic alcohol exposure on dopamine uptake in rat nucleus accumbens and caudate putamen. **Psychopharmacology (Berl)** v. 193, p. 495-501, 2007.

CALABRESI, P. et al. Long-term potentiation in the striatum is unmasked by removing the voltage-dependent magnesium block of NMDA receptor channels. **Eur. J. Neurosci.** v. 4, p. 929 –935, 1992.

CALCAGNETTI, D. J.; SCHECHTER, M. D. Reducing the time needed to conduct conditioned place preference testing. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry** v. 16, p. 969-976, 1992a.

CALCAGNETTI, D. J.; SCHECHTER, M. D. Place conditioning reveals the rewarding aspect of social interaction in juvenile rats. **Physiol. Behav.** v. 51, p. 667-672, 1992b.

CAMARINI, R. et al. MK-801 blocks the development of behavioral sensitization to the ethanol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 24, p. 285-90, 2000.

CAMARINI, R.; HODGE, C.W. Ethanol preexposure increases ethanol self-administration in C57BL/6J and DBA/2J mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 79, p. 623-32, 2004.

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, p. 303-309, 2000.

CAMARINI, R. et al. Effects of adolescent exposure to cocaine on locomotor activity and extracellular dopamine and glutamate levels in nucleus accumbens of DBA/2J mice. **Brain. Res.** v. 1193; p. 34-42, 2008.

CAMPBELL, A. D.; KOHL, R.R.; McBRIDE, W.J. Serotonin-3 receptor and ethanol stimulated somatodendritic dopamine release. **Alcohol** v. 13, p. 569–574, 1996.

CAPRILES, N. et al. A role for the prefrontal cortex in stress- and cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 168, p. 66-74, 2003.

CAPRIOLI, D. et al. Modeling the role of environment in addiction. **Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. v. 31, p. 1639-53, 2007.

CARLEZON, W.A. Jr; WISE, R.A. Microinjections of phencyclidine (PCP) and related drugs into nucleus accumbens shell potentiate medial forebrain bundle brain stimulation reward. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 128, p. 413-20, 1996.

CARLSSON, A. et al. Suppression by dopamine-agonists of the ethanol-induced stimulation of locomotor activity and brain dopamine synthesis. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** v. 283, p. 117-28, 1974.

CARLSSON, A.; ENGEL, J.; SVENSSON, T.H. Inhibition of ethanol-induced excitation in mice and rats by -methyl-p-tyrosine. **Psychopharmacologia** v. 26, p. 307-12, 1972.

CARPENTER-HYLAND, E. P.; CHANDLER, J. L. Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: Implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 86, p. 200–208, 2007.

CARR, G.D.; WHITE, N.M. Anatomical disassociation of amphetamine's rewarding AND aversive effects: an intracranial microinjection study. **Psychopharmacology** v. 89, p. 340-346, 1986.

CARR, G.D.; WHITE, N.M. Conditioned place preference from intra-accumbens but not intra-caudate amphetamine injections. **Life Sci.** v. 33, p. 2551–2557, 1983.

CARRARA-NASCIMENTO, P. F. et al. Changes in extracellular levels of glutamate in the nucleus accumbens after ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent and adult mice. **Alcohol** v. 45, p.451-460, 2011.

CARROLL, M. E.; MEISCH, R. A. Etonitazene as a reinforcer: oral intake of etonitazene by rhesus monkeys. **Psychopharmacology (Berlin)** v. 59, p. 225– 229, 1978.

CARROLL, M. E.; MEISCH, R. A. Oral phencyclidine (PCP) self-administration in rhesus monkeys: effects of feeding conditions. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 214, p. 339–346, 1980.

CASEY, B.J. et al. A developmental fMRI study of prefrontal organization. **Neuroimage** v. 7, p. S512, 1998.

CASEY, B.J. et al. A developmental functional MRI study of prefrontal activation during performance of a go–no-go task. **J. Cogn. Neurosci.** v. 9, p. 835–847, 1997.

CASEY, B.J.; GIEDD, J.N.; THOMAS, K.M. Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. **Biol. Psychol.** v. 54, p. 241-57, 2000.

CASTNER, S. A.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Long-lasting psychotomimetic consequences of repeated low-dose amphetamine exposure in rhesus monkeys, **Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. 10–28, 1999.

CATLOW, B.J.; KIRSTEIN, C.L. Heightened cocaine-induced locomotor activity in adolescent compared to adult female rats. **J. Psychopharmacol.** v. 19, p. 443-7, 2005.

CERVO, L. et al. Protein kinases A and C are involved in the mechanisms underlying consolidation of cocaine place conditioning. **Brain Res.** v. 775, p. 30–36, 1997.

CHAMBERS, R. A.; TAYLOR, J. R.; POTENZA, M. N. Developmental Neurocircuitry of Motivation in Adolescence: A Critical Period of Addiction Vulnerability. **Am. J. Psychiatry** v. 160, p. 1041–1052, 2003.

CHARNESS, M.E.; QUERIMIT, L.A.; HENTLEFF, M. Ethanol differentially regulates G proteins in neural cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 155, p. 138–143, 1988.

CHARTOFF, E.H. et al. Dopamine-dependent increases in phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) during precipitated morphine withdrawal in primary cultures of rat striatum. **J. Neurochem.** v. 87, p. 107–118, 2003.

CHESTER, J.A.; CUNNINGHAM, C.L. GABA(A) receptors modulate ethanol-induced conditioned place preference and taste aversion in mice. **Psychopharmacology (Berl)** v. 144, p. 363-72, 1999.

CHILDRESS, A.R. et al. Limbic activation during cue-induced cocaine craving. **Am. J. Psychiatry** v. 156, p. 11–18, 1999.

CHOI, K.H. et al. Antisense-induced reduction in nucleus accumbens cyclic AMP response element binding protein attenuates cocaine reinforcement. **Neuroscience** v. 137, p. 373-83, 2006.

CHUNG, C.S. et al. Severity of alcohol withdrawal symptoms depends on developmental stage of Long-Evans rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 89, p. 137-44, 2008.

COE, I. R. et al. Activation of cyclic AMP-dependent protein kinase reverses tolerance of a nucleoside transporter to ethanol. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 276, p. 365-369, 1996.

COLBY, C.R. et al. Striatal cell type specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. **J. Neurosci.** v. 23; p. 2488-93, 2003.

CONSTANTINESCU, A.; DIAMOND, I.; GORDON, A.S. Ethanol-induced translocation of cAMP-dependent protein kinase to the nucleus: mechanism and functional consequences. **J. Biol. Chem.** v. 274; p. 26985–26991, 1999.

COOPER, D.M. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. **Biochem. J.** v. 375, p. 517–529, 2003.

COOPER, D.M. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. **Biochem. J.** v. 375, p. 517–529, 2003.

CORNISH, J.L.; KALIVAS, P.W. Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. **J. Neurosci.** v. 20, p. RC89, 2000.

COWEN, M.S.; KRSTEW, E.; LAWRENCE, A.J. Assessing appetitive and consummatory phases of ethanol self-administration in C57BL/6J mice under operant conditions: regulation by mGlu5 receptor antagonism. **Psychopharmacology (Berl)** v. 190, p. 21-9, 2007.

CREWS, F. T.; BOETTIGER, C. A. Impulsivity, frontal lobes and risk for addiction. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 93, p. 237–247, 2009.

CREWS, F.T. et al. Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 24, p.1712–23, 2000.

CUNNINGHAM, C. L.; PRATHER, L. K. Conditioning trial duration affects ethanol induced conditioned place preference in mice. **Anim. Learn. Behav.** v. 20, p. 187–94, 1992.

CUNNINGHAM, C. L. Localization of genes influencing ethanol-induced conditioned place preference ; locomotor activity in BXD recombinant inbred mice. **Psychopharmacology** v. 120, p. 28–41, 1995.

CUNNINGHAM, C. L.; DICKINSON, S. D.; OKORN, D. M. Naloxone facilitates extinction but does not affect acquisition or expression of ethanol-induced conditioned place preference. **Exp. Clin. Psychopharmacol.** v. 3, p. 330– 43, 1995.

CUNNINGHAM, C. L.; OKORN, D. M.; HOWARD, C. E. Interstimulus interval determines whether ethanol produces conditioned place preference or aversion in mice. **Anim. Learn. Behav.** v. 25, p. 31– 42, 1997.

CUNNINGHAM, C. L.; HENDERSON C. M.; BORMANN, N. M. Extinction of ethanol induced conditioned place preference and conditioned place aversion: effects of naloxone. **Psychopharmacology** v. 139, p. 62– 70, 1998.

CUNNINGHAM, C. L. et al. Genetic differences in cocaine-induced conditioned place preference in mice depend on conditioning trial duration. **Psychopharmacology** v. 146, p. 73–80, 1999.

CUNNINGHAM, C. L., et al. Ethanol-conditioned place preference is reduced in dopamine D2 receptor-deficient mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 67, p. 693-699, 2000.

CUNNINGHAM, C. L.; HENDERSON, C. M. Ethanol-induced conditioned place aversion in mice. **Behav. Pharmacol.** v. 11, p. 591– 602, 2000.

CUNNINGHAM, C. L.; CLEMANS, J. M.; FIDLER, T. L. Injection timing determines whether intragastric ethanol produces conditioned place preference or aversion in mice **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 72, p. 659–6, 2002.

CUNNINGHAM, C.L.et al. 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. **Psychopharmacology** v. 160, p. 414–424, 2002.

CUNNINGHAM, C. L.; FERREE, N. K.; HOWARD, M.A. Apparatus bias and place conditioning with ethanol in mice. **Psychopharmacology** v. 170, p. 409–422, 2003.

CUNNINGHAM, C. L.; GREMEL, C. M.; GROBLEWSKI, P.A. Drug-induced conditioned place preference ; aversion in mice. **Nature Protocols** v. 1, p. 1662-1670, 2006.

DAHCHOUR, A. et al. Effects of ethanol on extracellular amino acid levels in high-and low-alcohol sensitive rats: a microdialysis study. **Alcohol. Alcohol.** v. 35, p. 548-53, 2000.

DAHCHOUR, A.; DE WITTE, P. Effects of acamprosate on excitatory amino acids during multiple ethanol withdrawal periods. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 27, p. 465-70, 2003.

DANIELS, G.M.; BUCK, K.J. Expression profiling identifies strain-specific changes associated with ethanol withdrawal in mice. **Genes Brain Behav.** v. 1, p. 35-45, 2002.

DARSTEIN, M. et al. Release and accumulation of neurotransmitters in the rat brain: acute effects of ethanol in vitro and effects of long-term voluntary ethanol intake. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 22, p. 704-9, 1998.

DAVIDSON, R.J.; JACKSON, D.C.; KALIN, N.H. Emotion, plasticity, context, and regulation: perspectives from affective neuroscience. **Psychol. Bull.** v. 126, p. 890–909, 2000.

de ARAUJO, N.P. et al. Ethanol-induced behavioral sensitization is associated with dopamine receptor changes in the mouse olfactory tubercle. **Physiol. Behav.** v. 96, p. 12-7, 2009.

DE BELLIS, M.D. et al. Hippocampal volume in adolescent-onset alcohol use disorders. **Am. J. Psychiatry** v. 157, p. 737–744, 2000.

DE BELLIS, M.D. et al. Prefrontal cortex, thalamus, and cerebellar volumes in adolescents and young adults with adolescent-onset alcohol use disorders and comorbid mental disorders. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 29, p. 1590–1600, 2005.

DE VRIES, T.J. et al. Drug induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. **Eur. J. Neurosci.** v. 10, p. 3565-71, 1998.

DE VRIES, T.J. et al. Relapse to cocaine- and heroin-seeking behavior mediated by dopamine D2 receptors is time-dependent and associated with behavioral sensitization. **Neuropsychopharmacology** v. 26, p. 18-26, 2002.

DEROCHE, V.; LE MOAL. M.; PIAZZA, P.V. Cocaine self-administration increases the incentive motivational properties of the drug in rats. **Eur. J. Neurosci.** v. 11, p. 2731-6, 1999.

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. USA** v. 85, p. 5274–5278, 1988.

Di CHIARA, G. Cortical and limbic dopamine (on opiate addiction): do not mix before use! **Trends Pharmacol. Sci.** v. 18, p. 77-8, 1997a.

DI CHIARA G. Alcohol and dopamine. **Alcohol Health. Res. World** v. 21, p. 108-14, 1997b.

Di CHIARA, G. A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. **J. Psychopharmacol.** v. 12, p. 54-67, 1998.

DI CIANO, P.; EVERITT, B.J. Direct interactions between the basolateral amygdala and nucleus accumbens core underlie cocaine-seeking behavior by rats. **J. Neurosci.** v. 24, p. 7167-73, 2004.

DI CIANO, P.; EVERITT, B.J. Dissociable effects of antagonism of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens core and shell on cocaine-seeking behavior. **Neuropsychopharmacology.** v. 25, p. 341-60, 2001.

DIAMOND, I.; GORDON, A.S. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. **Physiol. Rev/** v. 77, p. 1-20, 1997.

DIAZ-GRANADOS, J.L.; GRAHAM, D.L. The effects of continuous and intermittent ethanol exposure in adolescence of the aversive properties of ethanol during adulthood. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 31, p. 2020-2027, 2007.

DICKINSON, S.D. et al. Dopamine D2 receptor deficient mice exhibit decreased dopamine transporter function but no changes in dopamine release in dorsal striatum. **J. Neurochem.** v. 72, p. 148–156, 1999.

DICKINSON, S.D. et al. Lack of effect of dopamine receptor blockade on expression of ethanol-induced conditioned place preference in mice. **Psychopharmacology (Berl)** v. 165, p. 238-44, 2003.

DINOPOULOS; A., DORI; I., PARNAVELAS; J.G. The serotonin innervation of the basal forebrain shows a transient phase during development. **Brain Research: Developmental Brain Research** v. 99, p. 38–52, 1997.

DJOUMA, E.; LAWRENCE, A.J. The effect of chronic ethanol consumption and withdrawal on mu-opioid and dopamine D(1) and D(2) receptor density in Fawn-Hooded rat brain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 302, p. 551–559, 2002.

DOHRMAN, D.P.; DIAMOND, I.; GORDON, A.S. Ethanol causes translocation of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit to the nucleus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 93, p. 10217–10221, 1996.

DONG, Y.N.; WAXMAN, E.A.; LYNCH, D.R. Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor. **J. Neurosci.** v. 24, p. 11035-45, 2004.

DOREMUS, T. L. et al. Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 75, p. 411–418, 2003.

DOREMUS-FITZWATER, T.L.; VARLINSKAYA, E.I.; ; SPEAR, L. P. Impact of repeated stress on responsivity to ethanol induced changes in social behavior in adolescent and adult rats. **Poster Presented at the Annual Meeting of the Society for Neuroscience**, San Diego, CA., 2007.

DRASKI, L. J.; BICE, P. J.; DEITRICH, R. A. Developmental alterations of ethanol sensitivity in selectively bred high and low alcohol sensitive rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 70, p. 387–396, 2001.

DUDMAN, J.T. et al. Dopamine D1 receptors mediate CREB phosphorylation via phosphorylation of the NMDA receptor at Ser897-NR1. **J. Neurochem.** v. 87, p. 922-34, 2003.

DYR, W. et al. Effects of D1 and D2 dopamine receptor agents on ethanol consumption in the high-alcohol-drinking (HAD) line of rats. **Alcohol** v. 10, p. 207–212, 1993.

ECKARDT, M.J. et al. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 22, p. 998-1040, 1998.

EDWARDS, S. et al. Region-specific tolerance to cocaine-regulated cAMP-dependent protein phosphorylation following chronic self-administration. **Eur. J. Neurosci.** v. 25, p. 2201-13, 2007.

ENGBLOM, D. et al. Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. **Neuron.** v. 59, p. 497-508, 2008.

EVANS, G.J.; A. MORGAN. Regulation of the exocytotic machinery by cAMP dependent protein kinase: implications for presynaptic plasticity. **Biochem. Soc. Trans.** v. 31, p. 824–827, 2003.

EVERITT, B.J.; ROBBINS, T.W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature Neuroscience** v. 8, p. 1481–1489, 2005.

EVERITT, B.J.; WOLF, M.E. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. **Journal of Neuroscience** v. 22, p. 3312–3320, 2002.

FACHIN-SCHEIT, D.J.; et al. Development of a mouse model of ethanol addiction: naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. **J. Neural. Transm.** v. 113, p. 1305-21, 2006.

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

FARIA, R.R. et al. Environmental modulation of ethanol-induced locomotor activity: Correlation with neuronal activity in distinct brain regions of adolescent and adult Swiss mice. **Brain Research** v. 1239, p. 127–140, 2008.

FIELDS, R.D., STEVENS-GRAHAM, B. New insights into neuron-glia communication. **Science** v. 298, p. 556–562, 2002.

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.

FINK, J.S. et al. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. **Brain Res Mol. Brain Res.** v. 14, p. 186–195, 1992.

FINLAY, J.M.; ZIGMOND, M.J. The effects of stress on central dopaminergic neurons: possible clinical implications. **Neurochemical Research** v. 22, p. 1387–1394, 1997.

FINN, D.A. et al. Increased drinking during withdrawal from intermittent ethanol exposure is blocked by the CRF receptor antagonist D-Phe-CRF(12-41). **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 31, p. 939-49, 2007.

FRANK, D.A.; GREENBERG, M.E. CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. **Cell.** v. 79, p. 5-8, 1994.

FRANTZ; K.; VAN HARTESVELDT, C. Locomotion elicited by MK801 in developing and adult rats: temporal, environmental, and gender effects. **Eur. J. Pharmacol.** v. 369, p. 145–157, 1999a

FRANTZ, K.; VAN HARTESVELDT, C. The locomotor effects of MK801 in the nucleus accumbens of developing and adult rats. **Eur. J. Pharmacol.** v. 368, p. 125–135, 1999b.

FRIDE, E.; MECHOULAM, R. Developmental aspects of anandamide: ontogeny of response and prenatal exposure. **Psychoneuroendocrinology** v. 21, p. 157–172, 1996a.

FRIDE, E.; MECHOULAM, R. Ontogenetic development of the response to anandamide and delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. **Brain Research: Developmental Brain Research** v. 95, p. 131–134, 1996b.

FRYE, G.D.; BREESE, G.R. An evaluation of the locomotor stimulating action of ethanol in rats and mice. **Psychopharmacology (Berl)** v. 75, p. 372-9, 1981.

FUCHS; R.A. et al. Differential involvement of the core and shell subregions of the nucleus accumbens in conditioned cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. **Psychopharmacology (Berl)** v. 176, p. 459-65, 2004.

FUNK, C.K. et al. Corticotropin-releasing factor within the central nucleus of the amygdala mediates enhanced ethanol self-administration in withdrawn, ethanol-dependent rats. **J. Neurosci.** v. 26, p. 11324-32; 2006.

GABBOTT, P.L.A. et al. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. **J. Comp. Neurol.** v. 492, p. 145–77, 2005.

GASS, J.T.; OLIVE, M.F. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. **Biochem. Pharmacol.** v. 75, p. 218–265, 2008.

GERDEMAN, G.L. et al. It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. **Trends in Neuroscience** v. 26, p. 184–192, 2003.

GESSA, G.L. et al. Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. **Brain Res.** v. 348, p. 201–203, 1985.

GIEDD, J.N. et al. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. **Nat. Neurosci.** v. 2, p. 861-3, 1999.

GIEDD; J.N. et al. Anatomical brain magnetic resonance imaging of typically developing children and adolescents. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.** v. 48, p. 465-70, 2009.

GILMAN AG. A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 67, p. 305-12, 1970.

GIORGETTI, M. et al. Amphetamine-induced plasticity of AMPA receptors in the ventral tegmental area: effects on extracellular levels of dopamine and glutamate in freely moving rats. **J. Neurosci.** v. 21, p. 6362-9, 2001.

GLAZEWSKI, S. et al. Impaired experience-dependent plasticity in barrel cortex of mice lacking the alpha and delta isoforms of CREB. **Cereb. Cortex.** v. 9, p. 249-56, 1999.

GOGTAY, N. et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 101, p. 8174-9, 2004.

GORDON, A. S.; COLLIER, K.; DIAMOND, I. Proc. Natl. Acad. Ethanol regulation of adenosine receptor-stimulated cAMP levels in a clonal neural cell line: an in vitro model of cellular tolerance to ethanol. **Sci. USA** v. 83, p. 2105-2108, 1986.

GOULD, E.; WOOLF, N.J.; BUTCHER, L.L. Postnatal development of cholinergic neurons in the rat: I. Forebrain. **Brain Res. Bull.** v. 27, p. 767–89, 1991.

GRACE, A.A. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. **Addiction** v. 95, p. S119–S128; 2000.

GRANT, B. F.; DAWSON, D. A. Age at onset of alcohol use and its association with DSM-IV alcohol abuse ; dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. **J. Subst. Abuse** v. 9, p. 103–110, 1997.

GREMEL, C.M.; CUNNINGHAM, C.L. Involvement of amygdala dopamine and nucleus accumbens NMDA receptors in ethanol-seeking behavior in mice. **Neuropsychopharmacology** v. 34, p. 1443-53, 2009.

GREMEL, C.M.; CUNNINGHAM, C.L. Roles of the nucleus accumbens and amygdala in the acquisition and expression of ethanol-conditioned behavior in mice. **J. Neurosci.** v. 28, p. 1076-84, 2008.

GREMEL, C.M.; YOUNG, E.A.; CUNNINGHAM, C.L. Blockade of opioid receptors in anterior cingulate cortex disrupts ethanol-seeking behavior in mice. **Behav. Brain Res.** v. 219, p. 358-62, 2011.

GRIFFIN; W.C. 3rd; MIDDAUGH, L.D.; BECKER, H.C. Voluntary ethanol drinking in mice and ethanol concentrations in the nucleus accumbens. **Brain Res.** v. 1138, p. 208–13, 2007.

GROENEWEGER, H. J.; WRIGHT, C. I.; BEIJER, V. J. The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? **Prog. Brain Res.** v. 107, p. 485–551, 1996.

GROENEWEGER, H.J. et al. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. **Ann. NY Acad. Sci.** v. 877, p. 49–63, 1999.

GUERRI, C.; BAZINET, A.; RILEY, E.P. Foetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. **Alcohol Alcohol.** v. 44, p. 108–14, 2009.

GUILARTE, T. R.; McGLOTHAN, J. L. Hippocampal NMDA receptor mRNA undergoes subunit specific changes during developmental lead exposure. **Brain Res.** v. 790, p. 98–107, 1998.

GURDEN, H.; TASSIN, J.P.; JAY, T.M., Integrity of mesocortical dopaminergic system is necessary for complete expression of in vivo hippocampal–prefrontal cortex long-term potentiation. **Neuroscience** v. 94, p. 1019–1027, 1999.

HABER, S.N.; McFARLAND, N.R.; The concept of the ventral striatum in non-human primates. **Annals of New York Academy of Sciences** v. 877, p. 33–48, 1999.

HARRIS, G.C. et al. Glutamate-associated plasticity in the ventral tegmental area is necessary for conditioning environmental stimuli with morphine. **Neuroscience** v. 129, p. 841–847, 2004.

HARRIS, J. R. Where is the child's environment? A group socialization theory of development. **Psychological Review** v. 102, p. 458–489, 1995.

HARRIS, R.A. Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 23, p. 1563–1570, 1999.

HASSAN, S. et al. Pharmacogenomic analysis of mechanisms mediating ethanol regulation of dopamine beta-hydroxylase. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 38860-9, 2003.

HE, J.; CREWS, F. T. Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**: v. 86, p. 327-333, 2007.

HEFNER, K.; HOLMES, A. An investigation of the behavioral actions of ethanol across adolescence in mice. **Psychopharmacology** v. 191, p. 311–322, 2007.

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

HEYDER, K.; SUCHAN, B.; DAUM, I. Cortico-subcortical contributions to executive control. **Acta Psychol. (Amst)**. v. 115, p. 271-89, 2004.

HODGE, C.W. et al. The mGluR5 antagonist MPEP selectively inhibits the onset and maintenance of ethanol self-administration in C57BL/6J mice. **Psychopharmacology (Berl)** v. 183, p. 429–438, 2006.

HODGE, C.W.; CHAPPELLE, A.M.; SAMSON, H.H. GABAergic transmission in the nucleus accumbens is involved in the termination of ethanol self-administration in rats. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 19, p. 1486-93, 1995.

HODGE, C.W.; SAMSON, H.H.; CHAPPELLE, A.M. Alcohol self-administration: further examination of the role of dopamine receptors in the nucleus accumbens. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 21, p. 1083-91, 1997.

HOFFMAN, P.L. et al. Ethanol and the NMDA receptor. **Alcohol.** v. 7, p. 229-31, 1990.

HORGER, B.A.; et al. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. **J. Neurosci.** v. 19, p. 4110-22, 1999.

HORGER, B.A.; SHELTON, K.; SCHENK, S. Preexposure sensitizes rats to the rewarding effects of cocaine. **Pharmacol Biochem. Behav.** v. 37, p. 707-11, 1990.

HORGER, B.A.; GILES, M.K.; SCHENK, S. Preexposure to amphetamine and nicotine predisposes rats to self-administer a low dose of cocaine. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 107, p. 271-6, 1992.

HOTSENPILLER, G.; GIORGETTI, M.; WOLF, M.E. Alterations in behaviour and glutamate transmission following presentation of stimuli previously associated with cocaine exposure. **Eur. J. Neurosci.** v. 14, p. 1843-55, 2001.

HOWLAND, J.G.; TAEPALARAPRUK, P.; PHILLIPS, A.G. Glutamate receptor-dependent modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens by basolateral, but not central, nucleus of the amygdala in rats. **J. Neurosci.** v. 22, p. 1137-45, 2002.

HURD, Y.L.; HERKENHAM, M. Molecular alterations in the neostriatum of human cocaine addicts. **Synapse** v. 13, p. 357-69, 1993.

HUTTENLOCHER, P.R. Synapse elimination ; plasticity in developing human cerebral cortex. **Am. J. Ment. Defic.** v. 88, p. 488–496, 1984.

HUTTENLOCHER, P.R.; DABHOLKAR, A.S. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. **J. Comp. Neurol.** v. 387, p. 167–178, 1997.

HUTTENLOCHER, P.R.; DE COURTEN, C. The development of synapses in striate cortex of man. **Hum. Neurobiol.** v. 6, p. 1–9, 1987.

HYMAN, S.E. Addiction: A disease of learning and memory. **American Journal of Psychiatry** v. 162, p. 1414–22, 2005.

HYMAN, S.E.; MALENKA, R.C.: Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and persistence. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 2, p. 695–703, 2001.

HYMAN, S.E.; MALENKA, R.C.; NESTLER, E.J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 29, p. 565-98, 2006.

IKEMOTO, S. et al. 6-OHDA-lesions of the nucleus accumbens disrupt the acquisition but not the maintenance of ethanol consumption in the alcohol-preferring P line of rats. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 21, p. 1042-6, 1997.

IMPERATO, A.; DI CHIARA, G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 239, p. 219-28, 1986.

INSEL, T. R.; MILLER, L. P.; GELHARD, R. E. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. **Neuroscience** v. 35, p. 31-43, 1990.

ISHIKAWA, A.; NAKAMURA, S. Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex of the rat. **Journal of Neuroscience** v. 23, p. 9987-9995, 2003.

JENTSCH, J.D.; TAYLOR, J.R. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. **Psychopharmacol.** v. 146, p. 373-90, 1999.

JIN, S.H.; BLENDY, J.A.; THOMAS, S.A. Cyclic AMP response element-binding protein is required for normal maternal nurturing behavior. **Neuroscience.** v. 133, p. 647-55, 2005.

JOHNSON, B.A. Recent advances in the development of treatments for alcohol and cocaine dependence: Focus on topiramate and other modulators of GABA or glutamate function. **CNS Drugs** v. 19, p. 873-896, 2005.

JONES, S.; BONCI, A. Synaptic plasticity and drug addiction. **Curr. Opin. Pharmacol.** v. 5, p. 20–5, 2005.

JONES, S.; KORNBLUM, J.L.; KAUER, J.A. Amphetamine blocks long-term synaptic depression in the ventral tegmental area. **J. Neurosci.** v. 20, p. 5575–80, 2000.

JONES, S.R. et al. Functional and anatomical evidence for different dopamine dynamics in the core and shell of the nucleus accumbens in slices of rat brain. **Synapse** v. 23, p. 224–231, 1996.

JONES, S.R.; GARRIS, P.A.; WIGHTMAN, R.M. Different effects of cocaine and nomifensine on dopamine uptake in the caudate–putamen and nucleus accumbens. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 274, p. 396–403, 1995.

JOSSELYN, S.A. et al. Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. **J. Neurosci.** v. 21, p. 2404–12, 2001.

KALIVAS, P.W. et al. GABAergic and enkephalinergic regulation of locomotion in the ventral pallidum: involvement of the mesolimbic dopamine system. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 295, p. 315–26, 1991.

KALIVAS, P.W. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral segmental area. **Brain Research Reviews** v. 18, p. 75–113, 1993.

KALIVAS, P.W. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. **Nature Reviews** v. 10, p. 561-572, 2009.

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

KALSBEEK, A. et al. Neonatal thermal lesions of the mesolimbocortical dopaminergic projection decrease food-hoarding behavior. **Brain Res.** v. 475, p. 80–90, 1988.

KAMDAR, N.K. et al. Acute effects of naltrexone and GBR 12909 on ethanol drinking-in-the-dark in C57BL/6J mice. **Psychopharmacology (Berl)** v. 192, 207-17, 2007.

KAPASOVA, Z.; SZUMLINSKI, K.K. Strain differences in alcohol-induced neurochemical plasticity: a role for accumbens glutamate in alcohol intake. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 32, p. 617-31, 2008.

KATNER, S.N.; MAGALONG, J.G.; WEISS, F. Reinstatement of alcoholseeking behavior by drug-associated discriminative stimuli after prolonged extinction in the rat. **Neuropsychopharmacology** v. 20, p. 471–479, 1999.

KAUER, J.A.; MALENKA, R.C. Synaptic plasticity and addiction. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 8, p. 844-58, 2007.

KELLEY, A.E. Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to learning and motivation. **Psychobiology** v. 27, p. 198–213, 1999.

KELLEY, A.E. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward related learning. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v. 27, p. 765–776, 2004a.

KELLEY, A.E. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. **Neuron** 44, p. 161-79, 2004b.

KELZ, M.B. et al. Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. **Nature**. v. 401, p. 272-6, 1999.

KERR, J.N.; WICKENS, J.R. Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro. **J. Neurophysiol.** v. 85, p. 117-124, 2001.

KIM, K.S. et al. Mice lacking adenylyl cyclase type 5 (AC5) show increased ethanol consumption and reduced ethanol sensitivity. **Psychopharmacology (Berl)** v. 215, p. 391-8, 2011.

KLEBAUR, J.E. et al. The ability of amphetamine to evoke arc (Arg 3.1) mRNA expression in the caudate, nucleus accumbens and neocortex is modulated by environmental context. **Brain Res.** v. 930, p. 30-6, 2002.

KNUTSON, B. et al. Anticipation of increasing monetary reward selectively recruits nucleus accumbens. **J. Neurosci.** v. 21, p. RC159, 2001.

KOHL, R.R. et al. Ethanol and negative feedback regulation of mesolimbic dopamine release in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 139, p. 79-85, 1998.

KOOL GF. Alcoholism: allostasis and beyond. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 27, p. 232-243, 2003.

KOOL, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. **Science** v. 278, p. 52–58, 1997.

KOOL, G. F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology** v. 24, p. 97–129, 2001.

KOOL, G. F.; LE MOAL, M. Plasticity of reward neurocircuitry ; the 'dark side' of drug addiction. **Nature Neuroscience** v. 8, p. 1442–44, 2005.

KOOL, G. F.; VOLKOW, N.D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology** v. 35, p. 217-38, 2010.

KOOL, G.F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 13, p. 177–184, 1992.

KOSTOVIC I. Structural and histochemical reorganization of the human prefrontal cortex during perinatal and postnatal life. **Prog. Brain Res.** v. 85, p. 223–39. Discussion 239–240, 1990.

KOURRICH, S. et al. Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. **J. Neurosci.** v. 27, p. 7921-8, 2007.

KRYSTAL, J.H. et al. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. **Pharmacol. Ther.** v. 99, p. 79-94, 2003.

LAINÉ, T.P. et al. Dopamine transporter density and novelty seeking among alcoholics. **J. Addict. Dis.** v. 20, p. 91–96, 2001.

LAMBE, E.K.; KRIMER, L.S.; GOLDMAN-RAKIC, P.S. Differential postnatal development of catecholamine and serotonin inputs to identified neurons in prefrontal cortex of rhesus monkey. **J. Neurosci.** v. 20, p. 8780–8787, 2000.

LANIER, L.P.; ISAACSON, R.L. Early developmental changes in the locomotor response to amphetamine and their relation to hippocampal function. **Brain Res.** v. 126, p. 567-75, 1977.

LAVIN, A.; GRACE, A.A. Modulation of dorsal thalamic cell activity by the ventral pallidum: its role in the regulation of thalamocortical activity by the basal ganglia. **Synapse** v. 18, p. 104–127, 1994.

LAVIOLA, G. et al. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. **J Pharmacol. Exp. Ther.** v. 275, p. 345-57, 1995.

LÊ, A.D. et al. Effects of 5-HT₃, D₁ and D₂ receptor antagonists on ethanol- and cocaine-induced locomotion. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 57, p. 325-32, 1997.

LEE, A.M.; MESSING, R.O. Protein kinases and addiction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1141, p. 22-57, 2008.

LEIN, E.S. et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. **Nature** v. 445, p. 168–176, 2007.

LEONARD, A.S.; HELL, J.W. Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 12107-15, 1997.

LEPORE, M. et al. Conditioned place preference induced by delta-9-tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine, and food reward. **Life Sci.** v. 56, p. 2073-2080, 1995.

LESSOV, C.N.; et al. Voluntary ethanol drinking in C57BL/6J and DBA/2J mice before and after sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol. **Psychopharmacology (Berl)** v. 155, p. 91-9, 2001.

LESSOV, C.N.; PHILLIPS, T.J. Duration of sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol in mice. **Psychopharmacology (Berl)** v. 135, p. 374-82, 1998.

LETT, B.T. Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarding effects of amphetamine, morphine, and cocaine. **Psychopharmacology(Berl)** v. 98, p. 357-62, 1989.

LEWIS, D.A. Development of the prefrontal cortex during adolescence: Insights into vulnerable neural circuits in schizophrenia. **Neuropsychopharmacology** v. 16, p. 385–398, 1997.

LIECHTI, M. E. et al. Metabotropic glutamate 2/3 receptors in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens shell are involved in behaviors relating to nicotine dependence. **J. Neurosci.** v. 27, p. 9077–9085, 2007.

LILJEQUIST S. Changes in the sensitivity of dopamine receptors in the nucleus accumbens and in the striatum induced by chronic ethanol administration. **Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)** v. 43, p. 19-28, 1978.

LINSENBARDT, D.N. et al. Sensitivity and tolerance to the hypnotic and ataxic effects of ethanol in adolescent and adult C57BL/6J and DBA/2J mice. **Alcohol Clin. Exp. Res** v. 33, p. 464-76, 2009.

LISMAN, J.E.; GRACE, A.A. The hippocampal–VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. **Neuron** v. 46, p. 703–713, 2005.

LITTLETON, J. Can craving be modeled in animals? The relapse prevention perspective. **Addiction 95 Suppl.** v. 2, p. S83-90, 2000.

LITTLETON, J. Receptor regulation as a unitary mechanism for drug tolerance and physical dependence-not quite as simple as it seemed! **Addiction** v. 96, p. 87-101, 2001.

LIU, J. et al. Chronic cocaine administration switches corticotropin-releasing factor2 receptor-mediated depression to facilitation of glutamatergic transmission in the lateral septum. **J. Neurosci.** v. 25, p. 577-83, 2005.

LIU, X. et al. Smaller volume of prefrontal lobe in polysubstance abusers: a magnetic resonance imaging study. **Neuropsychopharmacology** v. 18, p. 243–52, 1998.

LJUNGBERG, T.; APICELLA, P.; SCHULTZ, W., Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. **Journal of Neurophysiology** v. 67, p. 145 163, 1992.

LÖF, E. et al. Nicotinic acetylcholine receptors in the ventral tegmental area mediate the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol cues. **Psychopharmacology (Berl)** v. 195, p. 333–343, 2007.

LOMINAC, K.D. et al. Behavioral and neurochemical interactions between Group 1 mGluR antagonists and ethanol: potential insight into their anti-addictive properties. **Drug Alcohol Depend.** v. 85, p. 142-56, 2006.

LONZE, B. E.; GINTY, D. D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. **Neuron** v. 35, p. 605–623, 2002.

LOPEZ, M.; et al. Age- and sex-related differences in alcohol and nicotine effects in C57BL/6J mice. **Addict. Biol.** v. 8, p. 419-27, 2003.

LOPEZ, M.F.; BECKER, H.C. Gender differences in ethanol intake prior to and following repeated chronic ethanol exposure and withdrawal in C57BL/6J mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 27, p. 15A, 2003.

LOPEZ, M.F.; BECKER, H.C. Effect of pattern and number of chronic ethanol exposures on subsequent voluntary ethanol intake in C57BL/6J mice. **Psychopharmacology** 1-9, 2005.

LORRAIN, D.S.; ARNOLD, G.M.; VEZINA, P. Previous exposure to amphetamine increases incentive to obtain the drug: long-lasting effects revealed by the progressive ratio schedule. **Behav. Brain Res.** v. 107, p. 9-19, 2000.

LOVINGER, D.M.; WHITE, G. Ethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine₃ receptor-mediated ion current in neuroblastoma cells and isolated adult mammalian neurons. **Mol Pharmacol.** v. 40, p. 263-70, 1991.

LOVINGER, D.M.; WHITE, G.; WEIGHT, F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. **Science** v. 243, p. 1721-4, 1989.

LU, L. et al. Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration in rats. **J Neurochem.** v. 85, p. 1604-13, 2003.

MACHU, T.K.; HARRIS, R.A. Alcohols and anesthetics enhance the function of 5 hydroxytryptamine₃ receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 271, p. 898-905, 1994.

MAGNUSSON, J. E.; FLEMING, A. S. Rat pups are reinforcing to the maternal rat: role of sensory cues. **Psychobiology** v. 23, p. 69-75, 1995.

MAN, H.Y.; SEKINE-AIZAWA, Y.; HUGANIR, R.L. Regulation of {alpha}-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 104, p. 3579-84, 2007.

MANGIAVACCHI, S.; WOLF, M.E. D1 dopamine receptor stimulation increases the rate of AMPA receptor insertion onto the surface of cultured nucleus accumbens neurons through a pathway dependent on protein kinase A. **J Neurochem.** v. 88, p. 1261-71, 2004.

MARKHAM, J. A.; MORRIS, J. R. JURASKA, J. M. Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. **Neuroscience** v. 144, p. 961–968, 2007.

MARKWIESE, B. J. et al. Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 22, p. 416–421, 1998.

MASUR, J.; OLIVEIRA DE SOUZA, M.L.; ZWICKER, A.P. The excitatory effect of ethanol: absence in rats, no tolerance and increased sensitivity in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 24, p. 1225-8, 1986.

MASUR, J.; BOERNGEN, R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 13, p. 777-80, 1980.

MATCHETT, J.A.; ERICKSON, C.K. Alteration of ethanol-induced changes in locomotor activity by adrenergic blockers in mice. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 52, p. 201-6, 1977.

MAYFIELD, R.D.; ZAHNISER, N.R. Dopamine D2 receptor regulation of the dopamine transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes is voltage-independent. **Mol. Pharmacol.** v. 59, p. 113–121, 2001.

McBRIDE, W.J. et al. Adolescent alcohol drinking and its long-range consequences. Studies with animal models. **Recent Dev. Alcohol**. v. 17, p. 123-42, 2005.

McBRIDE, W.J.; LI, T.K. Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. **Crit. Rev. Neurobiol.** v. 12, p. 339–369, 1998.

McCLUNG, C.A.; NESTLER, E.J. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. **Nat. Neurosci.** v. 6, p. 1208-15, 2003.

McFARLAND, K.; KALIVAS P. W. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. **J. Neurosci.** v. 21, p. 8655-8663, 2001.

McGEEHAN, A.J.; OLIVE, M.F. The anti-relapse compound acamprosate inhibits the development of a conditioned place preference to ethanol and cocaine but not morphine. **Br. J. Pharmacol.** v. 138, p. 9-12, 2003.

McGOUGH, N.N. et al. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. **J. Neurosci.** v. 24, p. 10542-52, 2004.

McLAUGHLIN, J.; SEE, R.E. Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdala attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 168, p. 57-65, 2003.

McMILLEN, B.A. et al. Effects of NMDA glutamate receptor antagonist drugs on the volitional consumption of ethanol by a genetic drinking rat. **Brain Res. Bull.** v. 64, p. 279-84, 2004.

MEDINA, K. L. et al. Prefrontal cortex volumes in adolescents with alcohol use disorders: unique gender effects. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 32, p. 386–394, 2008.

MEINKOTH, J.L. et al. Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. **Mol. Cell. Biochem.** v. 127-128, p. 179-86, 1993.

MEISCH, R. A.; HENNINGFIELD, J. E. Drinking of ethanol by rhesus monkeys: experimental strategies for establishing ethanol as a reinforcer. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 85B, p. 443–463, 1977.

MEISCH, R. A.; HENNINGFIELD, J. E.; THOMPSON, T. Establishment of ethanol as a reinforcer for rhesus monkeys via the oral route: initial results. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 59, p. 323– 342, 1975.

MEISCH, R. A.; KLINER, D. J.; HENNINGFIELD, J. E. Pentobarbital drinking by rhesus monkeys: establishment and maintenance of pentobarbital-reinforced behavior. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 217, p. 114– 120, 1981.

MEISCH, R. A.; THOMPSON, T. Ethanol intake during schedule induced polydipsia. **Physiol. Behav.** v. 8, p. 471–475, 1972.

MEISCH, R. A.; WAHLSTROM, R. J.; PICKENS, R. W. Effects of substituting ethanol solutions for water during schedule induced polydipsia: initial results. **Reports from the Research Laboratories, Department of Psychiatry, University of Minnesota**, No. PR-70-1, 1970.

MEISCH, R.A. Oral drug self-administration: an overview of laboratory animal studies. **Alcohol.** v. 24, p. 117-28, 2001.

MELENDEZ, R.I. et al. Ethanol exposure decreases glutamate uptake in the nucleus accumbens. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 29, p. 326-33; 2005.

MELENDEZ, R.I.; MIDDAUGH, L.D.; KALIVAS, P.W. Development of an alcohol deprivation and escalation effect in C57BL/6J mice. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 30, p. 2017-25, 2006.

MELIS, M. et al. Long-lasting potentiation of GABAergic synapses in dopamine neurons after a single in vivo ethanol exposure. **J. Neurosci.** v. 22, p. 2074-82, 2002.

MELIS, M.; SPIGA, S.; DIANA, M. The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. **Int. Rev. Neurobiol.** v. 63, p. 101-54, 2005.

MENDREK, A.; BLAHA, C.D.; PHILLIPS, A.G. Pre-exposure of rats to amphetamine sensitizes self-administration of this drug under a progressive ratio schedule. **Psychopharmacology (Berl)** v. 135, p. 416-22, 1998.

MEREU, G.; FADDA, F.; GESSA, G.L. Ethanol stimulates the firing rate of nigral dopaminergic neurons in unanesthetized rats. **Brain Res.** v. 292, p. 63-9, 1984.

MEYER, P.J.; MESHUL, C.K.; PHILLIPS, T.J. Ethanol- and cocaine-induced locomotion are genetically related to increases in accumbal dopamine. **Genes Brain Behav.** v. 8, p. 346-55, 2009.

MIHIC, S.J. Acute effects of ethanol on GABA_A and glycine receptor function. **Neurochem. Int.** v. 35, p. 115–123, 1999.

MIHIC, S.J. et al. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. **Nature** v. 389, p. 385-9, 1997.

MISRA, K.; PANDEY, S.C. The decreased cyclic-AMP dependent-protein kinase A function in the nucleus accumbens: a role in alcohol drinking but not in anxiety-like behaviors in rats. **Neuropsychopharmacology.** v. 31, p. 1406-19, 2006.

MOCHLY-ROSEN, D. et al. Chronic ethanol causes heterologous desensitization of receptors by reducing alpha s messenger RNA. **Nature (London)** v. 333, p. 848-850, 1988.

MOGHADDAM, B. et al. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. **Brain Res.** v. 655, p. 251-4, 1994.

MOGHADDAM, B.; BOLINAO, M.L. Biphasic effect of ethanol on extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus and the nucleus accumbens. **Neurosci. Lett.** v. 178, p. 99-102, 1994.

MONS, N. et al. Immunological assessment of the distribution of type VII adenylyl cyclase in brain. **Brain Res.** v. 788, p. 251–261, 1998.

MONTI, P.M. et al. Adolescence: booze, brains, and behavior. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 29, p. 207-220, 2005.

MORICE, E. et al. Evidence of long-term expression of behavioral sensitization to both cocaine and ethanol in dopamine transporter knockout mice. **Psychopharmacology (Berl)** v. 208, p. 57-66, 2010.

MORIKAWA, H.; MORRISETT, R.A. Ethanol action on dopaminergic neurons in the ventral tegmental area: interaction with intrinsic ion channels and neurotransmitter inputs. **Int. Rev. Neurobiol.** v. 91, p. 235-88, 2010.

MORRIS; S.A. et al. Similar withdrawal severity in adolescents and adults in a rat model of alcohol dependence. **Alcohol** v. 44, p. 89-98, 2010.

MULDER, A.B.; HODENPIJL, M.G.; LOPEZ DE SILVA, F.H. Electrophysiology of the hippocampal ; amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: convergence, segregation, and interactions of inputs. **Journal of Neuroscience** v. 18, p. 5095–5102, 1998.

MYERS, R.D.; MELCHIOR, C.L. Alcohol drinking in the rat after destruction of serotonergic and catecholaminergic neurons in the brain. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.** v. 10, p. 363-78, 1975.

NAGEL, B. J. et al. Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity. **Psychiatry Res.** v. 139, p. 181–190, 2005.

NAGY, L.E. et al. Adenosine is required for ethanol-induced heterologous desensitization. **Mol. Pharmacol.** v. 36, p. 744-8, 1989.

NAGY, L.E.; DIAMOND, I.; GORDON, A.S. cAMP-dependent protein kinase regulates inhibition of adenosine transport by ethanol. **Mol. Pharmacol.** v. 40, p. 812–817, 1991.

NAKANO, M.; MIZUNO, T. Age-related changes in the metabolism of neurotransmitters in rat striatum: a microdialysis study. **Mech. ageing dev.** v. 86(2), p. 95-104, 1996.

NARAHASHI, T. et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new target site of ethanol. **Neurochem. Int.** v. 35, p. 131-141, 1999.

NEISEWANDER, J.L. et al. Fos protein expression ; cocaine seeking behavior in rats after exposure to a cocaine self-administration environment. **J. Neurosci.** v. 20, p. 798–805, 2000.

NESTBY, P. et al. Ethanol, like psychostimulants and morphine, causes long-lasting hyperreactivity of dopamine and acetylcholine neurons of rat nucleus accumbens: possible role in behavioural sensitization. **Psychopharmacology** v. 133, p. 69–76, 1997.

NESTBY, P. et al. Unrestricted free-choice ethanol self-administration in rats causes long-term neuroadaptations in the nucleus accumbens and caudate putamen. **Psychopharmacology (Berl)** v. 141, p. 307-14, 1999.

NESTLER, E.J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat. Neurosci.** v. 8, p. 1445-9, 2005.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; SELF, D.W. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 98, p. 11042-6, 2001.

NEVE, K.A.; SEAMANS, J.K.; TRANTHAM-DAVIDSON, H. Dopamine receptor signaling. **J. Recept. Signal. Transduct. Res.** v. 24, p. 165-205, 2004.

NEWLIN, D.B. The self-percieved survival ability and reproductive fitness (SPFit) theory of substance use disorders. **Addiction** v. 97, p. 427–445, 2002.

NGUYEN, P.V.; WOO, N. H. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP dependent protein kinases. **Prog. Neurobiol** v. 71, p. 401–437, 2003.

NISHI, A. et al. Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 97, p. 12840–12845, 2000.

NOBLE, E.P. Alcoholism and the dopaminergic system: a review. **Addict. Biol.** v. 1, p. 333–348, 1996.

NURMI, M.; KIIANMAA, K.; SINCLAIR, J.D. Brain ethanol in AA, ANA, and Wistar rats monitored with one-minute microdialysis. **Alcohol** v. 11, p. 315– 21, 1994.

NURSE, S.; LACAILLE, J.C. Late maturation of GABA(B) synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. **Neuropharmacology** v. 38, p. 1733–1742, 1999.

O'DONNELL, P. et al. Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. **Annals of New York Academy of Sciences** v. 877, p. 157–175, 1999.

OLDENBURGER, W. P.; EVERITT, B. J.; DE JONGE, F. H. Conditioned place preference induced by sexual interaction in female rats. **Horm. Behav.** v. 26, p. 214–228, 1992.

OLIVE, M.F.; MEHMERT, K.K.; HODGE, C.W. Microdialysis in the mouse nucleus accumbens: a method for detection of monoamine and amino acid neurotransmitters with simultaneous assessment of locomotor activity. **Brain Res. Brain. Res. Protoc.** v. 5, p. 16-24, 2000.

ORFORD, J.; Addiction as excessive appetite. **Addiction** v. 96, p. 15–31, 2001.

OTHMAN, T. et al. Ethanol alters glutamate but not adenosine uptake in rat astrocytes: Evidence for protein kinase C involvement. **Neurochem. Res.** v. 27, p. 289–296, 2002.

OUIMET, C.C. et al. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. **J. Neurosci.** v. 4, p. 111-24, 1984.

PANDEY, S. C. et al. Partial deletion of the cAMP response element-binding protein gene promotes alcohol-drinking behaviors. **J. Neurosci.** v. 24, p. 5022–5030, 2004.

PANDEY, S.C. et al. Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. **J. Clin. Invest.** v. 115, p. 2762–2773, 2005.

PANDEY, S.C.; ROY, A.; MITTAL, N. Effects of chronic ethanol intake and its withdrawal on the expression and phosphorylation of the CREB gene transcription factor in rat cortex. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 296, p. 857– 868, 2001.

PANDEY, S.C.; ROY, A.; ZHANG, H. The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 27, p. 396–409, 2003.

PARSONS, M.P.; LI, S.; KIROUAC, G.J. Functional and anatomical connection between the paraventricular nucleus of the thalamus and dopamine fibers of the nucleus accumbens. **J. Comp. Neurol.** v. 500(6), p. 1050-63, 2007.

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, p. 1422–1429, 2000.

PASCUAL, M. et al. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long term behavioural alterations in adolescent rats. **Eur. J. Neurosci.** v. 25, p. 541–550, 2007.

PASCUAL, M. et al. Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. **J. Neurochem.** v. 108, p. 920–931, 2009.

PATEL, B. A. et al. Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.** v. 818, p. 269-76, 2005.

PAULSON, P. E.; CAMP, D. M.; ROBINSON, T. E. The time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats, **Psychopharmacology** v. 103, p. 480–492, 1991.

PAUS, T. et al. Maturation of white matter in the human brain: a review of magnetic resonance studies. **Brain Res. Bull.** v. 54, p. 255–266, 2001.

PAUS, T. Mapping brain maturation and cognitive development during adolescence. **Trends. Cogn. Sci.** v. 9, p. 60–68, 2005.

PAUS, T.; KESHAVAN, M.; GIEDD, J. N. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? **Nat. Rev. Neurosci.** v. 9, p. 947–957, 2008.

PAUTASSI, R.M. et al. Ethanol induces second-order aversive conditioning in adolescent and adult rats. **Alcohol** v. 45, p. 45-55, 2011.

PELLEGRINO, S.M.; DRUSE, M.J. The effects of chronic ethanol consumption on the mesolimbic and nigrostriatal dopamine systems. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 16, p. 275–280, 1992.

PENNARTZ, C.M.A. et al. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an 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.

PERKS, S. M.; CLIFTON, P. G. Reinforcer revaluation and conditioned place preference. **Physiol. Behav** v. 61, p. 1-5, 1997.

PERRA, S. et al. In vivo ethanol experience increases D(2) autoinhibition in the ventral tegmental area. **Neuropsychopharmacology** v. 36, p. 993-1002, 2011.

PERRIN, J. S. et al. Sex differences in the growth of white matter during adolescence. **Neuroimage** v. 45, p. 1055-1066, 2009.

PERRIN, J.S. et al. Growth of white matter in the adolescent brain: role of testosterone and androgen receptor. **J. Neurosci.** v. 28, p. 9519–9524, 2008.

PERT, A.; POST, R.; WEISS, S.R. Conditioning as a critical determinant of sensitization induced by psychomotor stimulants. **NIDA Res. Monogr.** v. 97, p. 208-41, 1990.

PFEFFER, A.O.; SAMSON, H.H. Haloperidol and apomorphine effects on ethanol reinforcement in free feeding rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 29, p. 343–350, 1988.

PFEFFER, A.O.; SAMSON, H.H. Effect of pimozide on home cage ethanol drinking in the rat: dependence on drinking session length. **Drug Alcohol Depend.** v. 17, p. 47-55, 1986.

PFEFFER, A.O.; SAMSON, H.H. Oral ethanol reinforcement: interactive effects of amphetamine, pimozide and food-restriction. **Alcohol Drug. Res.** v. 6, p. 37-48, 1985-1986.

PHILLIPS, T. J. et al. Acute sensitivity of FAST and SLOW mice to the effects of abused drugs on locomotor activity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 261, p. 525–533, 1992.

PHILLIPS, T. J. et al. Effects of acute and repeated ethanol exposures on the locomotor activity of BXD recombinant inbred mice. **Alcoholism Clin. Exp. Res.** v. 19, p. 269–278, 1995.

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.

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.M.; WECKER, L.; KIRSTEIN, C.L. Repeated ethanol exposure during adolescence alters the developmental trajectory of dopaminergic output from the nucleus accumbens septi. **Int. J. Dev. Neurosci.** v. 27, p. 805-15, 2009.

PIAZZA, P.V. et al. Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 88, p. 2088-92, 1991.

PIAZZA, P.V. et al. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. **Science**. v. 245, p. 1511-3, 1989.

PIAZZA, P.V. et al. Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self administration. **Brain Res.** v. 514, p. 22-6, 1990.

PIAZZA, P.V.; LE MOAL, M.L. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** v. 36, p. 359–378, 1996.

PIERCE, R.C. et al. Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. **J. Neurosci.** v. 16, p. 1550-60, 1996.

PIERCE, R.C.; KALIVAS, P.W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. **Brain Res. Rev.** v. 25, p. 192–216, 1997.

PIERRE, P.J.; VEZINA, P. D1 dopamine receptor blockade prevents the facilitation of amphetamine self-administration induced by prior exposure to the drug. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 138, p. 159-66, 1998.

PILLA, M. et al. Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. **Nature** v. 400, p. 371–375, 1999.

PITKANEN, A. et al. Reciprocal connections between the amygdala ; the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. **Annals of New York Academy of Science** v. 911, p. 369–391. 2000.

POHORENCKY, L. A. Biphasic action of ethanol. **Biobehav. Rev.** v. I, p. 231-240, 1977.

PONTIERI, F.E.; TANDA, G.; DI CHIARA, G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 92, p. 12304-8, 1995.

QUERTEMONT, E.; GREEN, H.L.; GRANT, K.A. Brain ethanol concentrations and ethanol discrimination in rats: effects of dose and time. **Psychopharmacology** v. 168, p. 262–270, 2003.

RABE, C. S. et al. Effect of ethanol on cyclic AMP levels in intact PC12 cells. **Biochem. Pharmacol.** v. 40, p. 565-571, 1990.

RABIN, R. A.; EDELMAN, A. M.; WAGNER, J. A. Activation of protein kinase A is necessary but not sufficient for ethanol-induced desensitization of cyclic AMP production. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 262, p. 257-262, 1992.

RABIN, R.A. Ethanol-induced desensitization of adenylate cyclase: role of the adenosine receptor and GTP-binding proteins. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 264, p. 977–983, 1993.

RAEDER, H. et al. Expression of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor subunits and splice variants in an animal model of long-term voluntary alcohol self-administration. **Drug Alcohol Depend.** v. 96, p. 16-21, 2008.

RAMAN, I.M.; TONG, G.; JAHR, C.E. Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. **Neuron** v. 16, p. 415-21, 1996.

RASSNICK, S.; STINUS, L.; KOOB, G.F. The effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mesolimbic dopamine system on oral self-administration of ethanol in the rat. **Brain Res.** v. 623, p. 16-24, 1993.

RIBEIRO, A.F. et al. Lack of relation between drug-seeking behavior in an addiction model and the expression of behavioral sensitization in response to ethanol challenge in mice. **J. Neural. Transm.** v. 115, p. 43-54, 2008.

RICHARDSON, J.S.; NOVAKOVSKI, D.M. Brain monoamines and free choice ethanol consumption in rats. **Drug Alcohol Depend.** v. 3, p. 253-64, 1978.

RISINGER, F.O. et al. Motivational properties of ethanol in mice selectively bred for ethanol-induced locomotor differences. **Psychopharmacology (Berl)** v. 116, p. 207-16, 1994.

RISINGER, F.O.; OAKES, R.A. Dose- and conditioning trial-dependent ethanol-induced conditioned place preference in Swiss-Webster mice. **Pharmacol Biochem. Behav.** v. 55, p. 117-23, 1996.

RIUS, R. A. et al. Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation is reduced in rat striatum after chronic ethanol treatment. **Brain. Res.** v. 365, p. 355-359, 1986.

ROBBINS, S.J.; EHRLMAN, R.N. Designing studies of drug conditioning in humans. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 106, p. 143-53, 1992.

ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Drug addiction: bad habits add up. **Nature** v. 398, p. 567–570, 1999.

ROBERTO, M. et al. Acute and chronic ethanol alter glutamatergic transmission in rat central amygdala: an in vitro and in vivo analysis. **J. Neurosci.** v. 24, p. 1594-603, 2004.

ROBINSON, T. E. et al. Modulation of the induction or expression of psychostimulant sensitization by the circumstances surrounding drug administration. **Neuroscience Biobehavioral Reviews** v. 22, p. 347–354, 1998.

ROBINSON, T.E. et al. Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. **Synapse** v. 39, p. 257–266, 2001.

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 Research Reviews** 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 Research Reviews** v. 18, p. 247–336, 1993.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The psychology ; neurobiology of addiction: An incentive-sensitization view. **Addiction** v. 95, p. S91–117, 2000.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Mechanisms of action of addictive stimuli: Incentive sensitization ; addiction. **Addiction** v. 96, p. 103–14, 2001.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Addiction. **Annual Reviews of Psychology** v. 54, p. 25–53, 2003.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Incentive-sensitization ; drug “wanting” (Reply). **Psychopharmacology** v. 171, p. 352–53, 2004.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. **Phil. Trans. R. Soc. B** v. 363, p. 3137–3146, 2008.

ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. **J. Neurosci.** v. 17, p. 8491–8497, 1997.

ROBINSON, T.E.; KOLB, B. Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. **Synapse.** v. 33, p. 160-2, 1999a.

ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. **Eur. J. Neurosci.** v. 11, p. 1598-604, 1999b.

ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology** v. 47, p. 33–46, 2004.

RODD, Z.A. et al. Intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of male Wistar rats: evidence for involvement of dopamine neurons. **Journal of Neuroscience** v. 24, p. 1050–1057, 2004.

RODD-HENRICKS, Z.A. et al. Alcohol deprivation effect is prolonged in the alcohol preferring (P) rat after repeated deprivations. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 24, p. 8-16; 2000.

RODD-HENRICKS, Z.A. et al. Effects of ethanol exposure on subsequent acquisition and extinction of ethanol self-administration and expression of alcohol-seeking behavior in adult alcohol-preferring (P) rats: I. Periadolescent exposure. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 26, p. 1632-41, 2002a.

RODD-HENRICKS, Z.A. et al. Effects of ethanol exposure on subsequent acquisition and extinction of ethanol self-administration and expression of alcohol-seeking behavior in adult alcohol-preferring (P) rats: II. Adult exposure. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 26, p. 1642-52, 2002b.

RODRIGUEZ DE FONSECA, F. et al. Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. **Neuroreport** v. 4, p. 135–138, 1993.

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, p. 272–277, 1994.

ROSSI, N.A.; REID, L.D. Affective states associated with morphine injections. **Physiol. Psychol.** v. 4, p. 269–274, 1976.

RUBIA, K. et al. Progressive increase of frontostriatal brain activation from childhood to adulthood during even related tasks of cognitive control. **Human Brain Mapping** v. 27, p. 973–993, 2006.

RUSSELL, R.N. et al. Apomorphine and 7-OH DPAT reduce ethanol intake of P and HAD rats. **Alcohol** v. 13, p. 515–519, 1996.

SAAL, D. et al. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. **Neuron**. v. 37, p. 577-82, 2003.

SAMSON HH. Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 10, p. 436-42, 1986.

SAMSON, H. H. The microstructure of ethanol drinking: genetic and behavioral factors in the control of drinking patterns. **Addiction** v. 95, p. S61– S72, 2000.

SAMSON, H.H. et al. Alcohol self-administration: role of mesolimbic dopamine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 654, p. 242-53, 1992.

SAMSON, H.H. et al. Comparison of alcohol-preferring and nonpreferring selectively bred rat lines. I. Ethanol initiation and limited access operant self-administration. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 22, p. 2133-46, 1998.

SAMSON, H.H.; HARRIS, R.A. Neurobiology of alcohol abuse. **Trends Pharmacol Sci.** v. 13, p. 206-11, 1992.

SAMSON, H.H.; TOLLIVER, G.A.; SCHWARZ-STEVENSON, K. Oral ethanol self-administration: a behavioral pharmacological approach to CNS control mechanisms. **Alcohol** v. 7, p. 187-91, 1990.

SANCHIS-SEGURA, C. et al. Involvement of the AMPA receptor GluR-C subunit in alcohol seeking behavior and relapse. **J. Neurosci.** v. 26, p. 1231–1238, 2006.

SANDS, W.A.; PALMER, T. M. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. **Cell Signal.** v. 20, p. 460–466, 2008.

SAPRU, M.K.; DIAMOND, I.; GORDON, A.S. Adenosine receptors mediate cellular adaptation to ethanol in NG108-15 cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 271, p. 542–548, 1994.

SARI, Y.; BELL, R.L.; ZHOU, F.C. Effects of chronic alcohol and repeated deprivations on dopamine D1 and D2 receptor levels in the extended amygdala of inbred alcohol-preferring rats. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 30, p. 46-56, 2006.

SAVELIEVA, K.V.; CAUDLE, W.M.; MILLER, G.W. Altered ethanol-associated behaviors in vesicular monoamine transporter heterozygote knockout mice. **Alcohol.** v. 40, p. 87-94, 2006.

SCHEGGI, S. et al. Behavioral expression of cocaine sensitization in rats is accompanied by a distinct pattern of modifications in the PKA/DARPP-32 signaling pathway. **J. Neurochem.** v. 103, p. 1168-83, 2007.

SCHILSTRÖM, B. et al. Cocaine enhances NMDA receptor-mediated currents in ventral tegmental area cells via dopamine D5 receptor-dependent redistribution of NMDA receptors. **J. Neurosci.** v. 26, p. 8549-58, 2006.

SCHROEDER, J. A.; HUMMEL, M.; UNTERWALD, E. M. Repeated intracerebroventricular forskolin administration enhances behavioral sensitization to cocaine. **Behav. Brain Res.** v. 153, p. 255–260, 2004.

SCHROEDER, J.P.; OVERSTREET, D.H.; HODGE, C.W. The mGluR5 antagonist MPEP decreases operant ethanol self-administration during maintenance and after repeated alcohol deprivations in alcohol-preferring (P) rats. **Psychopharmacology (Berl)** v. 179, p. 262–270, 2005.

SCHULTZ W. Predictive reward signal of dopamine neurons. **J. Neurophysiol.** v. 80, p. 1–27, 1998.

SHIPPENBERG, T.S.; HEIDBREDER, C.; LEFEVOUR, A. Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine: pharmacology and temporal characteristics. **Eur. J. Pharmacol.** v. 299, p. 33-9, 1996.

SIEGMUND, S. et al. Influence of age at drinking onset on long-term ethanol self-administration with deprivation and stress phases. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 29, p. 1139-45, 2005.

SIGGINS, G.R. et al. Glutamatergic transmission in opiate and alcohol dependence. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1003, p. 196-211, 2003.

SILVERI, M. M.; SPEAR, L. P. Decreased sensitivity to the hypnotic effects of ethanol early in ontogeny. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 22, p. 670–676, 1998.

SIRCAR, R.; SIRCAR, D. Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 29, p. 1402–1410, 2005.

SLAWECKI, C.J.; THORSELL, A.; EHLERS, C.L. Long-term neurobehavioral effects of alcohol or nicotine exposure in adolescent animal models. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1021, p. 448–452, 2004.

SMITH, T.L. Regulation of glutamate uptake in astrocytes continuously exposed to ethanol. **Life Sci.** v. 61, p. 2499 –2505, 1997.

SMITH, T.L.; NAVRATILOVA, E. Increased calcium/calmodulin protein kinase activity in astrocytes chronically exposed to ethanol: Influences on glutamate transport. **Neurosci. Lett.** v. 269, p. 145–148, 1999.

SOLOMON, R. L.; CORBIT, J. D. An opponent-process theory of motivation: I. Temporal dynamics of affect. **Psychological Review** v. 81, p. 119–45, 1974.

SOLOMON, R.L.; CORBIT, J.D. An opponent process theory of motivation. II. Cigarette addiction. **J. Abnorm. Psychol.** v. 81, p. 158–71, 1973.

SOUZA-FORMIGONI, M.L. et al. Sensitization to ethanol's stimulant effect is associated with region-specific increases in brain D2 receptor binding. **Psychopharmacology (Berl)** v. 146, p. 262-7, 1999.

SPARTA et al. The Alcohol Deprivation Effect (ADE) in C57BL/6J mice is observed using operant self-administration procedures and is modulated by CRF-1 receptor signaling **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 33, p. 31–42, 2009.

SPEAR, L. P.; VARLINSKAYA, E. I. Adolescence: Alcohol sensitivity, tolerance, and intake. Recent Developments in Alcoholism: **An Official Publication of the American Medical Society on Alcoholism, the Research Society on Alcoholism, and the National Council on Alcoholism** v. 17, p. 143–159, 2005.

SPEAR, L.; VARLINSKAYA, E.I. Sensitivity to Ethanol and Other Hedonic Stimuli in an Animal Model of Adolescence: Implications for Prevention Science? **Dev. Psychobiol.** v. 52, p. 236–243, 2010.

SPEAR, L.P.; BRICK, J. Cocaine-induced behavior in the developing rat. **Behav. Neural. Biol.** v. 26, p. 401-15, 1979.

SPINA, L. et al. Role of dopamine D1 receptors and extracellular signal regulated kinase in the motivational properties of acetaldehyde as assessed by place preference conditioning. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 34, p. 607-16, 2010.

SPORNS, O.; TONONI, G.; EDELMAN, G.M., Theoretical neuroanatomy and the connectivity of the cerebral cortex. **Behavioral Brain Research** v. 135, p. 69–74, 2002.

SPRAGG, S.D.S. Morphine addiction in chimpanzees. **Comp. Psychol. Monogr.** v. 15, p. 132, 1940.

STEFURAK, T. L.; van der KOOY, D. Saccharin's rewarding, conditioned reinforcing, and memory-improving properties: mediation by isomorphic or independent processes? **Behav. Neurosci.** v. 106, p. 125-139, 1992.

STEFURAK, T. L.; van der KOOY, D. Tegmental pedunculo-pontine lesions in rats decrease saccharin's rewarding effects but not its memory-improving effect. **Behav. Neurosci.** v. 108, p. 972-980, 1994.

STEVENSON, J.R. et al. Abstinence following alcohol drinking produces depression-like behavior and reduced hippocampal neurogenesis in mice. **Neuropsychopharmacology** v. 34, p. 1209-22, 2009.

STEVENSON, R.A.; BESHEER, J.; HODGE, C.W. Comparison of ethanol locomotor sensitization in adolescent and adult DBA/2J mice. **Psychopharmacology** v. 197, p. 361–370, 2008.

STEWART, J.; VEZINA, P. Extinction procedures abolish conditioned stimulus control but spare sensitized responding to amphetamine. **Behav. Pharmacol.** v. 2, p. 65-71, 1991.

STEWART, J.; BADIANI, A. Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. **Behavioral Pharmacology** v. 4, p. 289–312, 1993.

STEWART, R. B. et al. Ethanol as an oral reinforcer in normal weight rhesus monkeys: dose-response functions. **Alcohol** v. 13, p. 341–346, 1996a.

STRAKOWSKI, S. M.; SAX, K. W. Progressive behavioral response to repeated amphetamine challenge: further evidence for sensitization in humans. **Biological Psychiatry** v. 44, p. 1171–1177, 1998.

STRAKOWSKI, S.M. et al. Enhanced response to repeated d-amphetamine challenge: evidence for behavioral sensitization in humans. **Biological Psychiatry** v. 40, p. 872–880, 1996.

STRATAKIS, C.A.; CHO-CHUNG, Y.S. Protein kinase A and human disease. **Trends Endocrinol Metab.** v. 13, p. 50-2, 2002.

STRÖMBOM, U.; SVENSSON, T.H.; CARLSSON, A. Antagonism of ethanol's central stimulation in mice by small doses of catecholamine-receptor agonists. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 51, p. 293-9, 1977.

SUAUD-CHAGNY, M.F. et al. Relationship between dopamine release in the rat nucleus accumbens and the discharge activity of dopaminergic neurons during local in vivo application of amino acids in the ventral tegmental area. **Neuroscience** v. 49, p. 63-72, 1992.

SUGAWA, M.; MAY, T. Age-related alteration in signal transduction: involvement of the cAMP cascade. **Brain Res.** v. 618, p. 57-62, 1993.

SUN, W.; REBEC, G.V. The role of prefrontal cortex D1-like and D2-like receptors in cocaine-seeking behavior in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 177, p. 315-23, 2005.

SUN, X.; ZHAO, Y.; WOLF, M.E. Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons. **J. Neurosci.** v. 25, p. 7342-51, 2005.

SWANSON, L.W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. **Brain Res.** v. 886, p. 113–164, 2000.

SWARTZWELDER, H. S.; WILSON, W. A.; TAYYEB, M. I. Age dependent inhibition of long-term potentiation by ethanol in immature versus mature hippocampus. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 19, p. 1480–1485, 1995a.

SWARTZWELDER, H. S.; WILSON, W. A.; TAYYEB, M. I. Differential sensitivity of NMDA receptor-mediated synaptic potentials to ethanol in immature versus mature hippocampus. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 19, p. 320–323, 1995b.

SZUMLINSKI, K.K. et al. Accumbens Homer2 overexpression facilitates alcohol-induced neuroplasticity in C57BL/6J mice. **Neuropsychopharmacology** v. 33, p. 1365-78, 2008.

SZUMLINSKI, K.K. et al. Homer2 is necessary for EtOH-induced neuroplasticity. **J. Neurosci.** v. 25, p. 7054-61, 2005.

TABAKOFF, B. et al. Differences in platelet enzyme activity between alcoholics and nonalcoholics. **N. Engl. J. Med.** v. 318, p. 134-139, 1988.

TAJUDDIN, N.F.; DRUSE, M.J. Effects of chronic alcohol consumption and aging on dopamine D2 receptors in Fischer 344 rats. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 20, p. 144–151, 1996.

TAMBOUR, S.; BROWN, L.L.; CRABBE, J.C. Gender and age at drinking onset affect voluntary alcohol consumption but neither the alcohol deprivation effect nor the response to stress in mice. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 32, p. 2100-6, 2008.

TANG, A. et al. Ethanol increases extracellular dopamine concentration in the ventral striatum in C57BL/6 mice. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 27, p. 1083-9, 2003.

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.

TARAZI, F. I.; TOMASINI, E. C.; BALDESSARINI, R. J. Postnatal development of dopamine and serotonin transporters in rat caudate putamen and nucleus accumbens septi. **Neurosci. Lett.** v. 254, p. 21–24, 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. **Dev. Neurosci.** v. 21, p. 43–49, 1999.

TEICHER, M. H.; ANDERSEN, S. L.; HOSTETTER, J. C. Jr. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. **Brain Res. Dev. Brain Res.** v. 89, p. 167–172, 1995.

TEICHER, M.H.; ANDERSEN, S.L. Limbic serotonin turnover plunges during puberty. **Paper presented at: Meeting of the Society for Neuroscience**; Miami Beach, Fla. 1999.

THANOS, P.K. et al. The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011-A attenuates ethanol consumption in ethanol preferring (P) and non-preferring (NP) rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 81, p. 190–197, 2005b.

THIBAULT, C. et al. Expression profiling of neural cells reveals specific patterns of ethanol-responsive gene expression. **Mol. Pharmacol.** v. 58, p. 1593-600, 2000.

THIELE, T. E. et al. High ethanol consumption and low sensitivity to ethanol-induced sedation in protein kinase A-mutant mice. **J. Neurosci.** v. 20, p. RC75, 2000.

THIELE, T.E. et al.. Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. **Nature** v. 396, p. 366-9, 1998.

THORSELL, A.; JOHNSON, J.; HEILIG, M. Effect of the adenosine A2a receptor antagonist 3,7 dimethylpropargylxanthine on anxiety-like and depression like behavior and alcohol consumption in Wistar Rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 31, p. 1302–1307, 2007.

TINGLEY, W.G. et al. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 5157-66, 1997.

TOGA, A. W.; THOMPSON, P. M. Temporal dynamics of brain anatomy. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** v. 5, p. 119–145, 2003.

TOLLIVER, B.K. et al. Necessary role for ventral tegmental area adenylate cyclase and protein kinase A in induction of behavioral sensitization to intraventral tegmental area amphetamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 289, p. 38–47, 1999.

TREVISAN, L.A. et al. Complications of alcohol withdrawal: pathophysiological insights. **Alcohol Health Res. World** v. 22, p. 61–66, 1998.

TZAVARA, E.T. et al. Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebellum. **Eur. J. Neurosci.** v. 12, p. 1038–1046, 2000.

TZSCHENTKE, T. M.; SCHMIDT, W. J. Interactions of MK-801 and GYKI 52466 with morphine and amphetamine in place preference conditioning and behavioural sensitization. **Behav. Brain Res.** v. 84, p. 99-107, 1997.

UNGLESS, M.A. et al. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. **Nature** v. 411, p. 583-7, 2001.

VALADEZ, A.; SCHENK, S. Persistence of the ability of amphetamine preexposure to facilitate acquisition of cocaine self-administration. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 47, p. 203-5, 1994.

van EDEN, C. G.; KROS, J. M.; UYLINGS, H. B. The development of the rat prefrontal cortex. Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas. **Prog. Brain Res.** v. 85, p. 169–183, 1990.

VANDERSCHUREN, L.J.; KALIVAS, P.W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 151, p. 99-120, 2000.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Acute effects of ethanol on social behavior of adolescent and adult rats: Role of familiarity of the test situation. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 26, p. 1502–1511, 2002.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Acute ethanol withdrawal (hangover) and social behavior in adolescent and adult male and female Sprague-Dawley rats. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research** v. 28, p. 40–50, 2004.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Chronic tolerance to the social consequences of ethanol in adolescent and adult Sprague-Dawley rats. **Neurotoxicology and Teratology** v. 29, p. 23–30, 2007.

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

VENGELIENE, V. et al. The role of the NMDA receptor in alcohol relapse: a pharmacological mapping study using the alcohol deprivation effect. **Neuropharmacology** v. 48, p. 822–829, 2005.

VETTER, C.S.; DOREMUS-FITZWATER, T.L.; SPEAR, L.P. Time course of elevated ethanol intake in adolescent relative to adult rats under continuous, voluntary-access conditions. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 31, p. 1159-68, 2007.

VEZINA, P.; STEWART, J. Conditioned locomotion and place preference elicited by tactile cues paired exclusively with morphine in an open field. **Psychopharmacology** v. 91, p. 375–380, 1987.

VINCENT, S.L.; PABREZA, L.; BENES, F.M. Postnatal maturation of GABA-immunoreactive neurons of rat medial prefrontal cortex. **J. Comp. Neurol.** v. 355, p. 81–92, 1995.

VOLKOW, N. D. et al. Dopamine in drug abuse and addiction: Results from imaging studies and treatment implications. **Molecular Psychiatry** v. 9, p. 557–69, 2004.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G.-J. The addicted human brain: Insights from imaging studies. **Journal of Clinical Investigation** v. 111(10), p. 1444–51, 2003.

VOLKOW, N.; LI, T.K. Drug addiction: the neurobiology of behavior gone awry. **Nature Reviews Neuroscience** v. 5, p. 963–970, 2004.

VOLKOW, N.D. et al. Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 20, p. 1594–1598, 1996.

WALKER, B.M.; EHLERS, C.L. Appetitive motivational experience during adolescence results in enhanced alcohol consumption during adulthood. **Behav. Neurosci.** v. 123, p. 926-35, 2009.

WALKER, B.M.; ETTEMBERG, A. Intracerebroventricular ethanol-induced conditioned place preferences are prevented by fluphenazine infusions into the nucleus accumbens of rats. **Behav. Neurosci.** v. 121, p. 401-10, 2007.

WALKER, B.M.; WALKER, J.L.; EHLERS, C.L. Dissociable effects of ethanol consumption during the light and dark phase in adolescent and adult Wistar rats. **Alcohol** v. 42, p. 83-9, 2008.

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, p. 15218–15223, 2003.

WALTEREIT, R.; WELLER, M. Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. **Mol. Neurobiol.** v. 27, p. 99–106, 2003.

WALTERS, C.L. et al. Mu-opioid receptor and CREB activation are required for nicotine reward. **Neuron.** v. 46, p. 933-43, 2005.

WAND, G. et al. The cAMP-protein kinase A signal transduction pathway modulates ethanol consumption and sedative effects of ethanol. **J. Neurosci.** v. 21, p. 5297–5303, 2001.

WAND, G. S. et al. Chronic ethanol treatment increases expression of inhibitory G-proteins and reduces adenylylcyclase activity in the central nervous system of two lines of ethanol-sensitive mice. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 2595-2601, 1993.

WANG, J. et al. Ethanol induces long-term facilitation of NR2B-NMDA receptor activity in the dorsal striatum: implications for alcohol drinking behavior. **J. Neurosci.** v. 27, p. 3593-602, 2007.

WANG, X. et al. Ethanol directly modulates gating of a dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel in neurohypophyseal terminals. **J. Neurosci** v. 14, p. 5453–5460, 1994.

WEISS, F. et al. Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. **Brain Res.** v. 593, p. 314-8, 1992.

WEISS, F. et al. Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 937, p. 1-26, 2001.

WEISS, F. et al. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. **J. Neurosci.** v. 16, p. 3474-85, 1996.

WEISS, F. et al. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. **J Pharmacol. Exp. Ther.** v. 267, p. 250–258, 1993.

WEISS et al. Compulsive Drug-Seeking Behavior and Relapse Neuroadaptation, Stress, and Conditioning Factors. **Annals New York Academy Of Sciences** p. 1-26; 2006.

WHITE, A. M. et al. Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 73, p. 673–677, 2002.

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.

WHITE, A.M.; SWARTZWELDER, H.S. Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1021, p. 206–220, 2004.

WHITE, F.J. et al. Repeated administration of cocaine or amphetamine alters neuronal responses to glutamate in the mesoaccumbens dopamine system. **J Pharmacol. Exp. Ther.** v. 273, p. 445-54, 1995.

WHITE, F.J.; KALIVAS, P.W. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. **Drug Alcohol Depend.** v. 51, p. 141-53, 1998.

WHITE, N.M. Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. **Addiction** v. 91, p. 921–49; discussion p. 51–65, 1996.

WILLEBOORDSE, F.H. Dynamical advantages of scale-free networks. **Physical Reviews Letters** v. 96, 018702, 2006.

WINSTANLEY, C.A. The orbitofrontal cortex, impulsivity, and addiction: probing orbitofrontal dysfunction at the neural, neurochemical, and molecular level. **Ann N. Y. Acad. Sci** v. 1121, p. 639–55, 2007.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological Review** v. 94, p. 469–492, 1987.

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

WITT, E.D. Mechanisms of alcohol abuse and alcoholism in adolescents: a case for developing animal models. **Behav. Neural. Biol.** v. 62, p. 168-77, 1994.

WITT, E.D. Puberty, hormones, and sex differences in alcohol abuse and dependence. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 29, p. 81–95, 2007.

WOLF, M.E. Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. **Mol. Interv.** v. 2, p. 146-57, 2002.

WOLF, M.E. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. **Prog. Neurobiol.** v. 54, p. 679-720, 1998.

WOLFFGRAMM, J.; HEYNE, A. From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. **Behav Brain Res.** v. 70, p. 77–94, 1995.

WRIGHT, J.M.; PEOPLES, R.W.; WEIGHT, F.F. Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. **Brain Res.** v. 738, p. 249-56, 1996.

WRÓBEL, M. Acquisition and expression of ethanol-induced conditioned place preference in mice is inhibited by naloxone. **Pharmacol Rep.** v. 63, p. 79-85, 2011.

WU, Q. et al. Concurrent autoreceptor-mediated control of dopamine release and uptake during neurotransmission: an in vivo voltammetric study. **J. Neurosci.** v. 22, p. 6272–6281, 2002.

XI Z. X. et al. Modulation of group II metabotropic glutamate receptor signaling by chronic cocaine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 303, p. 608–615, 2002.

XIAO; C. et al. Ethanol facilitates glutamatergic transmission to dopamine neurons in the ventral tegmental area. **Neuropsychopharmacology.** v. 34, p. 307-18, 2009.

YAKA, R. et al. Fyn kinase and NR2B-containing NMDA receptors regulate acute ethanol sensitivity but not ethanol intake or conditioned reward. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 27, p. 1736-42, 2003.

YAN, Q.S. et al. Involvement of 5-HT_{1B} receptors within the ventral tegmental area in ethanol-induced increases in mesolimbic dopaminergic transmission. **Brain Res.** v. 1060, p. 126–137, 2005.

YANG, X.; HORN, K.; WAND, G.S. Chronic ethanol exposure impairs phosphorylation of CREB and CRE-binding activity in rat striatum. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 22, p. 382-90, 1998.

YIN, H. H.; KNOWLTON, B. J. The role of the basal ganglia in habit formation. **Nature Rev. Neurosci.** v. 7, p. 464–476, 2006.

YOSHIMOTO, K. et al. Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. **Alcohol** v. 9, p. 17–22, 1991.

YOSHIMURA, M.; TABAKOFF, B. Selective effects of ethanol on the generation of cAMP by particular members of the adenylyl cyclase family. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 19, p. 1435–1440, 1995.

ZACHARIOU, V. et al. An essential role for DeltaFosB in the nucleus accumbens in morphine action. **Nat. Neurosci.** v. 9, p. 205-11, 2006.

ZEIGLER, D.W. et al. The neurocognitive effects of alcohol on adolescents and college students. **Prev. Med.** v. 40, p. 23–32, 2005.

ZHU, W.; BIE, B.; PAN, Z.Z. Involvement of non-NMDA glutamate receptors in central amygdala in synaptic actions of ethanol and ethanol-induced reward behavior. **J. Neurosci.** v. 27, p. 289-98, 2007.

ZUBA, D. et al. Concentration of ethanol and other volatile compounds in the blood of acutely poisoned alcoholics. **Alcohol** v. 26, p. 17-22, 2002.

ANEXO I

Changes in extracellular levels of glutamate in the nucleus accumbens after ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent and adult mice

Priscila Fernandes Carrara-Nascimento^a, William C. Griffin III^b, Daniel Mazzeo Pastrello^a,
M. Foster Olive^b, Rosana Camarini^{a,*}

^a*Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*

^b*Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA*

Received 24 February 2010; received in revised form 20 January 2011; accepted 24 January 2011

Abstract

Repeated administration of low doses of ethanol gradually increases locomotor responses to ethanol in adult Swiss mice. This phenomenon is known as behavioral sensitization. However, we have shown that adolescent Swiss mice show either behavioral tolerance or no sensitization after repeated ethanol injections. Although the mesolimbic dopamine system has been extensively implicated in behavioral sensitization, several studies have demonstrated an important role of glutamatergic transmission in this phenomenon. In addition, relatively few studies have examined the role of developmental factors in behavioral sensitization to ethanol. To examine the relationship between age differences in behavioral sensitization to ethanol and the neurochemical adaptations related to glutamate within nucleus accumbens (NAc), *in vivo* microdialysis was conducted in adolescent and adult Swiss mice treated with ethanol (1.8 g/kg) or saline for 15 days and subsequently challenged with an acute dose (1.8 g/kg) of ethanol 6 days later. Consistent with previous findings, only adult mice demonstrated evidence of behavioral sensitization. However, ethanol-treated adolescent mice demonstrated a $196.1 \pm 40.0\%$ peak increase in extracellular levels of glutamate in the NAc after ethanol challenge in comparison with the basal values, whereas ethanol-treated adult mice demonstrated a $52.2 \pm 6.2\%$ reduction in extracellular levels of glutamate in the NAc after ethanol challenge. These observations suggest an age-dependent inverse relationship between behavioral and glutamatergic responses to repeated ethanol exposure. © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Adolescent; Glutamate; Behavioral sensitization; Mice; Microdialysis; Nucleus accumbens

Introduction

During adolescence, maturational changes in the brain contribute to numerous age-specific behaviors that are unique to this stage of development. Brain reward systems related to drug dependence also undergo significant structural and neurochemical rearrangements during this period. Adolescent individuals are particularly prone to use alcohol and other drugs of abuse (Spear, 2000). Drug use during adolescence may result in critical neuroadaptive changes that subsequently increase the vulnerability of developing addiction later in life (Crews et al., 2007; Grant and Dawson, 1997; Spear, 2000).

According to the 2007 U.S. National Survey on Drug Use and Health, the rate of current alcohol use among youths aged 12–17 years was 15.9% in 2007 (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Office of Applied Studies, 2008). Estimates obtained in a household survey conducted by the “Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicótropicas” in Brazil, showed that 54.4% of adolescents aged 12–17 years have used alcoholic drinks at least once in their lifetime (Galduróz and Carlini, 2007). Higher rates of alcohol consumption by some adolescent populations may increase the frequency of alcohol abuse problems later in adulthood. In animals, adolescent rats consume more ethanol than adults in voluntary drinking paradigms under continuous- (Brunell and Spear, 2005; Truxell et al., 2007) and limited-access conditions (Maldonado et al., 2008).

Repeated exposure to drugs of abuse in laboratory animals, including ethanol, produce long-lasting neuroadaptations in

* Corresponding author. Tel.: +55-11-3091-7756; fax: +55-11-3091-7756.

E-mail address: camarini@icb.usp.br (R. Camarini).

reward systems critically involved in incentive motivation that persist long after drug exposure has been discontinued (Nestler, 2001). Behavioral adaptations to repeated drug administration include the development of tolerance and sensitization, which are characterized by reduced and increased responsiveness to the drug, respectively. Neurochemical adaptations are related to alterations in reward-related neuronal signaling pathways and are relevant to drug craving and compulsive aspects of addiction (Ron and Jurd, 2005). In animal models, such alterations are manifested behaviorally. For example, repeated administration of the same dose of a drug results in a progressive increase in the locomotor response to drug administration, a phenomenon known as behavioral sensitization. This phenomenon has been associated with sensitization to the incentive motivational effects of drugs (Robinson and Berridge, 2001; Wise and Bozarth, 1987).

Behavioral ontogenic studies have demonstrated that adolescent animals show reduced development or expression of behavioral sensitization to ethanol (Faria et al., 2008; Stevenson et al., 2008); increased sensitivity to the acute locomotor stimulant, anxiolytic-like, and ataxic effects of ethanol (Hefner and Holmes, 2007); increased sensitivity to the appetitive motivational effects of ethanol (Pautassi et al., 2008); and consume more ethanol (Brunell and Spear, 2005; Doremus et al., 2005; Maldonado et al., 2008) when compared with adults. It is known that ethanol is a potent inhibitor of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subtype for glutamate, and prolonged ethanol exposure leads to a compensatory upregulation of NMDA receptor function (Hoffman et al., 1989; Lovinger et al., 1989; Melendez et al., 2005). Coadministration of the noncompetitive NMDA receptor antagonist dizocilpine (MK-801) with ethanol blocks the development of ethanol-induced behavioral sensitization (Broadbent and Weitemier, 1999; Camarini et al., 2000). These findings suggest that glutamatergic transmission is involved in the behavioral alterations produced by repeated ethanol exposure. Moreover, studies have shown that acute ethanol exposure increases extracellular levels of glutamate in the nucleus accumbens (NAc) (Kapasova and Szumlinski, 2008; Szumlinski et al., 2007), a forebrain region critically involved in the reinforcing properties of various drugs of abuse. Moreover, blockade of glutamatergic signaling in the NAc attenuates ethanol consumption and reinforcement (Cuzzoli et al., 2009; Gass and Olive, 2009).

Taken together, these findings suggest that glutamatergic transmission plays an important role in behavioral responses to repeated ethanol exposure and in the motivational effects of ethanol. However, little is known about the effects of repeated ethanol exposure on glutamatergic transmission in the NAc at different stages of development (i.e., adolescence vs. adulthood). Therefore, the present study was designed to examine the relationship between age-related differences in the expression of behavioral sensitization to ethanol and changes in extracellular

glutamate levels in the NAc produced by ethanol in adolescent and adult mice.

Materials and methods

Subjects

Adult male Swiss mice (postnatal day [PND] 57–58 for adults, PND 27–28 for adolescents at the start of the experiments [CEDEME, São Paulo, Brazil]) were used as subjects. Mice were housed in groups of five in standard Plexiglas cages in a colony room with controlled lighting (12:12 light–dark cycle, with lights on at 6:30 a.m.) and temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) conditions. Food and water were provided ad libitum. Mice were allowed to adapt to the colony room for at least 5 days before experimentation. All experiments were carried out between 8:30 a.m. and 11:30 a.m. All procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo.

Drugs

Ethanol (95% vol/vol; Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brazil) was dissolved in 0.9% wt/vol sodium chloride (physiological saline [SAL]) to produce a 20% vol/vol ethanol solution and was administered through the intraperitoneal (i.p.) route at a dose of 1.8 g/kg. Control animals received equivalent volumes of SAL by i.p. injection.

Procedures

A summary of the experimental schedule is shown in Fig. 1. Adolescent or adult mice ($n = 12$ per group) were treated with either SAL or ethanol for 15 consecutive days. On the first 2 days before starting the ethanol treatment, the mice received an injection of SAL and were placed in the open-field apparatus 5 min after the injection for a period of 5 min to habituate the animals to injection procedures and the locomotor activity monitoring environment. Locomotor activities were measured on the 1st, 7th, and 15th days of the experiment. Microdialysis was conducted 6 days after the last ethanol injection. On day 21 (6 days after the last ethanol injection), all mice received an acute i.p. injection of ethanol (1.8 g/kg). Two additional control groups (adolescent and adult) were administered an equivalent volume of SAL on day 21 to control for possible effects of handling and/or injection stress on extracellular glutamate levels.

For each locomotor activity assessment, animals were placed in the center of a cylindrical open-field arena (40-cm diameter). The open field used consisted of a circular wooden arena (40 cm in diameter and 35 cm high) painted blue. A video camera installed 230 cm above the apparatus was connected to a computer located outside of the experimental chamber. Horizontal locomotor activity was quantified by

Fig. 1. Summary of the experimental paradigm. Twelve mice/group were used in this experiment (except for the SAL control groups, which consisted of seven mice/group). On the first 2 habituation days (H₁ and H₂), all mice received SAL. During the treatment phase, the mice were treated daily with SAL or 1.8 g/kg i.p. ethanol (D₁–D₁₅). On the day after the last ethanol injection (i.e., D₁₆), the mice underwent stereotaxic implantation of microdialysis guide cannulae. On D₂₀, microdialysis probes were implanted, and microdialysis sample collection was performed on D₂₁. A separate set of animals underwent identical ethanol or SAL treatment but in lieu of microdialysis procedures; blood ethanol concentrations were measured on D₂₁. Star denotes assessment of open-field locomotor activity. SAL = saline; D = day.

Ethovision software (Noldus, Wageningen, The Netherlands) for 5 min after a post-ethanol or SAL injection time of 5 min.

Surgery

After locomotor sensitization procedures, mice were implanted with intracerebral guide cannulae for *in vivo* microdialysis sampling. Anesthesia was induced with 5% isoflurane with oxygen as a carrier gas and maintained at 2–3% during surgery. The mice were placed into a stereotaxic frame, the animal's head was shaved and scrubbed with a betadine solution, and an incision was made to expose the skull. Two holes were drilled in the skull approximately 3.0 mm lateral and 3.0 mm posterior to bregma, where miniature skull screws were inserted. An additional hole was drilled anterior to bregma, and stainless steel guide cannulae (15 mm in length) aimed that the NAc were lowered to a depth of 5.0 mm from skull surface using the following coordinates from bregma for the NAc (anteroposterior: +1.7 mm; lateral: +0.9 mm) (Paxinos and Franklin, 2001). The guide cannulae were fixed to the skull using dental resin, and a dummy probe was inserted into the guide cannula to prevent obstruction and contamination from external debris. After surgery, animals were individually housed and allowed to recover for 4 days before microdialysis procedures.

In vivo microdialysis procedures

On the afternoon before microdialysis procedures, the dummy probe was removed and microdialysis probes (CMA/7; CMA Microdialysis, North Chelmsford, MA) equipped with 1-mm cuprophane membranes were inserted into the guide cannula. The mice were anesthetized during probe implantation. Probes were perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF; Harvard Apparatus, Holliston, MA) through syringes located in a syringe pump (KD Scientific Inc., New Hope, PA). Probes were connected to the syringe pump through fluorinated ethylene-propylene tubing (FEP, 0.005 in ID). The composition of the aCSF (in mM) was as follows: Na, 150; K, 3.0; Ca, 1.4; Mg, 0.8; P, 1.0; and Cl, 155. Microdialysis procedures were conducted 6 days after the last ethanol injection. After implantation of the

microdialysis probe, microdialysis tubing was connected to a dual-channel liquid swivel (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, MA) through FEP tubing, and the flow rate was set to 0.5 μ L/min. After overnight equilibration, the flow rate was adjusted to 2.0 μ L/min. One hour after this adjustment, dialysis samples were collected at 15-min intervals. After four baseline samples were collected, all mice received an acute i.p. injection of ethanol (1.8 g/kg; 20% wt/vol), followed by the collection of eight additional samples. SAL control groups received an i.p. injection of SAL. The samples were stored at -80°C until analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) (see in the following).

HPLC analysis of glutamate

Dialysate glutamate content was determined by an HPLC system coupled with electrochemical detection (HPLC-ED; ESA Inc., North Chelmsford, MA) as described previously (Camarini et al., 2008; Olive et al., 2000). Microdialysis samples were derivatized with *o*-phthalaldehyde and beta-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) automatically by a refrigerated autosampler (ESA, Inc.) immediately before injection onto a HR-80 column (ESA, Inc.) (Camarini et al., 2008; Olive et al., 2000). The mobile phase consisted of 0.1 M NaH_2PO_4 and 25% (vol/vol) methanol (pH = 6.75) and was pumped at a flow rate of 0.6 mL/min. The glutamate levels in the microdialysis samples were quantified by comparing computer-integrated peak areas of samples with those of L-glutamate standards using a three-point calibration curve (0, 0.3, and 1.47 μ M) run every 20 samples. The detection limit of the HPLC assay for glutamate was approximately 0.03 μ M at a signal-to-noise ratio of 3:1. Samples from seven mice with undetectable levels of glutamate were excluded from analyses.

Microdialysis data analysis

Absolute levels of glutamate in the microdialysis samples were converted to percent of baseline dialysate glutamate content. The baseline dialysate levels of glutamate were calculated by averaging the absolute concentration of glutamate in each of the four preinjection dialysate

samples of each individual animal, and then, all concentrations of dialysate glutamate were converted to percents of this baseline according to the animal's individual basal dialysate levels of glutamate.

Histological verification of probe placement

After microdialysis procedures, animals were anesthetized with an overdose of ketamine/xylazine solution. The animal's heart was then exposed, and a heparin-containing solution was injected in the left ventricle. The animals were then perfused transcardially with 4% wt/vol paraformaldehyde in phosphate-buffered SAL (pH = 7.4). After perfusion, brains were removed and placed in a solution containing 4% paraformaldehyde and 10% (wt/vol) sucrose overnight. Brains were then cut on a cryostat at 30- μ m thickness, and the sections were mounted on gelatin-coated slides and then allowed to air dry overnight. The slides were rehydrated in double-distilled water and stained with thionin (Nissl stain) for 15–45 s until the desired staining intensity was reached; then, they were gradually dehydrated in 5-min immersions in ethanol at increasing concentrations (50, 75, 90, 95, and 100%; vol/vol). Probe placement in the NAc was verified according to the atlas of Paxinos and Franklin (2001). Only animals with probe placements restricted to the NAc were included in the data analysis. Eight animals were excluded from the study because of improper probe placement.

Blood ethanol concentration

To address the possibility that age could influence blood ethanol concentrations (BECs) by altered ethanol metabolism, separate groups of mice underwent identical behavioral sensitization procedures as outlined in Fig. 1. Ethanol (1.8 g/kg) was injected through the i.p. route. At 15 and 60 min after ethanol injection, blood samples were obtained from the retro-orbital sinus. At 180 min, animals were sacrificed and trunk blood was collected for BEC determination. Immediately after collection, blood samples were centrifuged for 10 min at 10,000 rpm, and 5 μ L of the plasma supernatant from each sample was analyzed for ethanol concentration using an Analox GL6 Multiassay Analyser (Analox Instruments, Lunenburg, MA). BECs were expressed in mg/dL.

Statistical analyses

All data were analyzed by a mixed three-way analysis of variance (ANOVA), with time as the repeated-measures factor (i.e., day of locomotor activity assessment for behavioral sensitization studies, minutes after ethanol injection for the BEC determination, or time after ethanol injection for glutamate quantification) and treatment (i.e., ethanol or SAL administration on days 1–15) and age group (i.e., adolescent or adult) as the between-subjects factor. Significant interactions were deconstructed for main effects.

Levene's test was used to assess the homogeneity of variances, and if the data passed this test, Newman–Keuls comparison with a mean was used for planned comparisons, where appropriate. The significance level was $\alpha \leq 0.05$.

Results

Age differences in behavioral responses to ethanol

A diagram of the timeline of the experimental procedures is shown in Fig. 1. Figure 2 shows the locomotor activity of adolescent and adult animals treated with ethanol (1.8 g/kg, i.p.) or SAL for 15 consecutive days. Locomotor activity was quantified on the two habituation days that preceded treatment, on the first treatment day (acute), in the middle of the treatment (seventh day), and the last day (15th day). During the two habituation days, decline in activity was observed, consistent with habituation to the testing apparatus. This observation was supported by a significant difference among treatment days ($F_{\text{days}} [1, 44] = 26.03$; $P < .01$).

Significant increases in locomotor activity were observed in mice treated with ethanol as compared with those treated with SAL ($F_{\text{treatment}} [1, 44] = 51.54$; $P < .01$), providing evidence of a stimulant effect of ethanol at this dose. This effect was confirmed by the interaction between treatment and days ($F [2, 88] = 3.77$; $P < .05$). An interaction among age, treatment, and treatment days ($F [2, 88] = 3.14$; $P < .05$) revealed a significant increase in the locomotor activity of ethanol-treated adult animals on the 15th treatment day in comparison with that on the first treatment day. However, adolescent mice showed no differences in locomotor activity across the 15 days of treatment, suggesting that adult but not adolescent mice developed behavioral sensitization to ethanol.

Analysis of the locomotor data from the SAL control groups in a two-way ANOVA revealed a main effect of days ($F [4, 48] = 6.39$; $P < .01$), indicating habituation to the testing apparatus, but no age effect ($F [1, 12] = 0.0005$; $P > .05$) nor an interaction between age and days ($F [4, 48] = 1.28$; $P > .05$).

Basal extracellular levels of glutamate in the NAc

A three-way ANOVA (age $\times$ treatment $\times$ time), with time as a repeated measure, was performed for the four basal levels of glutamate and indicated no differences among groups (all P -values greater than .05), and no significant interactions were observed. The averages $\pm$ standard errors of the mean (S.E.M.) of the dialysate glutamate levels in the first four samples (baseline) for adolescent (SAL and ethanol) and adult (SAL and ethanol) groups were as follows: 0.153 ± 0.08 and 0.185 ± 0.06 μ M, and 0.192 ± 0.05 and 0.13 ± 0.12 μ M, respectively. The averages $\pm$ S.E.M.s of the glutamate levels in the first four samples (baseline) for the adolescent and adult SAL control

Fig. 2. Effects of repeated treatment with ethanol (1.8 g/kg) or saline on locomotor activity in adolescent and adult Swiss mice. #HAB2 < HAB1, indicating habituation to the apparatus. +Ethanol-treated mice presented increased locomotor activity as compared with saline-treated mice. *Ethanol-treated adult mice displayed increased locomotor activity on day 15 as compared with that at the first ethanol injection (day 1). Inset: control adolescent and adult mice that received saline on day 21 showed a similar habituation response (#HAB2 and afterward < HAB1) ($n = 7/\text{group}$). HAB = habituation days.

groups were 0.192 ± 0.04 and $0.196 \pm 0.02 \mu\text{M}$, respectively, and no intra- nor intergroup differences were observed ($P > .05$).

Age differences in glutamate responses to ethanol

A three-way ANOVA (age $\times$ treatment $\times$ time), with time as a repeated measure, performed for the 12 microdialysis samples collected, indicated a significant effect of age ($F_{\text{age}}[1, 36] = 7.93$; $P < .01$); time ($F_{\text{time}}[11, 396] = 6.1$; $P < .01$); an age $\times$ treatment interaction ($F[1, 36] = 28.04$; $P < .051$); an age $\times$ time interaction ($F[11, 396] = 2.18$; $P < .05$); a treatment $\times$ time interaction ($F[11, 396] = 2.19$; $P < .05$); and age $\times$ treatment $\times$ time interaction ($F[11, 396] = 3.92$; $P < .01$). Analysis of the age $\times$ treatment interaction revealed that ethanol-treated adolescent mice demonstrated higher dialysate levels of glutamate than SAL-treated adolescent mice, whereas adult mice presented an inverse relationship.

As shown in Fig. 3, marked age differences were observed regarding the effect of repeated ethanol administration during adolescence and adulthood on extracellular levels of glutamate in the NAc after a subsequent ethanol challenge. Post hoc analysis of the age $\times$ treatment $\times$ time interaction revealed that in ethanol-treated adolescent mice, a subsequent ethanol challenge produced increases in extracellular levels of glutamate from baseline at 15 min after ethanol challenge. In contrast, ethanol-treated adult mice

showed a reduction in extracellular glutamate levels from baseline at 45 min after ethanol challenge. Ethanol-treated adolescent mice demonstrated a $196.1 \pm 40.0\%$ peak increase in extracellular levels of glutamate in the NAc after ethanol challenge in comparison with the basal values, whereas ethanol-treated adult mice demonstrated a $52.2 \pm 6.2\%$ peak reduction in extracellular levels of glutamate in the NAc after ethanol challenge.

In addition, a two-way ANOVA performed for the ethanol-treated mice (age $\times$ time) revealed an age effect ($F[1, 22] = 33.73$; $P < .01$) and an interaction ($F[11, 242] = 5.49$; $P < .01$). Pairwise comparisons of the interaction showed that ethanol-treated adult mice displayed lower levels of extracellular glutamate than ethanol-treated adolescent mice from 15 to 75 min after ethanol challenge. A two-way ANOVA performed for the SAL-treated mice (age $\times$ time) revealed no age effect ($F[1, 14] = 3.99$; $P > .05$) and no interaction ($F[11, 154] = 1.12$; $P > .05$). No statistical differences were found between SAL-treated adult and adolescent mice. Post hoc analysis of the age $\times$ treatment $\times$ time interaction showed that dialysate glutamate levels peak at 15 min over basal levels for SAL-treated adolescent mice ($153 \pm 13.5\%$) and at 30 min for SAL-treated adult mice ($169.3 \pm 18.7\%$) after ethanol challenge. One-way ANOVAs for repeated measures performed for ethanol-treated adolescent mice ($F[11, 121] = 3.29$; $P < .01$); ethanol-treated adult mice ($F[11, 121] = 4.69$; $P < .01$); SAL-treated adolescent

Fig. 3. Age-related differences in dialysate levels of glutamate in the nucleus accumbens after an ethanol challenge (1.8 g/kg) after the behavioral sensitization procedures. (A) Adolescent mice treated repeatedly with ethanol followed by an ethanol challenge (adolescent-ethanol) demonstrated an increase in dialysate levels of glutamate at 15 min postinjection ($*P < .05$ vs. last baseline sample), whereas adult mice treated repeatedly with ethanol followed by an ethanol challenge (adult-ethanol) showed a reduction in dialysate levels of glutamate at 45 min postinjection ($*P < .05$ vs. last baseline sample). Intergroup differences in dialysate glutamate levels were found at 15–75 min postinjection. $^+P < .05$ vs. adolescent-ethanol mice at the same time point. (B) Adolescent and adult mice treated repeatedly with saline (adolescent-SAL and adult-SAL, respectively) showed similar increases in dialysate glutamate levels at 15 and 30 min post-ethanol challenge ($*P < .05$ vs. last baseline sample). However, no intergroup differences were observed. Inset: Administration of saline had no effect on dialysate levels of glutamate in the adolescent and adult saline control groups.

mice ($F[11, 88] = 6.95$; $P < .01$); and SAL-treated adult mice ($F[11, 66] = 2.76$; $P < .01$) confirmed the respective peaks in extracellular levels of glutamate.

Two-way ANOVA performed on the microdialysis data from the SAL control groups revealed no age effect

($F[1, 12] = 1.34$; $P > .05$); no time effect ($F[11, 132] = 1.36$; $P > .05$); nor an interaction of age and time ($F[11, 132] = 0.75$; $P > .05$), demonstrating a lack of effect of handling and/or injection stress on extracellular glutamate levels in the NAc.

Blood ethanol concentration

Table 1 summarizes the BECs measured in SAL- or ethanol-treated adolescent and adult mice on ethanol test day at 15, 60, and 180 min after the administration of 1.8 g/kg ethanol.

Statistical analysis of BECs did not reveal significant effects of age or treatment when comparing the adolescent and adult SAL- or ethanol-treated mice ($F_{\text{age}}[1, 28] = 4.06$; $P > .05$ and $F_{\text{treatment}}[1, 28] = 1.43$; $P > .05$). The only significant effect observed was an effect of time ($F_{\text{time}}[2, 56] = 260.2$; $P < .01$), consistent with ethanol clearance from the blood. There were no significant interactions observed.

Histological results

Diagrams of coronal mouse brain sections showing approximate locations of microdialysis probe membranes located in the NAc are presented in Fig. 4. Animals with incorrect probe placements were excluded from analyses.

Discussion

Our results show that adult, but not adolescent, Swiss mice developed behavioral sensitization to repeated administration of 1.8 g/kg of ethanol. In the present study, adolescent mice demonstrated a trend toward an elevated locomotor response to acute ethanol on day 1 of treatment compared with the adult mice. However, this difference did not reach statistical significance, which could be interpreted as a ceiling effect that masked the sensitized response to the repeated treatment with ethanol. According to the literature, contradictory behavioral responses to psychostimulant drugs have been demonstrated in adolescent rodents when compared with adults, showing increased or decreased locomotor activity in response to cocaine or amphetamine (Camarini et al., 2008; Catlow and Kirstein, 2005; Lanier and Isaacson, 1997; Laviola et al., 1995; Spear and Brake, 1983; Spear and Brick, 1979; Witt, 1994). The intense neural development period of adolescence may account, in part, to the variability in behavioral responses to drugs of abuse. Regardless of the mechanism, the present

Table 1
BEC in saline- or ethanol-treated adolescent and adult mice after an acute ethanol challenge injection (1.8 g/kg) on day 21

Groups	15 min	60 min	180 min
Adolescent-SAL	206.68 ± 14.89	130.21 ± 19.63	7.69 ± 2.19
Adolescent-Ethanol	226.29 ± 7.48	140.49 ± 14.69	7.34 ± 0.69
Adult-SAL	208.08 ± 22.13	163.00 ± 19.05	20.44 ± 6.17
Adult-Ethanol	241.70 ± 5.66	149.95 ± 14.32	10.12 ± 0.37

SAL = saline; BEC = blood ethanol concentration. BECs were measured at 15, 60, and 180 min postinjection. BEC data (expressed in mg/dL) are shown as mean ± standard error of the mean of each treatment group ($n = 8$ per group). No differences were found between adolescent and adult mice (saline or ethanol treated).

Fig. 4. Diagrams of mouse brain coronal sections from the atlas of Paxinos and Franklin (2001) showing approximate locations of microdialysis probes in the nucleus accumbens. Numbers alongside each section represents the distance (in mm) of the section from bregma (B).

locomotor results are in accordance with previous findings from our laboratory (Faria et al., 2008) and those of others using DBA/2J mice (Stevenson et al., 2008). We also found that the ability of repeated ethanol administration to induce behavioral sensitization was inversely related to the effects of a subsequent ethanol challenge on extracellular levels of glutamate in the NAc; that is, in adolescent mice that did not show evidence of locomotor sensitization to ethanol, a subsequent ethanol challenge increased extracellular glutamate levels in the NAc of these mice. In contrast, adult mice, which did show evidence of behavioral sensitization, exhibited a decrease in extracellular levels of glutamate in the NAc after a subsequent ethanol challenge.

Although the neurochemical measurements were not conducted in close temporal proximity to the final locomotor assessment, we speculate that there is a correlation between these two factors. We demonstrated that a withdrawal period did not change the pattern of behavioral responses to a challenge dose of ethanol in adolescent and adult mice pretreated with ethanol (i.e., adolescent mice did not demonstrate locomotor sensitization in contrast to adults [Faria et al., 2008]), which usually express a long-lasting sensitized response to ethanol (Lessov and Phillips, 1998).

A major neural system essential for drug reward and reinforcement involves dopaminergic projections from the ventral tegmental area to the NAc. However, increasing evidence suggests a role of glutamatergic transmission in ethanol reward and reinforcement (Bäckström and Hyttiä, 2004; Biala and Kotlinska, 1999; Camarini et al., 2000; Stephens and Brown, 1999), particularly glutamatergic input from the prefrontal cortex (PFC) to the NAc (Kalivas and Volkow, 2005). The NAc plays a role in the pathophysiology of drug addiction and receives projections from different areas in the PFC. During adolescence, the PFC is relatively underdeveloped, which likely results in the impaired impulse control that is characteristic of this age population. The ability of ethanol-pretreated animals to show greater increases in extracellular levels of glutamate in response to an ethanol challenge as compared with similarly treated adult animals may be a result of enhanced excitability of glutamatergic afferents from the PFC to the NAc in response to ethanol exposure. This may be related to developmental changes in the PFC. For example, in rats, levels of NMDA glutamate receptors in the PFC peak at infancy and subsequently decline with age (Insel et al., 1990). Recently, Henson et al. (2008) demonstrated that the levels of the NR3A subunit of the NMDA receptor change over development in human PFC, with peak levels of expression during early childhood followed by a gradual decrease into adulthood.

Using *in vivo* microdialysis to measure extracellular glutamate levels after ethanol treatment, Yan et al. (1998) observed that rats receiving *i.p.* injection of ethanol at a dose of 2.0 g/kg demonstrated significantly decreased extracellular glutamate levels in the NAc. However, recent studies have demonstrated that this effect is dependent on ethanol

dose and genetic background of the animal (Dahchour et al., 2000; Kapasova and Szumlinski, 2008; Selim and Bradberry, 1996; Szumlinski et al., 2005, 2008). Low doses of ethanol generally elevate extracellular glutamate in the NAc (Lominac et al., 2006; Moghaddam and Bolinao, 1994), whereas higher doses of ethanol produce reductions in extracellular glutamate levels in this region (Moghaddam and Bolinao, 1994).

Although less well studied than the mesolimbic dopamine system, evidence supports a potential role of glutamatergic transmission in the NAc in some of the behavioral effects of acute ethanol administration. Differences in the NAc glutamate response to ethanol are observed between rats and mice that exhibit different behavioral responses to ethanol (Dahchour et al., 2000; Kapasova and Szumlinski, 2008; Selim and Bradberry, 1996). For example, acute ethanol (1.0 g/kg) enhanced extracellular levels of glutamate in the NAc in Lewis rats (Selim and Bradberry, 1996). Interestingly, animals selected for differences in sensitivity to the hypnotic effects of ethanol (low-alcohol sensitivity [LAS] rats and high-alcohol sensitivity rats [HAS]) also differed in their responses to ethanol with regard to extracellular glutamate levels in the NAc, as ethanol administration produced an increase in extracellular glutamate levels in the NAc of LAS rats and a decrease in HAS rats (Dahchour et al., 2000).

Recently, Kapasova and Szumlinski (2008) demonstrated strain differences in changes in extracellular levels of glutamate in the NAc after acute and repeated ethanol administration. In this study, microdialysis was conducted in two mice strains: the alcohol-preferring C57BL/6J mice and alcohol-avoiding DBA/2J mice. Besides differences in ethanol preference, these strains also differ in behavioral responses to *i.p.* injections of ethanol, with DBA/2J mice showing sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol, whereas in C57BL/6J mice, this phenomenon is not observed. The authors demonstrated that C57BL/6J mice exhibited a sensitized glutamate response to ethanol after repeated treatment, whereas DBA/2J presented tolerance to this effect. Interestingly, our data showed that adult mice, which presented the typical behavioral sensitization, failed to demonstrate an ability of ethanol to enhance extracellular levels of glutamate in the NAc. On the other hand, adolescent mice, which did not exhibit sensitization to the locomotor effects of ethanol, displayed an increased glutamate response to repeated ethanol treatment. The age-dependent differences in glutamate response to ethanol could not be attributed to alterations induced by handling or injection stress because we found no changes in dialysate glutamate levels after a SAL challenge on day 21 in adolescent or adult mice. Taken together, the present data are in agreement with those of Kapasova and Szumlinski (2008) and reinforce the hypothesis that glutamatergic transmission plays an important role in behavioral sensitization to ethanol.

In conclusion, we show that there is an inverse relationship between the development of ethanol-induced behavioral sensitization and the ability of a subsequent ethanol

challenge to increase extracellular levels of glutamate in the NAc in adolescent versus adult mice. Considering that it has been demonstrated that pre-exposure to ethanol during adolescence can promote alcohol intake in adult rodents (Pascual et al., 2009), these findings may be of relevance to the enhanced propensity to develop substance abuse problems in adults who are repeatedly exposed to ethanol during adolescence. However, clearly, more work is necessary to confirm this suggestion and to define the mechanistic links between alterations in glutamatergic signaling and ethanol-induced behavioral changes.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and grant AA013852 from the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (USA). The authors would like to thank André Veloso Lima Rueda for expert technical assistance.

References

- Bäckström, P., and Hyttiä, P. (2004). Ionotropic glutamate receptor antagonists modulate cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 28, 558–565.
- Biala, G., and Kotlinska, J. (1999). Blockade of the acquisition ethanol-induced conditioned place preference by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 175–182.
- Broadbent, J., and Weitemier, A. Z. (1999). Dizolcipine (MK-801) prevents the development of sensitization to ethanol in DBA/2J mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 283–288.
- Brunell, S. C., and Spear, L. P. (2005). Effect of stress on voluntary intake of a sweetened ethanol solution in pair-housed adolescent and adult rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 1641–1653.
- Camarini, R., Frussa-Filho, R., Monteiro, M. G., and Calil, H. M. (2000). MK-801 blocks the development of behavioral sensitization to the ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24, 285–290.
- Camarini, R., Griffin, W. C., Yanke, A. B., Santos, B. R., and Olive, M. F. (2008). Effects of adolescent exposure to cocaine on locomotor activity and extracellular dopamine and glutamate levels in nucleus accumbens of DBA/2J mice. *Brain Res.* 1193, 34–42.
- Catlow, B. J., and Kirstein, C. L. (2005). Heightened cocaine-induced locomotor activity in adolescent compared to adult female rats. *J. Psychopharmacol.* 19, 443–447.
- Cozzoli, D. K., Goulding, S. P., Zhang, P. W., Xiao, B., Hu, J. H., Ary, A. W., et al. (2009). Binge drinking upregulates accumbens mGluR5-Homer2-PI3K signaling: functional implications for alcoholism. *J. Neurosci.* 29, 8655–8668.
- Crews, F., He, J., and Hodge, C. (2007). Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 189–199.
- Dahchour, A., Hoffman, A., Deitrich, R., and De Witte, P. (2000). Effects of ethanol on extracellular amino acid levels in high- and low-alcohol sensitive rats: a microdialysis study. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24, 548–553.
- Doremus, T. L., Brunell, S. C., Rajendran, P., and Spear, L. P. (2005). Factors influencing elevated ethanol consumption in adolescent relative to adult rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 1796–1808.
- Faria, R. R., Lima Rueda, A. V., Sayuri, C., Soares, S. L., Malta, M. B., Carrara-Nascimento, P. F., et al. (2008). Environmental modulation of ethanol-induced locomotor activity: correlation with neuronal activity in distinct brain regions of adolescent and adult Swiss mice. *Brain Res.* 1239, 127–140.
- Galduróz, J. C., and Carlini, E. A. (2007). Use of alcohol among the inhabitants of the 107 largest cities in Brazil—2001. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 367–375.
- Gass, J. T., and Olive, M. F. (2009). Role of protein kinase C epsilon (PKCε) in the reduction of ethanol reinforcement due to mGluR5 antagonists in the nucleus accumbens shell. *Psychopharmacology* 204, 587–597.
- Grant, B. F., and Dawson, D. A. (1997). Age at onset of alcohol use and its association with DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J. Subst. Abuse* 9, 103–110.
- Hefner, K., and Holmes, A. (2007). An investigation of the behavioral actions of ethanol across adolescence in mice. *Psychopharmacology* 191, 311–322.
- Henson, M. A., Roberts, A. C., Salimi, K., Vadlamudi, S., Hamer, R. M., Gilmore, J. H., et al. (2008). Developmental regulation of the NMDA receptor subunits, NR3A and NR1, in human prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* 18, 2560–2573.
- Hoffman, P. L., Rabe, C., Moses, F., and Tabakoff, B. (1989). N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J. Neurochem.* 52, 1937–1940.
- Insel, T. R., Miller, L. P., and Gelhard, R. E. (1990). The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain—I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* 35, 31–43.
- Kalivas, P. W., and Volkow, N. D. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry* 162, 1403–1413.
- Kapasova, Z., and Szumlinski, K. (2008). Strain differences in alcohol-induced neurochemical plasticity: a role for accumbens glutamate in alcohol intake. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 617–631.
- Lanier, L. P., and Isaacson, R. L. (1997). Early developmental changes in the locomotor response to amphetamine and their relation to hippocampal function. *Brain Res.* 126, 567–575.
- Laviola, G., Wood, R. D., Kuhn, C., Francis, R., and Spear, L. P. (1995). Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 345–357.
- Lessov, C. N., and Phillips, T. J. (1998). Duration of sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol in mice. *Psychopharmacology* 135, 374–382.
- Lominac, K. D., Kapasova, Z., Hannun, R. A., Patterson, C., Middaugh, L. D., and Szumlinski, K. K. (2006). Behavioral and neurochemical interactions between group 1 mGluR antagonists and ethanol: potential insight into their anti-addictive properties. *Drug Alcohol. Depend.* 85, 142–156.
- Lovinger, D. M., White, G., and Weight, F. F. (1989). Ethanol inhibits NMDA-activated ion currents in hippocampal neurons. *Science* 243, 1721–1724.
- Maldonado, A. M., Finkbeiner, L. M., Alipour, K. K., and Kirstein, C. L. (2008). Voluntary ethanol consumption differs in adolescent and adult male rats using a modified sucrose-fading paradigm. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 1574–1582.
- Melendez, R. I., Hicks, M. P., Cagle, S. S., and Kalivas, W. P. (2005). Ethanol exposure decreases glutamate uptake in the nucleus accumbens. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 326–333.
- Moghaddam, B., and Bolinao, M. L. (1994). Biphasic effect of ethanol on extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus and the nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.* 178, 99–102.
- Nestler, E. J. (2001). Molecular bases of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 119–128.
- Olive, M. F., Mehmert, K. K., and Hodge, C. W. (2000). Microdialysis in the mouse nucleus accumbens: a method for detection of monoamine

- and amino acid neurotransmitters with simultaneous assessment of locomotor activity. *Brain Res.* 5, 16–24.
- Pascual, M., Boix, J., Felipo, V., and Guerri, C. (2009). Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *J. Neurochem.* 108, 920–931.
- Pautassi, R. M., Myers, M., Spear, L. P., Molina, J. C., and Spear, N. E. (2008). Adolescent but not adult rats exhibit ethanol-mediated appetitive second-order conditioning. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 2016–2027.
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed., San Diego, CA: Academic Press.
- Robinson, T. E., and Berridge, K. C. (2001). Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96, 103–114.
- Ron, D., and Jurd, R. (2005). The “ups and downs” of signaling cascades in addiction. *Sci. STKE* 309, re 14, Review.
- Selim, M., and Bradberry, C. W. (1996). Effect of ethanol on extracellular 5-HT and glutamate in the nucleus accumbens and prefrontal cortex: comparison between Lewis and Fischer 344 rat strains. *Brain Res.* 716, 157–164.
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 417–463.
- Spear, L. P., and Brake, S. C. (1983). Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacology responsivity in rats. *Dev. Psychobiol.* 16, 83–109.
- Spear, L. P., and Brick, J. (1979). Cocaine-induced behavior in the developing rat. *Behav. Neural Biol.* 26, 401–415.
- Stephens, D. N., and Brown, G. (1999). Disruption of operant oral self-administration of ethanol, sucrose, and saccharin by the AMPA/kainite antagonist NBQX, but not the AMPA antagonist, GYKI 52466. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 1914–1920.
- Stevenson, R. A., Besheer, J., and Hodge, C. W. (2008). Comparison of ethanol locomotor sensitization in adolescent and adult DBA/2J mice. *Psychopharmacology* 197, 361–370.
- Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Office of Applied Studies (2008). Results from the 2007 National Survey on Drug Use and Health: National Findings (NSDUH Series H-34, DHHS Publication No. SMA 08-4343). Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services.
- Szumliński, K. K., Ary, A. W., Lominac, K. D., Klugmann, M., and Kippin, T. E. (2008). Accumbens Homer2 overexpression facilitates alcohol-induced neuroplasticity in C57BL/6 mice. *Neuropsychopharmacology* 33, 1365–1378.
- Szumliński, K. K., Diab, M. E., Friedman, R., Henze, L. M., Lominac, K. D., and Bowers, M. S. (2007). Accumbens neurochemical adaptations produced by binge-like alcohol consumption. *Psychopharmacology* 190, 415–431.
- Szumliński, K. K., Lominac, K. D., Oleson, E. B., Walker, J. K., Mason, A., Dehoff, M. H., et al. (2005). Homer2 is necessary for EtOH-induced neuroplasticity. *J. Neurosci.* 25, 7054–7061.
- Truxell, E. M., Molina, J. C., and Spear, N. E. (2007). Ethanol intake in the juvenile, adolescent, and adult rat: effects of age and prior exposure to ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 31, 755–765.
- Wise, R. A., and Bozarth, M. A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol. Rev.* 94, 469–492.
- Witt, E. D. (1994). Mechanisms of alcohol abuse and alcoholism in adolescents: a case for developing animal models. *Behav. Neural Biol.* 62, 168–177.
- Yan, Q. S., Reith, M. E. A., Yan, S. G., and Jobe, P. C. (1998). Effect of systemic ethanol on basal and stimulated glutamate releases in the nucleus accumbens of freely moving Sprague–Dawley rats: a microdialysis study. *Neurosci. Lett.* 258, 29–32.

ANEXO II

Campo Aberto

Preferência Condicionada
de Lugar

Câmara de Inalação
de Vapor de Alcool

Mesa de Cirurgia

Sistema de Microdiálise