

Maria Cristina Valzachi Rocha Maluf

Efeitos do tratamento com cocaína sobre parâmetros comportamentais e na expressão de CREB/pCREB e BDNF em camundongos adolescentes e adultos

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

São Paulo
2011

Maria Cristina Valzachi Rocha Maluf

Efeitos do tratamento com cocaína sobre parâmetros comportamentais e na expressão de CREB/pCREB e BDNF em camundongos adolescentes e adultos

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre 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 parcial

Rocha Maluf, Maria Cristina Valzachi.

Efeitos do tratamento com cocaína sobre parâmetros comportamentais e na expressão de CREB/pCREB e BDNF em camundongos adolescentes e adultos / Maria Cristina Valzachi Rocha Maluf. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Rosana Camarini.

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

Versão do título para o inglês: Effects of cocaine treatment in behavioral parameters and in the expression of CREB/pCREB and BDNF in adolescent and adult mice.

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

ICB/SBIB0132/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Cristina Valzachi Rocha Maluf.

Título da Dissertação: Efeitos do tratamento com cocaína sobre parâmetros comportamentais e na expressão de CREB/pCREB e BDNF em camundongos adolescentes e adultos.

Orientador(a): Rosana Camarini.

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

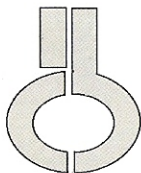
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**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

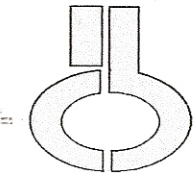
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **59** nas fls. **70** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Rosana Camarini, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeitos do tratamento com cocaína sobre parâmetros comportamentais e na expressão de CREB/pCREB e BDNF em camundongos adolescentes e adultos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Sabrina Lucio Soares, André Rueda, Daniel Pastrello**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **25.08.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 26 de agosto de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p style="text-align: center;">Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011)3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p style="text-align: right;">COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEEA.67.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 59/09/CEEA datado de 25/08/069, por solicitação da Profa. Dra. Rosana Camarini, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna Maria Cristina Valzachi Rocha ao projeto de pesquisa "*Efeitos do tratamento com cocaína sobre parâmetros comportamentais e na expressão de CREB/pCREB e BDNF em camundongos adolescentes e adultos*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 21 de outubro de 2009.



Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEEA- ICB/USP

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam e confiam na Ciência do Brasil.
Em especial, ao meu marido Rodrigo por todo o apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me oferecido um caminho difícil, mas extremamente rico!

À Profa. Dra. Rosana Camarini, minha orientadora, por toda confiança depositada em meu trabalho e pelas oportunidades oferecidas. Agradeço pela dedicação e desprendimento em perder horas de sono e de merecido descanso com correções e estudos, até mesmo nos momentos em que a saúde exigia pausa, e pela sua incessante busca por aprimoramento, sempre disposta a utilizar tudo o que a Ciência tem para oferecer.

À Profa. Dra. Elizabeth Teodorov, com quem tive o privilégio de aprender muito do que sei sobre a prática da Ciência. Agradeço pela oportunidade de ter recebido o apoio dessa pessoa sempre disposta a ensinar e transmitir todo seu conhecimento.

À Profa. Dra. Tania Marcourakis por toda ajuda no meu exame de Qualificação, por ter me acompanhado, naquele momento, como se fosse minha orientadora.

A todos os alunos e técnicos do Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde tive o privilégio de realizar meu mestrado, por toda a ajuda, conselhos, apoio, companheirismo e amizade. Em especial ao André, por me socorrer, literalmente, nas horas de “sacrifício” e por me ajudar espontaneamente, juntamente com a Pri, durante a preparação da minha apresentação para a Qualificação.

Ao Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos da Universidade Federal do ABC, ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e ao Laboratório de Farmacologia Bioquímica dos Radicais Livres e Inflamação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo inestimável auxílio.

À Universidade de São Paulo, instituição responsável pela minha formação acadêmica desde a graduação, por oferecer todos os meios necessários para o meu desenvolvimento na área acadêmico-científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

“A alma se perturba e confunde quando se serve do corpo para apreciar qualquer assunto; sente vertigens como se estivesse ébria, pois se une a coisas que são, por sua natureza, sujeitas a mudanças. Em vez disso, quando ela contempla sua própria essência, volta-se para o que é puro, eterno, imortal e, sendo dessa mesma natureza, aí permanece ligada pelo maior tempo que puder. É aí que suas perturbações então findam, pois ela está unida ao que é imutável, e a este estado de alma é o que se chama de sabedoria.”

Sócrates/ Platão

RESUMO

Rocha MCV. Efeitos do tratamento com cocaína sobre parâmetros comportamentais e na expressão de CREB/pCREB e BDNF em camundongos adolescentes e adultos [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A fase da adolescência difere da fase adulta em parâmetros comportamentais e neuroquímicos. Alterações do fator de transcrição CREB, da neurotrofina BDNF e seu receptor TrkB têm sido encontradas no circuito dopaminérgico-mesolímbico com o uso de cocaína. Este estudo avalia os efeitos da administração de cocaína em camundongos adolescentes e adultos na sensibilização psicomotora, no comportamento tipo ansiedade, nos níveis protéicos de CREB/pCREB, BDNF e TrkB e na expressão gênica de BDNF e TrkB no córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo desses animais. Os adolescentes mostraram-se mais suscetíveis aos efeitos da droga, com maior ativação locomotora, maior efeito de condicionamento ao ambiente, maior nível de ansiedade induzido pela droga e alterações neuroquímicas distintas dos adultos (diminuição dos níveis de CREB com o tratamento repetido e aumento na abstinência em CPF e hipocampo; aumento de RNAm de BDNF após tratamento agudo, repetido e abstinência em CPF e diminuição no hipocampo), sugerindo maior vulnerabilidade desse grupo no desenvolvimento da dependência.

Palavras-chave: Adolescentes. Cocaína. Camundongos. Comportamento. Proteínas. Expressão gênica.

ABSTRACT

Rocha MCV. Effects of cocaine treatment in behavioral parameters and in the expression of CREB/pCREB and BDNF in adolescent and adult mice. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The adolescence differs from adulthood in behavioral and neurochemical aspects. Changes in the activity of the transcriptional factor CREB, neurotrophin BDNF and its receptor TrkB have been found in the mesolimbic-dopaminergic circuitry following the use of cocaine. This study evaluates the effects of cocaine administration in adolescent and adult mice in the locomotor sensitization and in the anxiety-like behavior. The study also accesses the protein levels of CREB/pCREB, BDNF and TrkB, and gene expression of BDNF and TrkB in the prefrontal cortex and hippocampus of these animals. In a general way, adolescents were more susceptible to drug effects, with increased levels of locomotor activity, environmental conditioning, anxiety-like behavior and greater neurochemical alterations, suggesting an increased risk in the development of drug dependence.

Keywords: Adolescents. Cocaine. Mice. Behavior. Proteins. Gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPC - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- ANOVA - Análise de Variância
- ATP - Adenosina trifosfato
- AVT - Área Ventral Tegmental
- BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo
- CA - Campo-aberto
- $C\alpha$ - Subunidade catalítica da PKA
- Ca-Cam - Complexo cálcio-calmodulina
- Ca-CamK - Quinase cálcio-calmodulina
- CBP - Proteína de ligação ao CREB
- CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas
- CPF - Córtex pré-frontal
- CPFm - Córtex pré-frontal medial
- CRE - Sítio de ligação para o CREB
- CREB - Proteína de ligação responsiva ao AMPC
- Ct - Ciclo do *threshold*
- D(1-20) - Dias de tratamento dos animais
- DNAc - DNA complementar
- EC - Estímulo condicionado
- ENC - Estímulo não-condicionado
- GPCR - Receptor acoplado à proteína G
- H(1-2) - Dias de habituação dos animais ao aparato
- ICB-USP - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
- KID - Domínio indutível de quinase
- LCE - Labirinto em cruz elevado
- LTP - Potenciação de longo prazo
- MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
- NAc – Núcleo Accumbens
- NF-kB - Fator nuclear-kappaB
- NGF - Fator de crescimento neural
- NT - Neurotrofina
- NTC - Controle negativo da qPCR (amostras sem DNAc)

pCREB - CREB fosforilado

PI3/Akt - Fosfatidilinositol-3-quinase/Akt

PKA - Proteína quinase A

PP - Fosfatase

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

R - Subunidade regulatória da PKA

Ras/ERK - Via da Ras/proteína quinase regulada por sinal extracelular

RD₁ - Receptor dopaminérgico do tipo D₁

RNAse - Ribonuclease

Ser133 - Resíduo de serina 133

Threshold - Linha horizontal definida na fase exponencial da qPCR

Trk – Receptor tirosina quinase

TrkB – Receptor tirosina quinase B

VSCC - Canal de cálcio dependente de voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais	29
3.2 Drogas	29
3.3 Delineamento experimental	29
3.4 Registro da atividade locomotora	31
3.5 Teste do labirinto em cruz elevado	31
3.6 Análise dos níveis protéicos	32
3.6.1 Extração de proteínas	32
3.6.2 Eletroforese e transferência	33
3.6.3 Imunodeteccção	34
3.7 Análise da expressão gênica	35
3.7.1 Extração de RNA	35
3.7.2 Transcrição reversa	36
3.7.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real	37
3.7.4 Quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	38
3.8 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Atividade locomotora no campo-aberto	40
4.1.1 Habituação e sensibilização locomotora	40
4.1.2 Condicionamento dos efeitos da droga ao ambiente	41
4.1.3 Tigmotaxia	42
4.2 Comportamento tipo ansiedade no labirinto em cruz elevado	44
4.3 Avaliação dos níveis protéicos por Western blot	47
4.3.1 Níveis protéicos de CREB e pCREB no córtex pré-frontal	48
4.3.2 Níveis protéicos de CREB e pCREB no hipocampo	49
4.3.3 Níveis protéicos de BDNF e TrkB no córtex pré-frontal	50
4.3.4 Níveis protéicos de BDNF e TrkB no hipocampo	50
4.4 Avaliação da expressão de RNAm por qPCR	51

4.4.1 Expressão de BDNF e TrkB no córtex pré-frontal	52
4.4.2 Expressão de BDNF e TrkB no hipocampo.....	53
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A dependência a substâncias psicoativas como álcool, anfetamina e cocaína é caracterizada por um comportamento compulsivo de busca e uso da droga em detrimento das sérias consequências negativas e está entre um dos distúrbios psiquiátricos de maior prevalência, contribuindo significativamente para a mortalidade e a morbidade física e social. De acordo com o *II Levantamento Domiciliar sobre Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil, 2005*, realizado pelo Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas (CEBRID), 2,9% dos 7.939 entrevistados já haviam feito uso de cocaína ao menos uma vez na vida. A situação encontrada foi pior no estudo realizado pelo CEBRID em 2003 com 2.807 crianças e adolescentes em situação de rua nas 27 capitais brasileiras. De acordo com o estudo, 24,5% dos entrevistados já haviam feito uso de cocaína ou seus derivados ao menos uma vez na vida e 12,6% relataram uso recente (no mês).

Em humanos, os distúrbios relacionados à dependência geralmente começam na adolescência ou início da fase adulta. Por exemplo, estudos epidemiológicos mostraram que a maioria dos fumantes nos Estados Unidos começou a fumar antes dos 18 anos (Giovino, 1999), e o início do uso diário de cigarro é incomum após os 25 anos (Breslau et al., 2001). Cerca de 40% dos adultos dependentes de álcool experimentam sintomas de alcoolismo entre 15 e 19 anos, e 80% dos casos de alcoolismo têm início antes dos 30 anos de idade (Helzer et al., 1991). A idade média de início do uso de drogas ilícitas relatada por adultos dependentes é de 16 anos, com 50% dos casos começando entre 15 e 18 anos e raramente após os 30 anos (Anthony et al., 1991).

A adolescência é um período do desenvolvimento humano caracterizado por aumento do comportamento de risco, procura por novidades e aumento do valor atribuído às interações sociais fora do ambiente familiar. Por esse motivo, não é surpreendente que diversas evidências clínicas apontem para esse período como uma fase de maior vulnerabilidade biológica à dependência e aumento tanto no uso de drogas lícitas como cigarro e álcool, quanto ilícitas como *marijuana* e cocaína (Spear, 2000). De fato, os adolescentes demonstram uma progressão mais precipitada no uso de drogas ilícitas como a cocaína do que os adultos (Warner et al., 1991; Estroff et al., 1989) e comparados a indivíduos que iniciam o uso de álcool e *cannabis* quando adultos, apresentam períodos mais curtos entre o primeiro uso e

a dependência (Clark et al., 1998). Outro estudo mostrou que apesar de fumarem menos cigarros que os adultos, os adolescentes mostram maiores taxas de dependência (Kandel et al., 2000) e embora as taxas de uso de bebidas alcoólicas sejam semelhantes entre adultos e adolescentes, as taxas de abuso e dependência variam inversamente com a idade (Grant, 1997).

Além das evidências clínicas e epidemiológicas, existem diferenças anatômicas e funcionais das estruturas cerebrais que ainda estão em desenvolvimento. De um modo geral, o desenvolvimento do encéfalo continua além da infância e da adolescência (Sowell, 2004). O encéfalo do adolescente é caracterizado por mudanças vigorosas no crescimento e conectividade. Por exemplo, entre aproximadamente seis e 12 anos, a proporção do ventrículo lateral em relação ao volume cerebral permanece constante e aumenta consistentemente dos 12 aos 18 (Giedd et al., 1996). Dos quatro aos 17 anos há um aumento progressivo na densidade da substância branca dessa estrutura, provavelmente devido ao aumento da mielinização neuronal e do calibre dos axônios, contribuindo para o aumento na eficiência da propagação do potencial de ação (Paus et al., 1999). Além de alterações marcantes na taxa metabólica cerebral, que refletem neuroplasticidade (Kety, 1956).

O córtex pré-frontal (CPF) é uma área importante para o julgamento, tomada de decisão, controle das respostas emocionais e está associado a funções executivas. Anormalidades nessa estrutura aumentam o risco do desenvolvimento de distúrbios relacionados a drogas de abuso, possivelmente por envolver alterações nas respostas motivacionais a essas substâncias (revisado em Chambers et al., 2003). O hipocampo é uma estrutura cerebral envolvida principalmente nos processos de aprendizado e memória, e também pode sofrer alterações decorrentes da ação de drogas de abuso (Nixon e Crews, 2002). O hipocampo e o córtex pré-frontal atingem a maturidade mais tardiamente do que as áreas cerebrais primárias sensório-motoras (Durston e Casey, 2006; White e Swartzwelder, 2004), e distúrbios no desenvolvimento cerebral induzidos por drogas podem levar a consequências adversas de longo prazo (Adriani e Laviola, 2004), uma vez que o início do uso de álcool e de outras drogas durante a adolescência está fortemente relacionado ao abuso e à dependência em fases posteriores da vida (Spear, 2000).

Diversos trabalhos apontam para o envolvimento de regiões subcorticais, estriatais e do córtex pré-frontal em processos emocionais e cognitivos de tomada

de decisão e como alvos da ação de drogas de abuso (Groenewegen et al., 1999; Woodward et al., 1999; Masterman e Cummings, 1997; Chang et al., 2000; Breiter et al., 2001), e a diferença de resposta às drogas nessas regiões, durante o desenvolvimento, parece estar envolvida com a maior predisposição dos adolescentes à ocorrência de um comportamento de alto risco e exploração, como discutido a seguir.

Estudos com ratos sugerem a existência de um circuito motivacional primário envolvendo o córtex pré-frontal e estriado ventral, que possui acesso direto às estruturas de saída motora (Kalivas et al., 1999). Esse sistema anterior é regulado por outro sistema secundário, posteriormente localizado e mais amplamente distribuído que fornece múltiplas modalidades de informação sensorial por meio de projeções axonais que convergem para o circuito primário (Pennartz et al., 1994; Jentsch et al., 2000), por exemplo, o hipocampo e a amígdala enviam informação de memória contextual e afetiva relevantes para o estímulo motivacional (Bechara, 2001; Pennartz et al., 1994; Panksepp, 1998). O circuito motivacional primário possui populações de neurônios capazes de gerar padrões de disparo que podem codificar múltiplos aspectos da resposta motivacional ou respostas motivacionais alternativas (Woodward et al., 1999). Essas representações ocorrem entre os neurônios interconectados por alças paralelas de projeções axonais do CPF para o estriado ventral (do núcleo *accumbens* ao globo pálido ventral), em seguida para o tálamo e novamente para o córtex (Masterman e Cummings, 1997). Assim, a informação motivacional é enviada por meio de projeções gabaérgicas do Núcleo *Accumbens* (NAc) ao globo pálido ventral e em seguida para o tálamo que, por sua vez, influencia os centros de saída motora corticais e subcorticais (revisado em Chambers et al., 2003) (Figura 1A).

Os substratos neurais promotores da motivação envolvem a liberação de dopamina no estriado, que é o principal efeito modulatório envolvido na transformação da motivação em ação, operando como um sinal geral “siga” (Panksepp, 1998). A descarga dopaminérgica no núcleo *accumbens* está associada ao estímulo motivacional, recompensa subjetiva, cognição pré-motora e aprendizado de um novo comportamento (Panksepp, 1998; Masterman e Cummings, 1997; Ito et al., 2002) e pode ser aumentada por diversos estímulos como drogas de abuso, recompensas naturais (por ex.: comida e sexo) e estímulos aversivos ou estressantes (Panksepp, 1998; Self e Nestler, 1998; Volkow e Fowler, 2000). Alguns

trabalhos mostram que a descarga dopaminérgica tem o efeito de alterar as respostas neuronais do NAc às aferências glutamatérgicas córtico-límbicas. Propõe-se que esses eventos levem a relativos extremos de padrões de disparo neuronal no NAc, aumentando a amplitude dos picos locais que codificam para a ativação de eventos comportamentais nos sistemas motores (O'Donnell et al., 1999; Kalivas, 1993b; Ito, 2002; Finch, 1996) (Figura 1B).

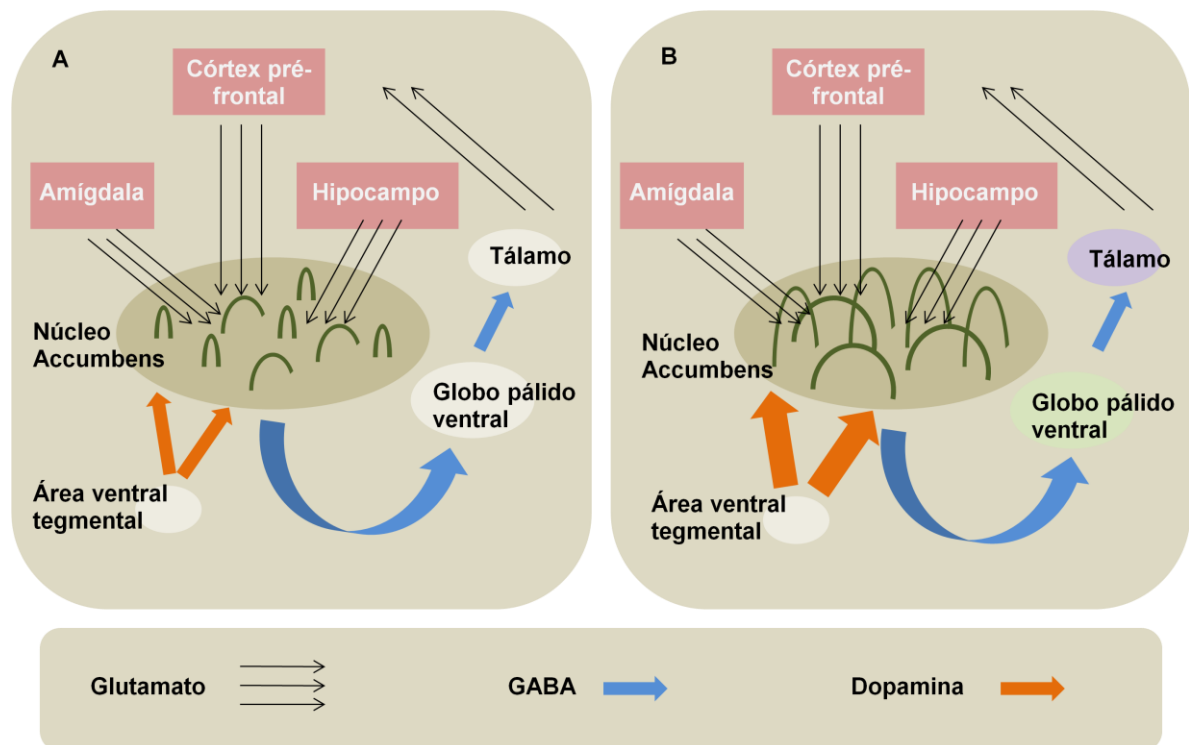


Figura 1 - **A)** Aferências glutamatérgicas do córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo enviam informação executiva, afetiva e de memória contextual para o NAc, influenciando os padrões de disparo neuronal nessa estrutura. A informação motivacional é enviada ao globo pálido ventral por meio de projeções gabaérgicas e então para o tálamo, que por sua vez influencia os centros corticais e subcorticais de saída motora. **B)** Eventos como a identificação de uma novidade ambiental e a ação de drogas de abuso alteram a descarga dopaminérgica no NAc levando a relativos extremos no padrão de disparo neuronal (representado em verde escuro) e alterando a resposta neuronal dessa estrutura às aferências glutamatérgicas límbicas e corticais.
Fonte: adaptado de Chambers et al., 2003.

Durante a adolescência, o córtex pré-frontal ainda está em desenvolvimento, limitando a capacidade de inibição motivacional, o que explica os comportamentos de risco e a impulsividade característicos dessa idade. Esse fato aliado a uma robusta atividade dopaminérgica disparada pela novidade, característica dos adolescentes, pode potencializar a capacidade das drogas de abuso de manter o circuito motivacional ativado, como representado na figura 1B, produzindo

consequências motivacionais de longo prazo mais profundas e predispondo os adolescentes a um aumento de ações impulsivas e comportamentos de risco, incluindo a experimentação e uso abusivo de drogas (Chambers et al., 2003).

Muitas pessoas passam por experiências com drogas de potencial abusivo, no entanto, mesmo para drogas de alto poder de dependência como a cocaína, somente 15 a 16% dos usuários se tornam dependentes dentro de dez anos do primeiro uso (Wagner e Anthony, 2002), ou seja, o uso da droga não leva inevitavelmente à dependência. Este distúrbio é mais do que o mero uso da substância, mas um padrão comportamental compulsivo de busca e uso da droga que toma uma parcela extremamente alta do tempo e pensamentos do indivíduo, sobrepondo-se a todas as outras atividades e persistindo apesar das consequências adversas (Hasin et al., 2006).

Diversos estudos sugerem que a transição para a dependência seja decorrente de um aprendizado aberrante, uma vez que as drogas subvertem os mecanismos neuronais envolvidos nas funções de aprendizado e memória normais (White, 1996; Berke e Hyman, 2000; Everitt et al., 2001; Hyman e Malenka, 2001). Embora essa teoria não seja capaz de explicar completamente a natureza compulsiva da adição (Robinson e Berridge, 2003), a memória e aprendizado têm importante atuação na dependência, por exemplo, as drogas podem distorcer o processo pelo qual o usuário conecta um sinal específico, como um lugar particular, com o estado induzido por ela (Robbins e Everitt, 1999). Além disso, as associações que ocorrem durante o uso repetido da droga também podem levar a manifestações posteriores que disparam os processos de recaída. Por exemplo, usuários de cocaína abstinentes reportaram intenso desejo subjetivo e excitação autonômica quando expostos a estímulos pareados à cocaína (Avants et al., 1995; Ehrman et al., 1992).

O circuito relacionado ao NAc (descrito anteriormente) é crítico para recompensas naturais adquirirem e exercerem controle motivacional sobre o comportamento (Kelley e Berridge, 2002). No entanto, drogas de abuso não apenas envolvem esses circuitos de recompensa frequentemente de forma mais potente que as recompensas naturais, como também os transformam. Neuroadaptações persistentes induzidas por drogas no circuito relacionado ao NAc têm sido encontradas nos níveis molecular, celular e de sistemas neurais (Nestler et al. 1993; Robinson e Berridge, 1993, 2000; Vanderschuren e Kalivas, 2000; Hyman e

Malenka, 2001). Essas neuroadaptações têm sido apontadas como críticas na transição do uso controlado de drogas de abuso para o descontrolado.

A teoria da sensibilização do incentivo, originalmente publicada em 1993 por Robinson e Berridge, sugere que as drogas alteram de forma duradoura os sistemas cerebrais relacionados ao NAc, que medeiam uma função básica de incentivo motivacional, a atribuição de saliência ao incentivo. Como consequência, esses circuitos podem tornar-se hipersensíveis (sensibilizados) aos efeitos de incentivo motivacional da droga e estímulos a ela associados, provocando um “querer” excessivo pela droga que é desvinculado da hedonia. Estudos com dependentes mostraram que doses de drogas muito baixas para produzir qualquer experiência consciente de prazer podem ativar um “querer” implícito que é visto pelo aumento no comportamento de busca pela droga (Lamb et al., 1991; Fischman e Foltin, 1992). Esse processo é de fundamental importância na compulsão e na recaída.

A ativação psicomotora desencadeada por diversas drogas de potencial abusivo é mediada por um sistema neural que se sobrepõe àqueles envolvidos na recompensa, refletindo o engajamento de sistemas de incentivo cerebrais, incluindo os sistemas dopaminérgicos mesotelencefálicos (Wise e Bozarth, 1987). Portanto, a sensibilização psicomotora fornece um meio de estudar a sensibilização do circuito motivacional. Mas é a sensibilização deste último circuito, e não a sensibilização psicomotora, que contribui para a dependência (Robinson e Berridge, 2008).

A sensibilização comportamental é considerada um modelo de neuroadaptação caracterizado por aumento progressivo dos efeitos estimulantes motores induzidos pela administração repetida de uma droga de abuso, tendo sido primeiramente descrita para drogas psicoestimulantes como anfetaminas (Segal e Mandell, 1974; Shuster et al., 1982) e cocaína (Shuster et al., 1977). As alterações biológicas da sensibilização se correlacionam com um estado motivacional descrito como “desejo”, “compulsão” ou “fissura”, que aumenta progressivamente com o uso contínuo da droga. Acredita-se que a sensibilização comportamental esteja relacionada principalmente a neuroadaptações caracterizadas pela sensibilização da via dopaminérgica mesolímbica (Wise e Bozarth, 1987), em que se observa o aumento na liberação de dopamina da Área Ventral Tegmental (AVT) no NAc (Robinson e Berridge, 2000). Além disso, receptores dopaminérgicos do tipo D₁ (RD₁) tornam-se hipersensíveis após a sensibilização, provavelmente potencializando o sinal dopaminérgico mesolímbico (White e Kalivas, 1998). As

neuroadaptações associadas à sensibilização comportamental à cocaína ocorrem em estruturas mesolímbicas, particularmente na AVT (McFarland e Kalivas, 2001; Vezina e Stewart, 1989), NAc (Nestler, 2001; Robinson e Kolb, 1999) e córtex pré-frontal medial (Sorg et al., 1997).

A ação primária da cocaína se dá por inibição do transportador de dopamina e consequente bloqueio de sua recaptação, resultando em aumento da concentração extracelular do neurotransmissor. A cocaína também pode aumentar a concentração extracelular de serotonina e noradrenalina pelo bloqueio dos transportadores dessas monoaminas. No entanto, a maioria dos efeitos de recompensa da droga vem da inibição dos transportadores dopaminérgicos, aumento da disponibilidade de dopamina e subsequente ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs). O aumento de dopamina na fenda sináptica, por ação da cocaína, atua principalmente por ligação ao receptor dopaminérgico acoplado à proteína G estimulatória do tipo D1. Esta ligação ativa a enzima adenilil ciclase que catalisa a transformação de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). O aumento deste mensageiro ativa a proteína quinase A dependente de AMPc (PKA), levando à dissociação de sua subunidade catalítica (C α) da regulatória (R). A C α pode migrar para o núcleo e fosforilar a proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB) (revisado em Ron e Jurd, 2005).

O CREB pertence à superfamília bZIP de fatores de transcrição caracterizada por um domínio básico c-terminal que medeia a ligação ao DNA e por um domínio *zipper* de leucina que facilita a dimerização. As principais isoformas de CREB contêm o domínio bZIP e dois domínios ricos em glutamina denominados Q1 e Q2/CAD que são separados pelo domínio indutível de quinase (KID). Enquanto o domínio bZIP medeia a ligação ao DNA e dimerização, os domínios restantes servem para facilitar a interação com co-ativadores e componentes da maquinaria transcricional que levam à síntese de RNA. Dentro do KID está o resíduo de serina 133 (ser133), que quando fosforilado de maneira estímulo-dependente promove a ligação do CREB às regiões promotoras de genes que possuem o sítio de ligação para o CREB (CRE) e torna o domínio alvo de ligação para a proteína de ligação ao CREB (CBP), envolvida na co-ativação transcricional de vários fatores de transcrição (Figura 2). A CBP acetila histonas e outras proteínas regulatórias e interage diretamente com a maquinaria de transcrição basal, facilitando o início da transcrição gênica (revisado em Bonnie et al., 2002).

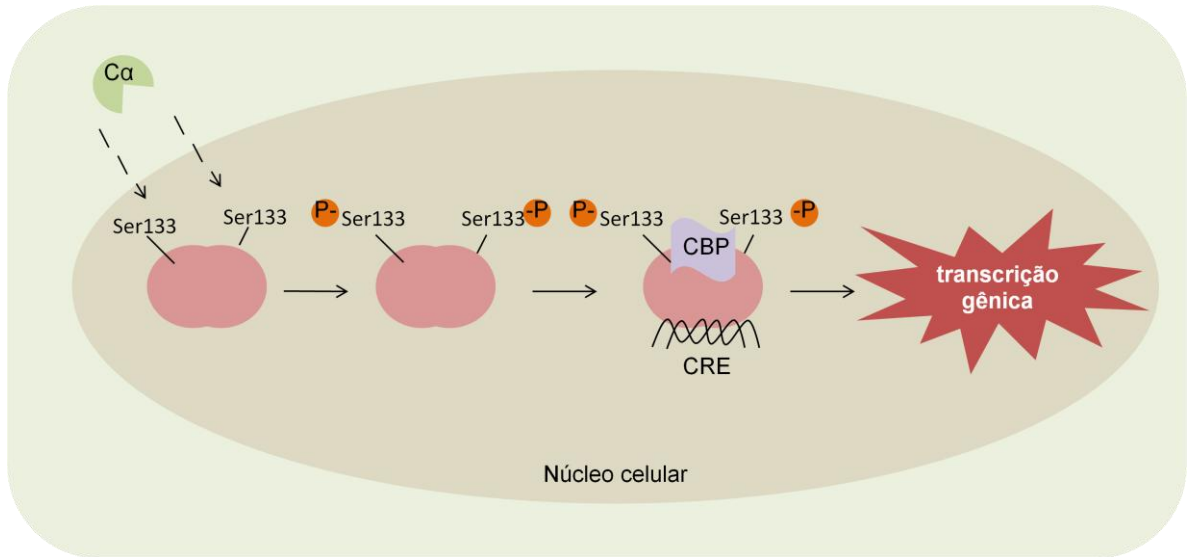


Figura 2 - A subunidade catalítica da PKA (Ca) desloca-se para o núcleo e fosforila os resíduos de ser133 do CREB (representado em rosa), levando à sua ativação. O CREB fosforilado é capaz de ligar-se ao sítio CRE, presente na região promotora de diversos genes, e recrutar a CBP, que atua na maquinaria de transcrição basal, levando à transcrição gênica.

Em 2003, uma análise genômica das sequências de ligação para CREB revelou 1.349 sítios no genoma de camundongo e 1.663 sítios no genoma humano (Conkright et al., 2003). Experimentos posteriores de imunoprecipitação de cromatina estimaram que o número total de sítios de ligação para CREB no genoma de mamíferos é de 4.000 a 30.000 (Impey et al., 2004; Zhang et al., 2005). A grande quantidade de genes supostamente regulados por CREB e a diversidade funcional de suas ações indicam o importante papel biológico desse fator de transcrição em diversos processos celulares. Outra forma de estudar o envolvimento de CREB na regulação de um gene-alvo específico é verificando se o estímulo conhecido por ativar a expressão desse gene induz fosforilação da ser133. Desta forma, encontraram-se muitos estímulos capazes de fosforilar CREB incluindo receptores dopaminérgicos, glutamatérgicos e gabaérgicos, cocaína, anfetamina, opióides, canabinóides, antidepressivos, entre outros (revisado em Johannessen et al., 2004). E a lista de genes-alvo do CREB inclui aqueles que controlam neurotransmissão, estrutura celular, transdução de sinal, transcrição e metabolismo, entre outros, e sua ativação modula o balanço intracelular entre fatores de sobrevivência e de morte celular a favor daqueles responsáveis pela sobrevivência. (revisado em Bonnie et al., 2002).

O envolvimento de CREB na formação e manutenção da memória tem sido extensivamente estudado. Na década de 90, estudos com *Drosophila* e *Aplysia* mostraram o envolvimento direto desse fator de transcrição na formação e plasticidade sináptica da memória (Yin et al., 1994; Bartsch et al., 1995), e esses estudos foram seguidos por diversos outros investigando sua ativação na memória, por exemplo, em roedores, o CREB está envolvido na memória de condicionamento do medo, no condicionamento ao sabor aversivo, na memória olfativa, na memória de reconhecimento e memória espacial (Benito e Barco, 2010).

Em regiões do sistema nervoso central envolvidas na dependência, a fosforilação de CREB e a expressão gênica mediada por CRE variam dramaticamente de forma dependente da exposição a drogas como opiáceos, cocaína, anfetamina, álcool e nicotina. A exposição repetida a psicoestimulantes altera a expressão de vários fatores de transcrição, o que parece ter uma relação causal com os efeitos subjetivos das drogas, sendo o CREB um dos principais fatores de transcrição envolvidos nos processos de dependência. A administração de drogas de abuso causa uma ativação do CREB, via fosforilação, em regiões do circuito motivacional (Yamamoto et al., 1988; Walters et al., 2003). Alterações na ativação da via do AMPc e CREB nessas regiões têm sido relatadas em resposta à administração de diversas drogas (Cole et al., 1995; Carlezon et al., 1998; Berke e Hyman, 2000; Nestler, 2001; Walters et al., 2003). Mais especificamente, a via do AMPc-PKA no NAc tem sido associada à dependência à cocaína porque seu efeito recompensador é mediado pelos receptores dopaminérgicos que modulam a formação do AMPc. De fato, a exposição repetida à cocaína induz uma ativação dessa via em neurônios do NAc (Self et al., 1998). Acredita-se que a ativação de CREB induzida por drogas nesses centros de motivação seja responsável por algumas características comuns encontradas na adição.

Diversos estímulos que produzem diferentes tipos de resposta funcionam por meio de um mesmo efetor. Isso só é possível devido à diversidade de vias que regulam a fosforilação de CREB. Como vimos, CREB pode ser fosforilado pela via da PKA por meio da ligação de moléculas sinalizadoras às GPCRs. No entanto, a habilidade de ativar CREB por essa via não está restrita à ativação de proteína G, já que alguns subtipos de adenilil ciclase são ativados por cálcio e, portanto, a ativação pode ocorrer em resposta a estímulos que aumentem o nível de cálcio intracelular (revisado em Poser e Storm, 2001). O influxo de cálcio neuronal pode ocorrer, por

exemplo, por meio de canais de cálcio dependentes de voltagem (VSCC) após despolarização ou pela ativação de receptores ionotrópicos, como o receptor glutamatérgico NMDA. O cálcio também pode ligar-se à proteína calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina (Ca-Cam) que pode ativar algumas cálcio-calmodulinas quinases (Ca-CamK) capazes de fosforilar CREB, especialmente a Ca-CamKIV (Anderson e Means, 2002). Outra via capaz de fosforilar CREB é a via da Ras/proteína quinase regulada por sinal extracelular (Ras/ERK) caracterizada por uma cascata de quinases, dentre as quais estão membros da família RSK e MSK. As quinases MSK1, MSK2, RSK1, RSK2 e RSK3 são ativadas por proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs), como a ERK, e têm a capacidade de fosforilar CREB em resposta a fatores de crescimento (De Cesare et al., 1998; Arthur e Cohen, 2000). Muitos desses fatores de crescimento sinalizam via receptor tirosina quinase (TrK) e podem ativar outra via de sinalização, a via do fosfatidilinositol-3-quinase/Akt (PI3/Akt) (Cantley, 2002). A fosforilação de CREB também é induzida por estímulos estressores como hipóxia e radiação ultravioleta (UV), e o mecanismo parece envolver MAPKs (Deak et al., 1998). Por outro lado, mecanismos e vias como as fosfatases PP1 e PP2A podem levar à desfosforilação de CREB, controlando a cinética e duração de sua ativação (revisado em Bonnie et al., 2002).

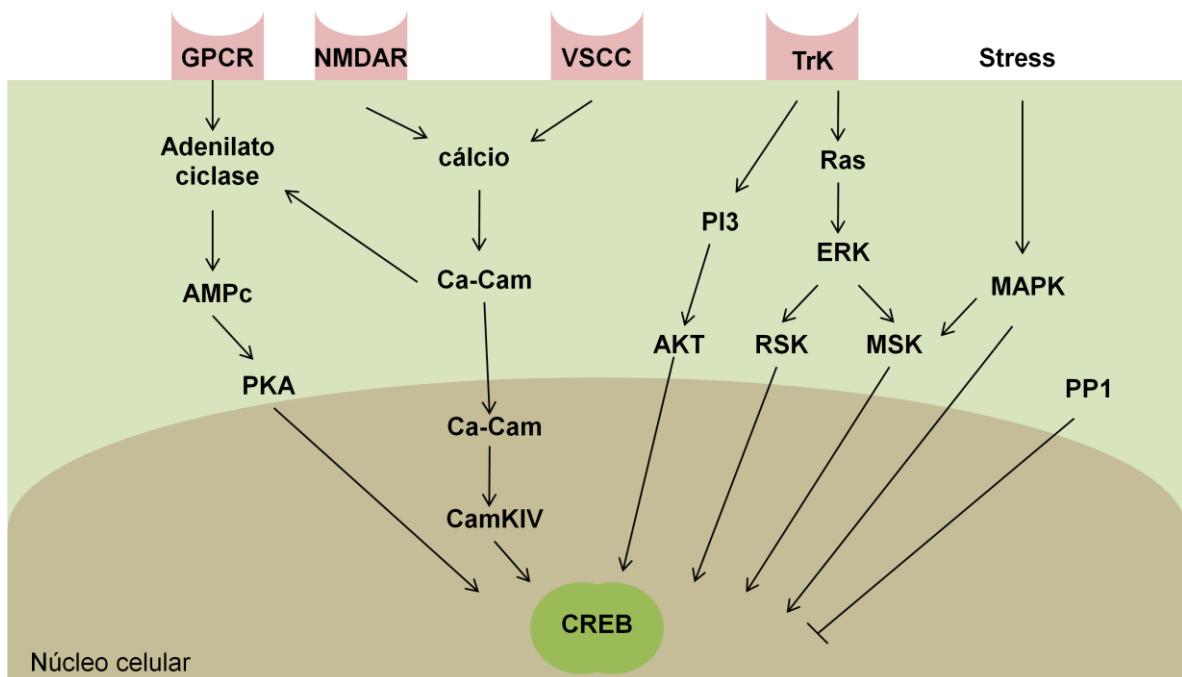


Figura 3 - Vias de regulação da ativação do CREB. Neurotransmissores excitatórios, ligantes de GPCRs, fatores de crescimento neuronais e *stress* estão entre os estímulos que ativam as vias de sinalização que levam à ativação de CREB.

Fonte: adaptada de Bonnie et al., 2002.

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é um dos genes-alvo da ativação de CREB. O BDNF pertence à família de neurotrofinas polipeptídicas que inclui o fator de crescimento neural (NGF), a neurotrofina-3 (NT3) e a neurotrofina-4/5 (NT4/5). É inicialmente sintetizado na forma de um precursor com 32 KDa, o pró-BDNF, que é quebrado intracelularmente originando a proteína madura de 14 KDa, o BDNFm (Mowla et al., 2001), que pode formar dímeros não-covalentes estáveis (Chao, 2003).

Existem duas vias de secreção de BDNF nos neurônios, a via dependente de regulação e a constitutiva. Na via de secreção dependente de regulação, o BDNF é estocado em vesículas grandes que se fundem à membrana plasmática após um aumento de cálcio intracelular. Na via constitutiva, ele é armazenado em grânulos menores e continuamente liberado por um processo de fusão independente de cálcio, que ocorre na ausência de qualquer evento específico. A liberação da neurotrofina pela via dependente de regulação requer o aumento de cálcio intracelular. O aumento do cálcio intracelular pode resultar de um influxo por canais de cálcio dependentes de voltagem ou por receptores NMDA após despolarização da membrana ou pela ativação de estoques de cálcio intracelulares após ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Além disso, a PKA pode regular a cinética de liberação vesicular do BDNF. Os estímulos capazes de levar à liberação de BDNF são diversos, incluindo glutamato, estimulação elétrica, cafeína, entre outros, e essa heterogeneidade nas fontes de cálcio e de estímulos sugere que diversas modalidades de secreção da neurotrofina podem co-existir (revisado em Kuczewski et al., 2009).

A transdução do sinal de BDNF é mediada pela ligação a dois receptores transmembrana diferentes: o receptor de alta afinidade tirosina quinase B (TrkB), que reconhece especificamente BDNF, e o receptor de neurotrofina de baixa afinidade p75, que reconhece outras neurotrofinas. A ligação de BDNF com TrkB induz a dimerização do receptor, autofosforilação de tirosinas intracelulares específicas e ativação de três cascatas de transdução de sinais diferentes, incluindo MAPK/ERK, PI3K e fosfolipase C (revisado em Corominas et al., 2007). As vias da MAPK, PI3K, Cálcio-Calmodulina e AMPc-PKA regulam CREB (Figura 3), e a ativação deste, por sua vez, leva à transcrição de BDNF (Tao et al., 1998).

As neurotrofinas são essenciais no desenvolvimento, funcionamento, sobrevivência e plasticidade dos neurônios (Lu et al., 2005; Huang e Reichardt,

2001). E diversos estudos mostram o envolvimento de BDNF na potenciação de longo prazo (LTP) tanto na fase inicial como na tardia, na modulação da transmissão sináptica, na síntese de proteínas dendríticas, na formação de espinhas dendríticas e em modelos animais de aprendizagem e memória (Bramham et al., 1996; Kang e Schuman, 1996; Messaoudi et al., 1998; Heldt et al., 2007; Soule et al., 2006). Essa neurotrofina e suas vias de sinalização intracelular também estão envolvidas nas mudanças neuroadaptativas dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico que são a base do abuso e dependência a psicoestimulantes (Filip et al., 2006; Horger et al., 1999; Lu et al., 2004; Grimm et al., 2003), por exemplo, a infusão de BDNF no NAc aumentou os efeitos locomotores da cocaína, além de aumentar a resposta induzida pela droga a um reforço condicionado a ela, e o aumento dos efeitos da cocaína persistiu por mais de um mês após o término da infusão, sugerindo que o BDNF promove alterações de longo prazo no sistema dopaminérgico-mesolímbico, ativando mecanismos de aprendizado associativo envolvidos na persistência do comportamento de adição (Horger et al., 1999).

Uma vasta literatura mostra que a exposição repetida de cocaína durante a vida adulta resulta em mudanças múltiplas nos mecanismos dopaminérgicos, incluindo aumento na liberação de dopamina (Camarini et al., 2008). Em relação ao efeito da cocaína sobre animais adolescentes, estes apresentam um pico extracelular de dopamina no NAc mais rápido do que os adultos. Aumentos precoces na sinalização dopaminérgica têm sido uma observação consistente em estudos sobre os efeitos reforçadores das drogas de abuso, por representar uma combinação do efeito da droga *per se* mais o influxo dopaminérgico induzido pela expectativa pela droga (Philpot e Kirstein, 1999). Esses dados mostram existir diferenças na resposta dopaminérgica à cocaína entre adolescentes e adultos.

Dessa forma, este trabalho propõe o estudo dos efeitos da cocaína sobre o CREB, o qual pode ser modulado pela via de sinalização ativada por receptores dopaminérgicos, e do produto de um de seus genes-alvo, o BDNF, em animais adolescentes e adultos.

2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da administração de cocaína em camundongos adultos e adolescentes sobre os seguintes parâmetros:

- Sensibilização locomotora pela técnica do campo-aberto.
- Comportamento ansioso pelas técnicas do campo-aberto e labirinto em cruz elevado.
- Expressão protéica do CREB e CREB fosforilado por *Western blotting*.
- Expressão gênica e protéica do BDNF e seu receptor de alta afinidade, TrkB, pela Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) e *Western blotting*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram usados camundongos *Swiss webster* machos, adolescentes (28-30 dias) e adultos (58-60 dias), provenientes do Biotério de camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os camundongos foram mantidos no biotério do Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental do ICB-USP alojados em caixas de polipropileno (27,5 cm x 16,5 cm x 13,0 cm), em grupos de cinco, mantidos sob temperatura constante (22 ± 1 °C) e sob ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h), com água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB-USP.

3.2 Drogas

A cocaína (Merck AG, Darmstadt, DEU) foi diluída em solução salina (NaCl 0,9% em água destilada) na concentração de 1,0 mg/ml, e a dose administrada foi de 10,0 mg/Kg de peso do animal por via intraperitoneal.

3.3 Delineamento experimental

Os camundongos foram submetidos a dois dias de habituação (H1 e H2), em que receberam uma injeção de salina e foram expostos ao campo-aberto (CA). Em seguida foram divididos aleatoriamente em dois grupos iniciais denominados Salina e Cocaína. Do primeiro ao oitavo dia de tratamento (D1 a D8), os animais do grupo Salina receberam uma injeção diária de salina e os animais do grupo Cocaína receberam uma injeção diária de cocaína e, durante esse período, foram submetidos ao CA somente em D1 e D8. No nono dia de tratamento (D9), todos os animais receberam uma injeção de salina e foram expostos ao CA para testar a ocorrência de condicionamento dos efeitos da droga ao ambiente. No período de abstinência, do décimo ao décimo nono dia (D10 a D19), os animais não receberam qualquer tipo de injeção nem foram submetidos ao CA e, no dia dezoito (D18), foram testados no labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação dos níveis de comportamento tipo

ansiedade. No último dia de tratamento (D20), metade dos animais de cada um dos grupos recebeu uma injeção desafio de salina e a outra metade uma injeção desafio de cocaína, originando os quatro grupos finais: Controle (tratado repetidamente com salina e desafiado com salina), Agudo (tratado repetidamente com salina e desafiado com cocaína), Repetido (tratado repetidamente com cocaína e desafiado com cocaína) e Abstinência (tratado repetidamente com cocaína e desafiado com salina). Por fim, os animais foram sacrificados por deslocamento tronco-cervical 1 h após terem recebido a injeção desafio e tiveram suas estruturas encefálicas (córtex pré-frontal e hipocampo) retiradas a fresco, lavadas em água autoclavada ultrapura deionizada Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e rapidamente congeladas em gelo-seco à temperatura de -20 °C e armazenadas à -80 °C. Todo o procedimento foi realizado com material previamente autoclavado e esterilizado com álcool 70% por 30 min. O tempo de sacrifício foi baseado em artigo publicado (Filip et al., 2006), os quais mediram os níveis de RNAm de BDNF e TrkB após administração aguda e repetida de cocaína em ratos adultos.

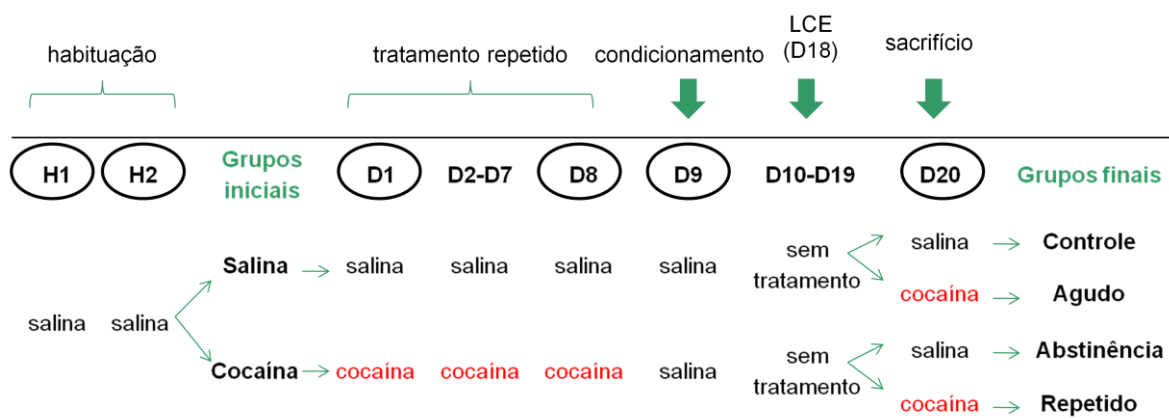


Figura 4 - Delineamento experimental - H1 e H2: habituação - os animais receberam uma injeção diária de salina. D1 a D8: tratamento repetido - os animais receberam uma injeção diária de salina ou cocaína. D9: os animais receberam uma injeção de salina para testar o condicionamento dos efeitos da droga ao ambiente. D10 a D19: período de abstinência - os animais não receberam injeções, e em D18 foram testados no LCE. D20: os animais receberam uma injeção desafio de salina ou cocaína, originando os grupos finais Controle, Agudo, Repetido e Abstinência e foram sacrificados 1 h após a injeção. Os dias circulados são aqueles em que os animais foram submetidos ao CA.

O delineamento experimental descrito acima foi realizado igualmente para animais adolescentes e adultos e foi adaptado do trabalho de Camarini et al. (2008).

3.4 Registro da atividade locomotora

O campo-aberto, adaptado do construído por Wilcock e Broadhurst (1967), consiste em uma arena circular de 40 cm de diâmetro e 50 cm de altura, forrada com madeira azul *royal*. Os animais foram colocados individualmente no centro da arena imediatamente após terem recebido uma injeção de salina ou cocaína e tiveram sua atividade locomotora capturada pelo programa Pinnacle Studio (Pinnacle Systems, Mountain View, CA, USA) por meio de uma câmera de vídeo instalada acima das arenas, no teto da sala de comportamento, durante um período de 15 min. As atividades locomotoras total, central e periférica dos animais foram avaliadas por meio do programa de monitoramento de imagens de vídeo Etho Vision (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA).



Figura 5 - Campo-aberto: registro da atividade locomotora dos animais.

Após cada observação e antes da introdução do animal seguinte, as arenas foram limpas com uma solução de álcool/água 5% para eliminar rastros de odor deixados pelo animal anterior. Para evitar efeitos de variação circadiana no comportamento dos camundongos, os testes foram realizados sempre no mesmo período, entre 10 h e 14 h.

3.5 Teste do labirinto em cruz elevado

O aparato fica a uma altura de 50 cm e possui dois braços abertos, 33,5 cm x 7,0 cm, e dois braços fechados, 33,5 cm x 7,0 cm x 19,0 cm, descobertos no topo, arranjados de forma que os dois braços de cada tipo sejam opostos uns aos outros. Cada animal foi colocado no centro do labirinto de frente para um dos braços

fechados, e a latência de entrada no braço aberto, bem como o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados durante 5 min foram registrados pelo observador posicionado a aproximadamente 1 m de distância, adaptado de Rogerio e Takahashi (1992). A entrada em um dos braços era considerada válida somente após o animal ter colocado as quatro patas dentro do braço. Após cada teste, limpou-se o aparato com solução de álcool/água 5% para eliminar rastros de odor deixados pelo animal anterior. Para evitar efeitos de variação circadiana no comportamento dos camundongos, a observação de todos os animais foi realizada sempre entre 10 h e 14 h.



Figura 6 - Labirinto em cruz elevado: avaliação do comportamento tipo ansiedade dos animais.

3.6 Análise dos níveis protéicos

Os níveis protéicos de BDNF, TrkB, CREB e pCREB das estruturas encefálicas foram medidos por meio da técnica *Western blot*.

3.6.1 Extração de proteínas

O método usado foi adaptado do descrito em Rong e Baudry (1996). As estruturas (córtex pré-frontal e hipocampo) foram descongeladas e maceradas com homogeneizador vidro-vidro de ponta arredondada (que não rompe a membrana nuclear) em 300 μ l de tampão de lise (HEPES 10 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 μ g/mL; antipainá 2 μ g/mL; β -glicerofosfato de sódio 10 mM; NaF 50 mM; água Milli-Q) e incubadas em gelo por 10 min. A seguir, foram adicionados 7,5 μ L de NP-40 10% seguido por agitação vigorosa e centrifugação (16.000 g, 1 min, 4 $^{\circ}$ C). O sobrenadante (extrato

citoplasmático) foi recolhido para avaliação dos níveis protéicos de BDNF e TrkB. O precipitado foi ressuspenso em 70 μ l de tampão de extração (HEPES 20 mM; Glicerol P.A. 25%; $MgCl_2$ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 μ g/ml; antipaína 2 μ g/ml; β -glicerofosfato de sódio 10 mM; NaF 50 mM; água Milli-Q), incubado em gelo por 20 min e centrifugado (16.000 g, 20 min, 4 $^{\circ}$ C). O sobrenadante (extrato nuclear) foi recolhido para avaliação dos níveis protéicos de CREB e pCREB. Os extratos foram armazenados à -80° C até o momento do uso. A determinação da concentração protéica foi feita em duplicata pelo método de Bradford (1976), empregando-se albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich chemie, Steinheim, DEU) para a construção da curva padrão.

3.6.2 Eletroforese e transferência

As amostras (10 μ g de proteína) foram solubilizadas em tampão de amostra (tris-base 60 mM; SDS; glicerol 25%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%) e fervidas à 95 $^{\circ}$ C por 5 min. A seguir, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS em mini cubas verticais (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Em cada um dos géis, havia sempre duas amostras do grupo Controle, e o primeiro poço era sempre destinado ao marcador de peso molecular PageRuler (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, Maryland, USA). A migração foi iniciada em um gel de empilhamento 5% (tris-base 1 M, pH 6,8; SDS 10%; acrilamida mix 30%; persulfato de amônia 10%; TEMED; água Milli-Q) e prosseguiu em gel de separação 10% para CREB, pCREB e TrkB e 15% para BDNF (tris-base 1,5 M, pH 8,8; SDS 10%; acrilamida mix 30%; persulfato de amônia 10%; TEMED; água Mili-Q) sob voltagem constante de 100 V (1 h) para CREB, pCREB e TrkB e 90 V (1 h 50 min) para BDNF. A eletroforese foi conduzida em tampão de corrida (tris-base 250 mM; SDS 10%; glicina 960 mM).

As proteínas CREB, p-CREB e TrkB foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,45 μ m (Bio-Rad) por meio de corrente elétrica gerada sob voltagem constante de 100 V por 1 h, já as proteínas BDNF foram transferidas para membrana de PVDF com porosidade de 0,22 μ m (Millipore) sob voltagem constante de 90 V por 40 min. A transferência foi realizada na presença de gelo e com mecanismo de circulação do tampão de transferência (tris-base 25 mM; glicina 190 mM; metanol 10% - 20%; água Milli-Q).

3.6.3 Imunodeteccção

As membranas foram incubadas, por 1 h, em solução de TTBS (tris-base 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%) acrescida de leite desnatado Molico (Nestlé Brasil Ltda., Araçatuba, SP, BRA) 5% sob temperatura ambiente e agitação constante para bloquear ligações inespecíficas do anticorpo. Então, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários em solução de TTBS com leite desnatado Molico (Nestlé) 3% ou com albumina de soro bovino (Sigma) 1% *overnight* à 4 °C. Foram usados anticorpos primários policlonais *rabbit* anti-CREB (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-pCREB ser133 (1:750, Millipore), anti-BDNF (Santa Cruz, 1:500) e anti-TrkB (1:1.000, Millipore) e o anticorpo monoclonal *mouse* anti- α -tubulina (1:10.000, Sigma). A seguir, as membranas foram lavadas duas vezes em TTBS e incubadas com o anticorpo secundário *rabbit* peroxidase-conjugado (1:50.000, Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) por 1 h, exceto a membrana de α -tubulina, que foi incubada com o anticorpo secundário *mouse* peroxidase-conjugado (1:6.000, Sigma) por 45 min. As bandas imunorreativas foram visualizadas com reagentes de detecção ECL plus Western Blotting (GE Healthcare Bio-Sciences UK Limited, Little Shalfont, Buckinghamshire, UK) e exposição em filme fotográfico ECL Hyperfilm (GE).

Após a revelação do filme fotográfico, as membranas usadas para a detecção de pCREB, BDNF e TrkB foram lavadas em solução de ácido acético 5% e em TTBS para remoção dos anticorpos e incubadas novamente, desta vez, com o anticorpo primário anti- α -tubulina, em seguida foram submetidas aos mesmos procedimentos detalhados anteriormente. Para medir os níveis de fosforilação de CREB, primeiro foi detectado pCREB, em seguida α -tubulina e por último CREB, todos na mesma membrana.

Os filmes fotográficos foram escaneados por impressora HP Photosmart C4280, e as densidades das bandas quantificadas por meio do programa ImageJ e expressas como porcentagem das amostras controle da mesma membrana.

3.7 Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica de BDNF e TrkB das estruturas encefálicas foi realizada por meio da técnica Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

3.7.1 Extração de RNA

A manipulação de RNA exige um preparo diferenciado de todo o material e de todas as soluções a serem utilizadas visando à redução de ribonucleases (RNAses). Desta forma, foram adotados os seguintes procedimentos: esterilização da bancada e de todos os materiais colocados sobre ela com álcool 70% por 30 min, preparo de soluções com água Milli-Q autoclavada e utilização de vidraria e materiais autoclavados.

As estruturas encefálicas foram homogeneizadas manualmente em 500 µl de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 100 µl de clorofórmio por tubo, e as amostras foram centrifugadas por 15 min à 13000 g, 4 °C. Foram adicionados 500 µl de álcool isopropílico ao sobrenadante recolhido, seguido de incubação por 15 min à temperatura ambiente e centrifugação por 15 min à 12000 g, 4 °C. Os *pellets*, agora visíveis, foram lavados com etanol 75% e as amostras centrifugadas por 15 min à 12000 g, 4 °C. O excesso de álcool foi removido com o auxílio de uma pipeta e os *pellets* secos à temperatura ambiente por 15 min. As amostras foram, então, solubilizadas em 100 µl de água Milli-Q autoclavada.

Algumas amostras foram escolhidas aleatoriamente e submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,5% sob voltagem constante de 80 V por 1 h para a verificação do material extraído. Após a eletroforese, o gel foi banhado em solução de brometo de etídeo 0,5%, e as bandas de RNAr (18S e 28S) visualizadas por meio de luz UV.

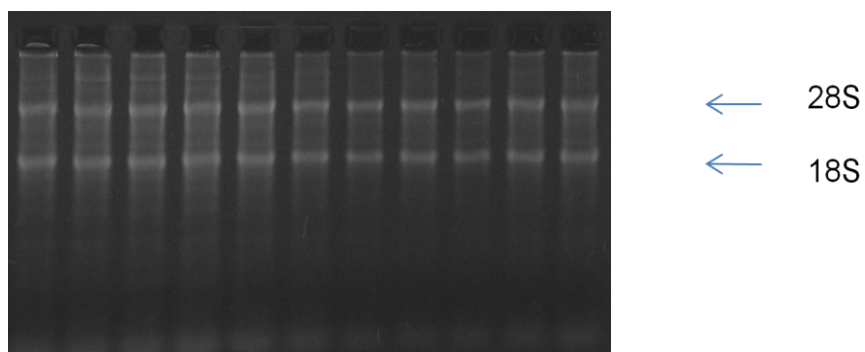


Figura 7 - Visualização do RNA extraído (gel de agarose 2,5%). As setas indicam as bandas de RNAr em 18S e 28S.

Os extratos de RNA foram quantificados em duplicata por meio de fotômetro (Eppendorf AG, Hamburg, DEU) sob comprimento de onda 260 nm, seguindo as instruções do fabricante.

3.7.2 *Transcrição reversa*

Antes de iniciar a transcrição reversa, os extratos de RNA foram tratados com DNase I (Invitrogen) para a eliminação de moléculas de DNA presentes nas amostras. A síntese de DNA complementar (DNAc) foi realizada a partir de 1 µg de RNA total e seguiu as instruções do fabricante, sendo usada a enzima SuperScript III Reverse Transcriptase, Oligo(dT)12-18 Primer e desoxinucleotídeos dNTP Set, PCR Grade (Invitrogen). Durante a síntese de DNAc, as amostras foram tratadas com o inibidor de RNase RNaseOUT (Invitrogen).

Algumas amostras foram escolhidas aleatoriamente e submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,5% sob voltagem constante de 80 V por 1 h para verificar a síntese de DNAc. Após a eletroforese, o gel foi banhado em solução de brometo de etídeo 0,5% e a visualização na luz UV revelou ausência das bandas 18S e 28S de RNAr.

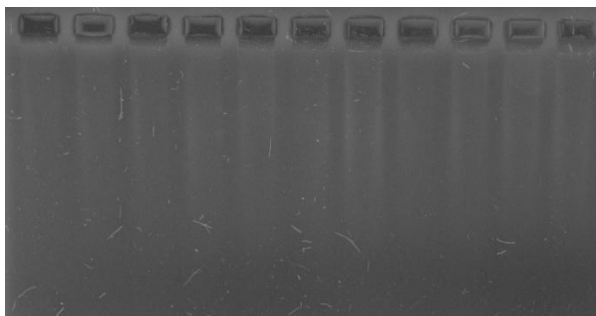


Figura 8 - Verificação da síntese de DNAc (gel de agarose 2,5%). As bandas de RNAr 18S e 28S estão ausentes.

3.7.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

Os oligonucleotídeos iniciadores foram confeccionados pela empresa Qiagen (Qiagen Sciences, Inc., Germantown, MD, USA) sendo assim denominados: Mm_Bdnf_vc.1_SG (QT01545362) para BDNF, Mm_Ntrk2_1_SG (QT00132111) para TrkB e Mm_Rn18s_2_SG (QT01036875) para o gene referência 18S ribossomal, e as sequências utilizadas para a confecção foram aquelas depositadas no banco público do NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

A qPCR foi realizada no equipamento Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Concord, Austrália). As reações continham 1 µl de amostra (DNAc), 2 µl de oligonucleotídeos iniciadores (senso e antisenso), 12 µl de água livre de nucleases e 15 µl do sistema de reagentes GoTaq qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA) que possui um marcador que emite fluorescência ao se ligar à dupla fita do DNA.

As reações foram incubadas à 95 °C por 2 min para ativação da DNA polimerase, seguidas por 40 ciclos alternados de denaturação (95 °C, 15 s), anelamento e extensão (60 °C, 60 s) e um ciclo final (60 °C por 90 s seguido de aumento gradual de temperatura, 1 °C a cada 5 s, até atingir a temperatura de 95 °C). Esse ciclo final foi usado para avaliar a cinética de dissociação dos produtos amplificados (curva de *melting*), e as amostras que apresentaram um pico muito baixo ou em temperatura diferente das demais foram descartadas. Para cada corrida foi feito o controle negativo, sem DNAc (NTC), e todas as amostras referentes aos grupos controle e experimental para cada gene foram processadas na mesma corrida.

3.7.4 Quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Para a análise dos resultados, uma linha horizontal (*threshold*) foi fixada na fase exponencial da reação, onde a amplificação ocorre em condições ótimas, sendo que, o número do ciclo em que cada amostra atingiu a linha do *threshold* corresponde ao Ct (Ciclo do *threshold*) da amostra. Seguindo o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, descrito em Livak e Schmittgen (2001), o valor do Ct de cada amostra foi normalizado com o Ct do gene referência 18S ribossomal, pela fórmula:

$$\Delta Ct = [Ct (\text{amostra}) - Ct (18S)] \quad (1)$$

E a expressão relativa do gene de interesse foi dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (2)$$

Onde,

$$\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct (\text{grupo tratado}) - \text{média } \Delta Ct (\text{grupo controle})] \quad (3)$$

Desta forma, o $\Delta\Delta Ct$ do grupo controle é igual a zero, e como $2^0 = 1$, a mudança na expressão gênica em relação ao grupo controle é, por definição, igual a um, e o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ indica quantas vezes a expressão do gene alvo nos grupos tratados foi maior ou menor do que a do grupo controle.

No entanto, para que a quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ seja válida, a eficiência da amplificação do gene alvo e a da amplificação do gene referência devem ser aproximadamente iguais. Um método para verificar se duas reações de amplificação têm a mesma eficiência é observando como o ΔCt varia com a diluição da amostra. Se o valor da inclinação da reta em um gráfico $\Delta Ct \times \log$ diluição DNAC for próximo de zero, as eficiências do gene alvo e do gene referência são similares (Livak e Schmittgen, 2001). Portanto, foi preparada uma curva de diluição seriada em duplicata para cada um dos oligonucleotídeos iniciadores utilizando-se um *pool* das amostras (quantidade inicial de DNAC em cada tubo: 1 - 0,5 - 0,25 - 0,125). O Ct médio foi calculado para cada um dos genes (BDNF, TrkB e 18S), e o ΔCt entre cada gene alvo e o gene referência determinado pela fórmula 1. Os valores de ΔCt

foram plotados em um gráfico ΔCt x log diluição DNAc. O valor da inclinação da reta do gráfico do TrkB foi de 0,05 e o do BDNF 0,02, validando o uso do método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ para essa análise.

3.8 Análise estatística

A Análise de Variância (ANOVA) 1-via, 2-vias e 3-vias foi usada para testar diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos grupos comparados. O intervalo de confiança adotado foi de 95%, e o teste usado na análise de comparações cuja significância estatística fosse menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$) foi o teste de Newman-Keuls.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade locomotora no campo-aberto

4.1.1 Habituação e sensibilização locomotora

Antes do início do tratamento com a droga e avaliação comportamental no campo-aberto, os animais foram submetidos a dois dias de habituação ao aparato (H1 e H2, figura 9A). A ANOVA-2 vias (idade x dias) para medidas repetidas (dias) revelou efeito do fator dias [$F_{(1,80)} = 9,93$; $p < 0,01$] e do fator idade [$F_{(1,80)} = 6,30$; $p < 0,05$]. A análise *post hoc* do fator dias revelou diminuição da atividade locomotora total em H2 em relação à H1, e a do fator idade mostrou que os animais adolescentes apresentaram uma atividade locomotora menor que a dos adultos. Fazendo-se a desconstrução da ANOVA-2 vias para cada uma das idades, vemos que a diminuição da atividade locomotora em H2 ocorre apenas no grupo adolescente [$F_{(1,41)} = 8,04$; $p < 0,01$], mas não no grupo adulto [$F_{(1,39)} = 2,37$; $p > 0,05$], indicando uma habituação mais proeminente naquele grupo etário.

A figura 9A mostra o efeito da administração repetida de salina ou cocaína na atividade locomotora de camundongos adolescentes e adultos no primeiro e no oitavo dias de tratamento. A ANOVA-3 vias (idade x tratamento x dias) para medidas repetidas (dias) revelou efeito do fator tratamento [$F_{(1,80)} = 51,16$; $p < 0,01$] com o aumento da atividade locomotora total nos animais tratados com cocaína em comparação aos tratados com salina. Um efeito do fator dias [$F_{(1,80)} = 26,90$; $p < 0,01$] mostrou aumento de atividade locomotora em D8 comparado a D1. A interação tratamento x dias [$F_{(1,80)} = 32,00$; $p < 0,01$] também foi observada, e a análise *post hoc* da interação mostrou que a atividade locomotora total dos animais tratados com cocaína foi maior em D8 do que em D1, indicando desenvolvimento de sensibilização locomotora em ambas as idades.

No último dia de tratamento (Figura 9B), a ANOVA-2 vias (idade x grupo) revelou significância estatística do fator idade [$F_{(1,74)} = 8,50$; $p < 0,01$] com uma maior atividade locomotora nos grupos adolescentes do que nos grupos adultos, e do fator grupo [$F_{(3,74)} = 21,06$; $p < 0,01$] devido à maior atividade locomotora dos grupos Agudo e Repetido em comparação aos grupos Controle e Abstinência, bem como interação entre os fatores [$F_{(3,74)} = 2,85$; $p < 0,05$]. A análise *post hoc* da interação mostrou que

a atividade locomotora dos grupos Agudo e Repetido adolescentes foi maior do que a de seus respectivos grupos Agudo e Repetido adultos, além de revelar aumento de atividade locomotora no grupo Repetido em comparação ao grupo Agudo para cada uma das idades, indicando expressão de sensibilização locomotora.

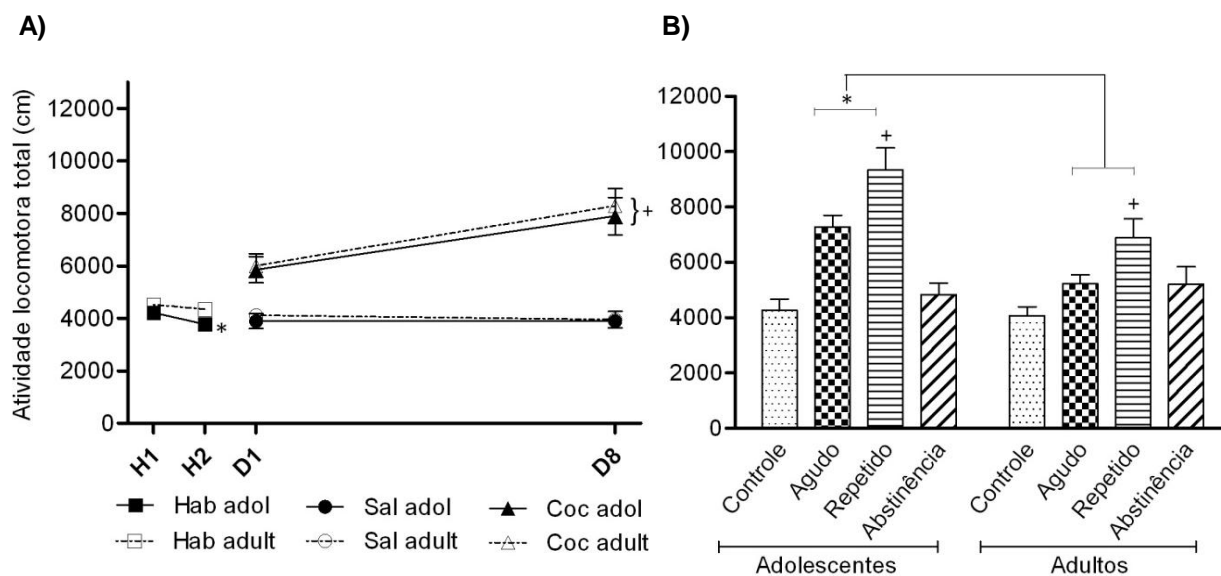


Figura 9 - A) Efeito da habituação e do tratamento repetido com salina ou cocaína na atividade locomotora total. Houve diminuição de atividade locomotora em H2 comparado à H1 nos animais adolescentes (* $p < 0,01$). Os adolescentes e adultos tratados com cocaína (Coc adol e Coc adult, respectivamente) apresentaram maior atividade locomotora em D8 do que em D1 (+ $p < 0,01$). **B)** Efeito da injeção desafio sobre a atividade locomotora total em D20. Houve aumento de atividade locomotora nos animais do grupo Repetido de cada uma das idades em comparação ao seu respectivo grupo Agudo (+ $p < 0,05$). Os grupos Agudo e Repetido adolescentes apresentaram aumento de atividade locomotora em comparação aos seus respectivos grupos adultos (* $p < 0,05$). Os dados representam média \pm erro padrão médio. Em H1 e H2, $n=40$. Em D1 e D8, $n=20$. Em D20, $n=10$.

4.1.2 Condicionamento dos efeitos da droga ao ambiente

No nono dia de tratamento, todos os animais receberam uma injeção de salina para testar os possíveis efeitos de condicionamento da droga ao ambiente (Figura 10). A ANOVA-2 vias (idade x pré-tratamento) mostrou significância estatística dos fatores idade [$F_{(1,80)} = 9,81$, $p < 0,01$] e pré-tratamento [$F_{(1,80)} = 16,42$; $p < 0,01$]. A análise *post hoc* indicou que os animais tratados repetidamente com cocaína tanto adolescentes quanto adultos apresentaram atividade locomotora maior do que aqueles tratados com salina, sugerindo efeito de condicionamento ao ambiente. A análise também mostrou que os animais adolescentes apresentaram maior atividade locomotora do que os animais adultos.

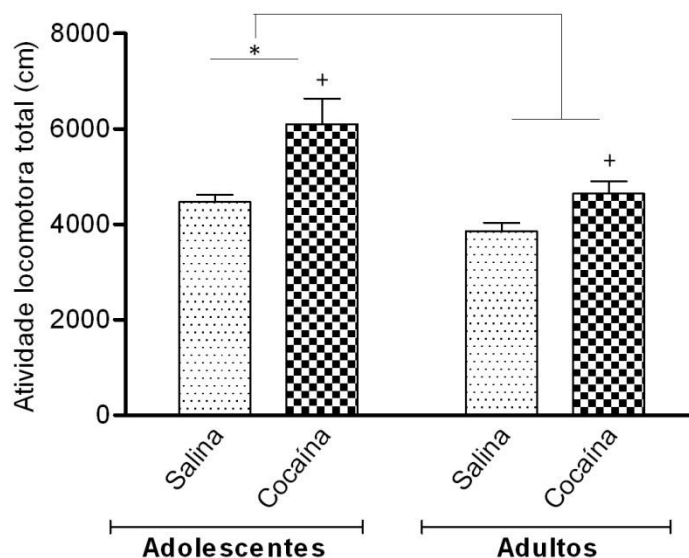


Figura 10 - Efeito da injeção de salina na atividade locomotora total em D9 após tratamento repetido com salina ou cocaína. Houve aumento de atividade locomotora nos animais pré-tratados com cocaína em comparação aos pré-tratados com salina (+ $p < 0,01$). Os adolescentes apresentaram maior atividade locomotora em comparação aos adultos (* $p < 0,01$). Os dados representam média \pm erro padrão médio. N=20.

4.1.3 Tigmotaxia

A figura 11A mostra a porcentagem de atividade locomotora na região central em relação à atividade locomotora total no campo-aberto durante a habituação (H1 e H2) e no tratamento repetido com salina ou cocaína (D1 e D8). A ANOVA-2 vias (idade x dias) para medidas repetidas no período de habituação mostrou efeito do fator idade [$F_{(1,81)} = 4,28$; $p < 0,05$] e do fator dias [$F_{(1,81)} = 36,64$; $p < 0,01$], e a análise *post hoc* do fator idade mostrou que os animais adolescentes apresentaram maior atividade locomotora na região central quando comparados aos animais adultos, enquanto a análise do fator dias mostrou diminuição de atividade locomotora central em H2 em relação a H1. A ANOVA-3 vias (idade x tratamento x dias) para medidas repetidas (dias) no período de D1 a D8 mostrou significância estatística do fator tratamento [$F_{(1,80)} = 9,06$; $p < 0,01$], do fator dias [$F_{(1,80)} = 51,44$; $p < 0,01$] e interação entre os fatores idade e tratamento [$F_{(1,80)} = 5,34$; $p < 0,05$]. A análise *post hoc* do fator tratamento mostrou que os animais tratados com cocaína apresentaram menor atividade locomotora na região central em relação aos animais tratados com salina, a análise do fator dias mostrou aumento de atividade locomotora na região central

em D8 comparado a D1 e a análise da interação mostrou uma maior atividade locomotora central do grupo Salina adolescente em relação a todos os outros grupos.

A figura 11B mostra a porcentagem de atividade locomotora na região central do campo-aberto no último dia de tratamento. A ANOVA-2 vias (grupo x idade) mostrou um efeito do fator grupo [$F_{(3,76)} = 3,40$; $p < 0,05$] devido à diminuição da atividade locomotora central dos grupos Agudo em relação aos grupos Controle, independentemente das idades. Fazendo-se, no entanto, a desconstrução da ANOVA-2 vias em ANOVA-1 via para cada uma das idades, encontram-se diminuição de atividade locomotora central nos grupos Agudo e Abstinência adolescentes em relação ao Controle [$F_{(3,38)} = 4,66$; $p < 0,01$] e ausência de alteração nos grupos adultos [$F_{(3,38)} = 0,37$; $p > 0,05$].

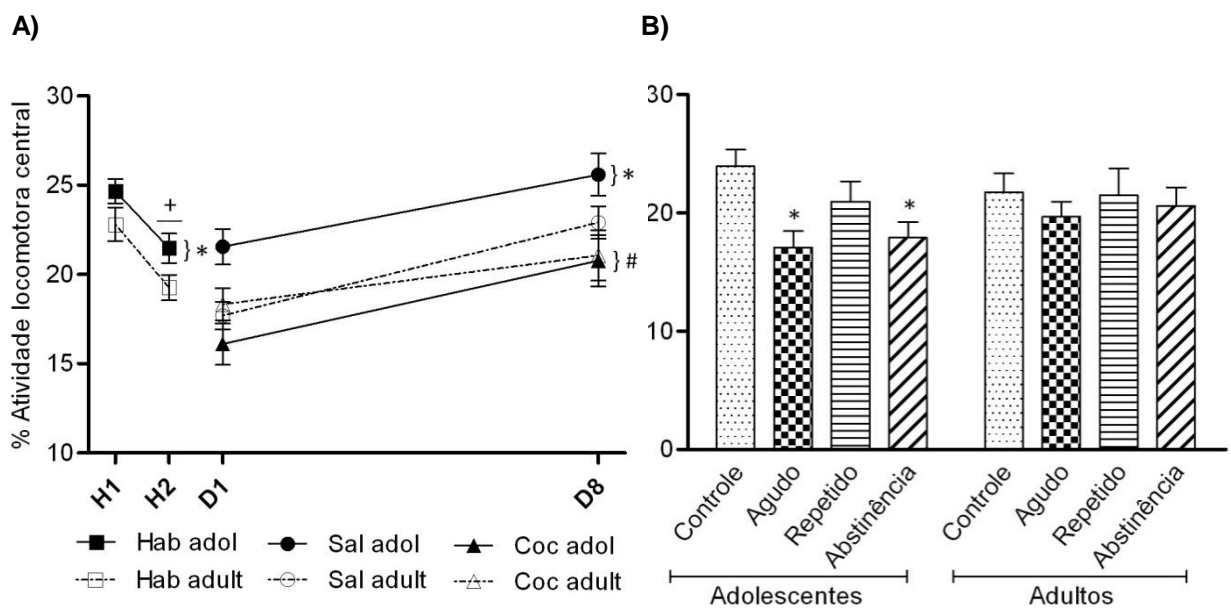


Figura 11 - A) Efeito da habituação e do tratamento repetido com salina ou cocaína na atividade locomotora central. Houve diminuição da atividade locomotora central em H2 em comparação à H1 (+ $p < 0,01$). Os animais adolescentes tratados com salina (Hab adol e Sal adol) apresentaram maior atividade locomotora na região central do campo-aberto em comparação aos demais grupos tanto na habituação (H1 e H2) quanto em D1 e D8 (* $p < 0,05$). Os animais tratados com cocaína (Coc adol e Coc adult) apresentaram menor atividade locomotora na região central do que os tratados com salina (Sal adol e Sal adult) (# $p < 0,01$). **B)** Efeito da injeção desafio sobre a atividade locomotora central em D20. Houve diminuição de atividade locomotora central nos grupos Agudo e Abstinência adolescentes em comparação ao grupo Controle adolescente (* $p < 0,05$). Os dados representam média \pm erro padrão médio. Em H1 e H2, $n=40$. Em D1 e D8, $n=20$. Em D20, $n=10$.

A figura 12 mostra a porcentagem de atividade locomotora na região central do campo-aberto em D9. A ANOVA-2 vias (idade x tratamento) não mostrou significância estatística ou interação entre os fatores [$F_{(1,80)} = 1,40$; $F_{(1,80)} = 1,67$; $F_{(1,80)} = 3,76$; $p > 0,05$].

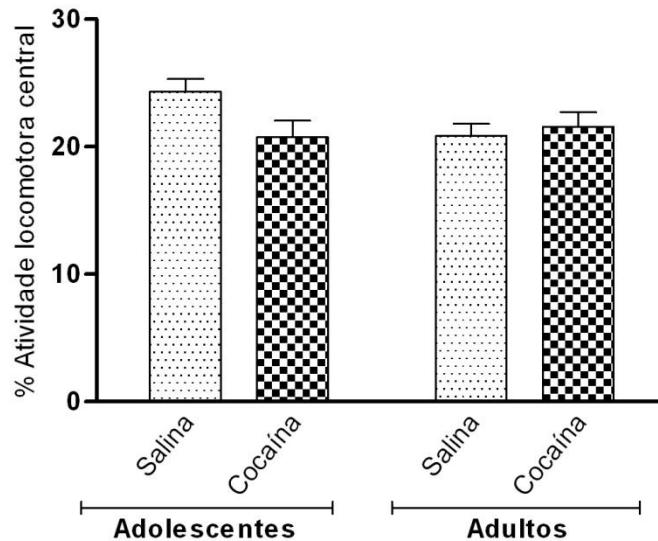


Figura 12 - Efeito da injeção de salina após tratamento repetido com salina ou cocaína na atividade locomotora central em D9. Os dados representam média \pm erro padrão médio. N=20.

4.2 Comportamento tipo ansiedade no labirinto em cruz elevado

Durante o período de abstinência, no décimo oitavo dia, os animais foram avaliados no labirinto em cruz elevado. O tempo gasto nos braços abertos foi calculado como porcentagem do tempo total despendido em ambos os braços (Figura 13). A ANOVA-2 vias (idade x pré-tratamento) mostrou efeito dos fatores idade [$F_{(1,80)} = 20,48$; $p < 0,01$], pré-tratamento [$F_{(1,80)} = 11,13$; $p < 0,01$] e interação entre ambos [$F_{(1,80)} = 4,17$; $p < 0,05$]. A análise *post hoc* do fator idade mostrou que os animais adolescentes passaram mais tempo nos braços abertos do que os adultos, e a análise do fator pré-tratamento indicou diminuição do tempo gasto nos braços abertos pelos animais pré-tratados com cocaína em relação aos animais pré-tratados com salina. No entanto, pela análise da interação, vemos que o aumento do tempo gasto nos braços abertos ocorreu somente no grupo Salina adolescente em relação a todos os outros grupos, e que o grupo Cocaína adulto não diferiu do Salina adulto.

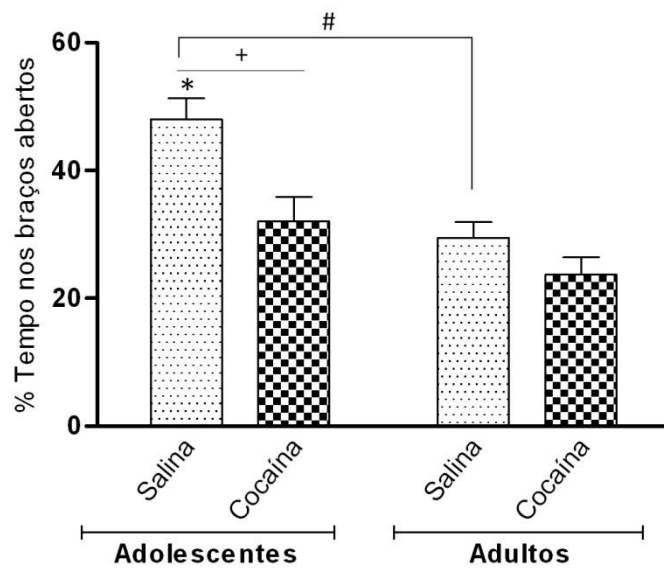


Figura 13 - Tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado durante o período de abstinência. Os animais adolescentes pré-tratados com salina passaram mais tempo nos braços abertos em comparação a todos os outros grupos (* $p < 0,05$). Os animais adolescentes gastaram mais tempo nos braços abertos em comparação aos adultos (+ $p < 0,05$). Os animais pré-tratados com salina gastaram mais tempo nos braços abertos comparados aos tratados com cocaína (# $p < 0,05$). Os dados representam média \pm erro padrão médio. $N=20$.

A figura 14 mostra o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. A ANOVA-2 vias (idade x pré-tratamento) revelou efeito dos fatores idade [$F_{(1,80)} = 6,03$; $p < 0,05$] e pré-tratamento [$F_{(1,80)} = 4,77$; $p < 0,05$], bem como interação entre ambos [$F_{(1,80)} = 4,04$; $p < 0,05$]. O *post hoc* do fator idade indicou maior número de entradas nos braços abertos pelo grupo adolescente do que pelo grupo adulto, o do fator pré-tratamento indicou, por sua vez, maior número de entradas nos braços abertos pelos grupos Salina em comparação aos grupos Cocaína, enquanto a análise da interação revelou que o aumento no número de entradas nos braços abertos ocorreu somente no grupo Salina adolescente em comparação a todos os outros grupos.

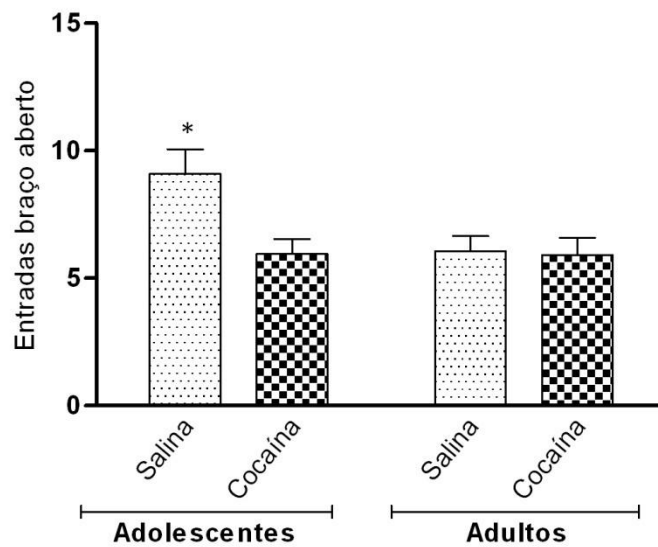


Figura 14 - Número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado durante o período de abstinência. Os animais adolescentes pré-tratados com salina entraram mais vezes nos braços abertos em comparação a todos os outros grupos ($p < 0,05$). Os dados representam média \pm erro padrão médio. N=20.

A figura 15 mostra o número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado. A ANOVA-2 vias (idade x pré-tratamento) indicou ausência de significância e de interação para os fatores [$F_{(1,80)} = 0,41$; $F_{(1,80)} = 0,005$; $F_{(1,80)} = 0,32$; $p > 0,05$].

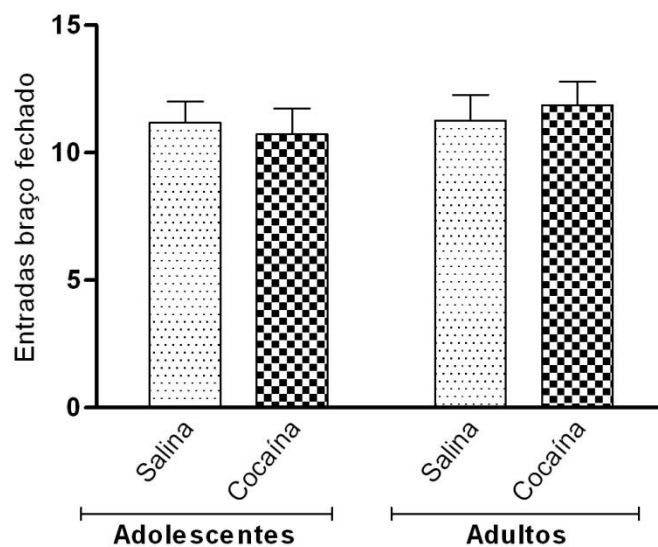


Figura 15 - Número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado durante o período de abstinência. Os dados representam média \pm erro padrão médio. N=20.

A figura 16 mostra a latência de entrada no braço aberto do labirinto em cruz elevado cuja ANOVA-2 vias (idade x pré-tratamento) indicou ausência de significância estatística e de interação para os fatores [$F_{(1,80)} = 0,71$; $F_{(1,80)} = 0,21$; $F_{(1,80)} = 0,03$; $p > 0,05$].

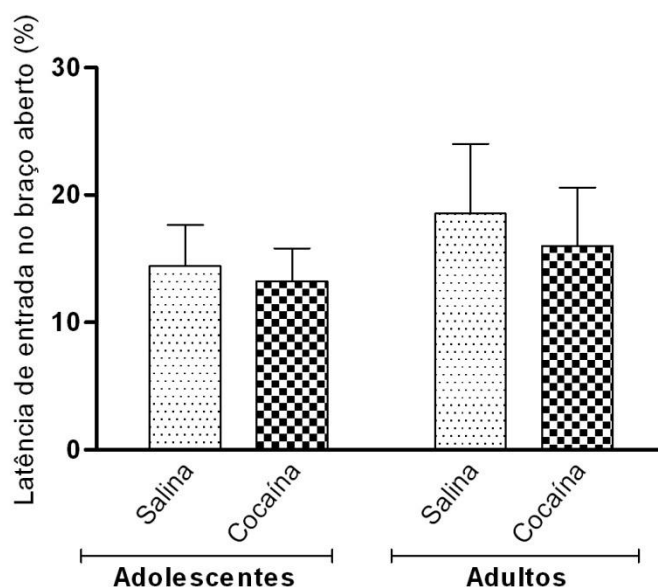


Figura 16 - Latência de entrada no braço aberto do labirinto em cruz elevado durante o período de abstinência. Os dados representam média \pm erro padrão médio. N=20.

4.3 Avaliação dos níveis protéicos por Western blot

O nível protéico de cada um dos grupos foi comparado ao respectivo grupo Controle e expresso na forma de porcentagem. Pelo fato dos dados representarem uma medida relativa, a análise de variância foi realizada entre os grupos de mesmo controle, desta forma, cada uma das idades foi analisada separadamente.

A banda de BDNF foi visualizada em aproximadamente 45 KDa, sugerindo a formação de dímero pela neurotrofina (Lambert et al., 2001; Ghinelli et al., 2003), a banda de TrkB foi visualizada em aproximadamente 145 KDa, CREB e pCREB em aproximadamente 43 KDa e α -tubulina em aproximadamente 55 KDa.

4.3.1 Níveis protéicos de CREB e pCREB no córtex pré-frontal

A figura 17 mostra um gel representativo e os níveis protéicos de CREB (17A) e pCREB (17B) no córtex pré-frontal de camundongos adultos e adolescentes. A ANOVA-1 via para os níveis protéicos de CREB nos animais adolescentes revelou diminuição no grupo Repetido em relação a todos os grupos e aumento nos grupos Agudo e Abstinência em relação aos grupos Controle e Repetido [$F_{(3,15)} = 16,66$; $p < 0,01$], na análise dos níveis de pCREB, houve aumento do grupo Agudo em relação aos demais grupos adolescentes [$F_{(3,15)} = 5,66$; $p < 0,01$]. A ANOVA-1 via para os grupos adultos revelou aumento no nível protéico do grupo Agudo em relação a todos os outros grupos adultos tanto para CREB [$F_{(3,16)} = 5,33$; $p < 0,01$] quanto para pCREB [$F_{(3,16)} = 4,59$; $p < 0,05$].

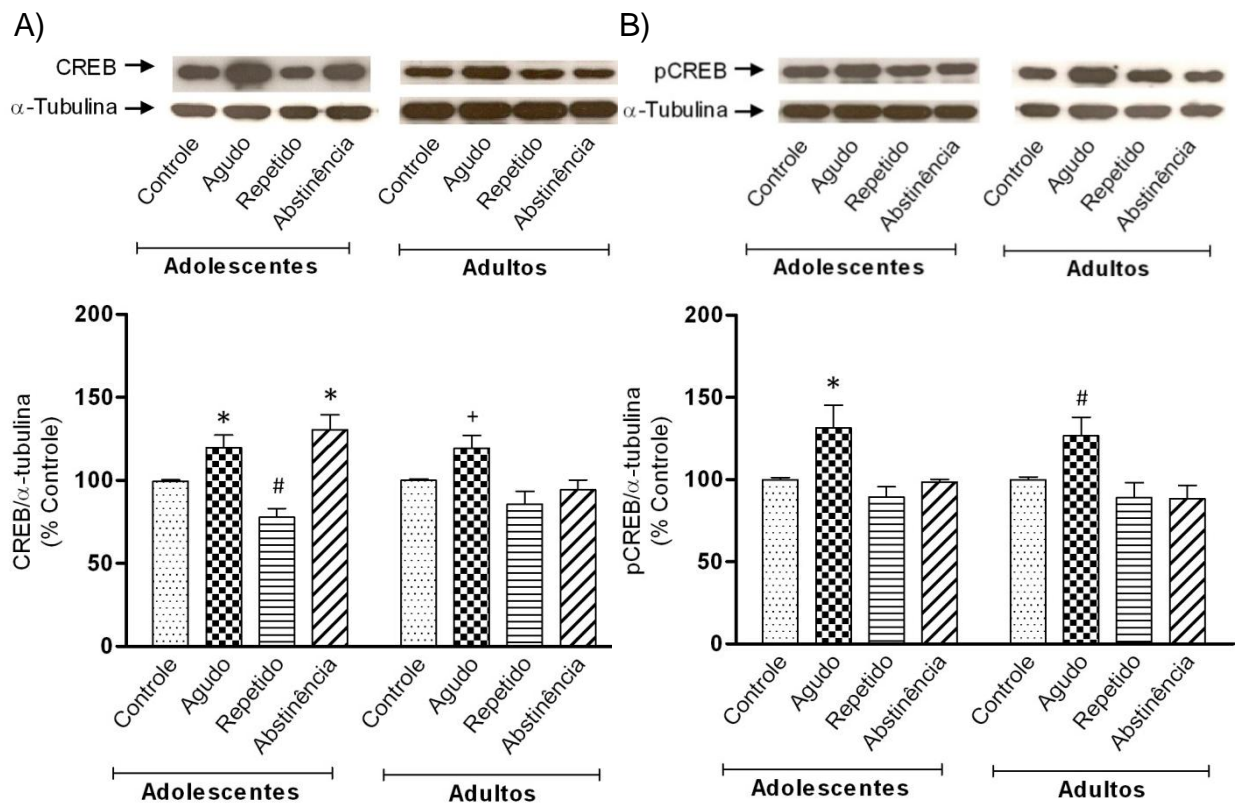


Figura 17 - A) Nível protéico de CREB no córtex pré-frontal. Nos animais adolescentes, houve diminuição do nível protéico no grupo Repetido em relação a todos os grupos (# $p < 0,01$) e aumento nos grupos Agudo e Abstinência em relação aos grupos Controle e Repetido (* $p < 0,01$). Nos animais adultos, houve aumento no grupo Agudo comparado aos demais grupos (+ $p < 0,01$). **B)** Nível protéico de pCREB no córtex pré-frontal. Houve aumento do nível protéico no grupo Agudo em relação aos demais grupos tanto nos adolescentes (* $p < 0,01$) quanto nos adultos (# $p < 0,05$). Os dados representam média \pm erro padrão médio. $N=5$.

4.3.2 Níveis protéicos de CREB e pCREB no hipocampo

A figura 18 mostra um gel representativo e os níveis protéicos de CREB (18A) e pCREB (18B) no hipocampo de camundongos adultos e adolescentes. A ANOVA-1 via para analisar os níveis protéicos de CREB nos animais adolescentes revelou diminuição no grupo Repetido em relação ao Controle e aumento no grupo Abstinência comparado a todos os grupos [$F_{(3,15)} = 14,06$; $p < 0,01$], e os níveis de pCREB apresentaram a mesma modulação encontrada na análise de CREB [$F_{(3,14)} = 10,66$; $p < 0,01$]. A ANOVA-1 via para os grupos adultos revelou aumento no nível protéico de CREB no grupo Abstinência em relação ao Repetido [$F_{(3,17)} = 3,40$; $p < 0,05$], bem como tendência de diminuição no grupo Repetido em relação ao Controle ($p = 0,06$) e ausência de efeito no nível de pCREB [$F_{(3,16)} = 0,53$; $p > 0,05$].

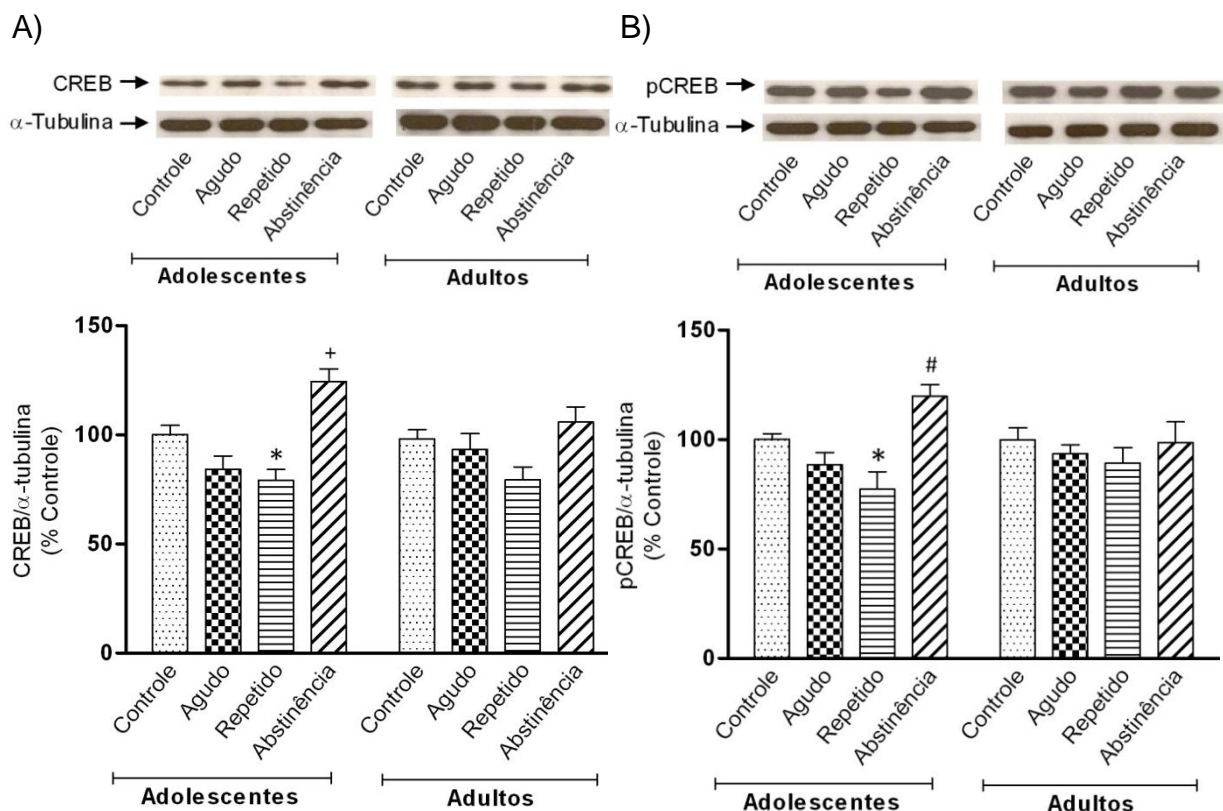


Figura 18 - A) Nível protéico de CREB no hipocampo. Nos animais adolescentes, houve diminuição do nível protéico no grupo Repetido em relação ao grupo Controle (* $p < 0,01$) e aumento no grupo Abstinência comparado a todos os grupos (+ $p < 0,01$). Nos animais adultos, houve tendência de diminuição no grupo Repetido comparado ao grupo Controle ($p = 0,06$). **B)** Nível protéico de pCREB no hipocampo. Nos animais adolescentes houve diminuição no grupo Repetido em relação ao grupo Controle (* $p < 0,01$) e aumento no grupo Abstinência comparado a todos os grupos (# $p < 0,01$). Os dados representam média \pm erro padrão médio. $N = 5$.

4.3.3 Níveis protéicos de BDNF e TrkB no córtex pré-frontal

A figura 19 mostra um gel representativo e os níveis protéicos de BDNF (19A) e TrkB (19B) no córtex pré-frontal de camundongos adultos e adolescentes. A ANOVA-1 via para os animais adolescentes mostrou ausência de efeito no nível protéico de BDNF [$F_{(3,14)} = 0,53$; $p > 0,05$] e de TrkB [$F_{(3,15)} = 2,13$; $p > 0,05$]. A ANOVA-1 via para os animais adultos revelou aumento do nível protéico de BDNF nos grupos Repetido e Abstinência em relação ao Controle [$F_{(3,14)} = 4,45$; $p < 0,05$] e ausência de efeito no nível de TrkB [$F_{(3,15)} = 0,37$; $p > 0,05$].

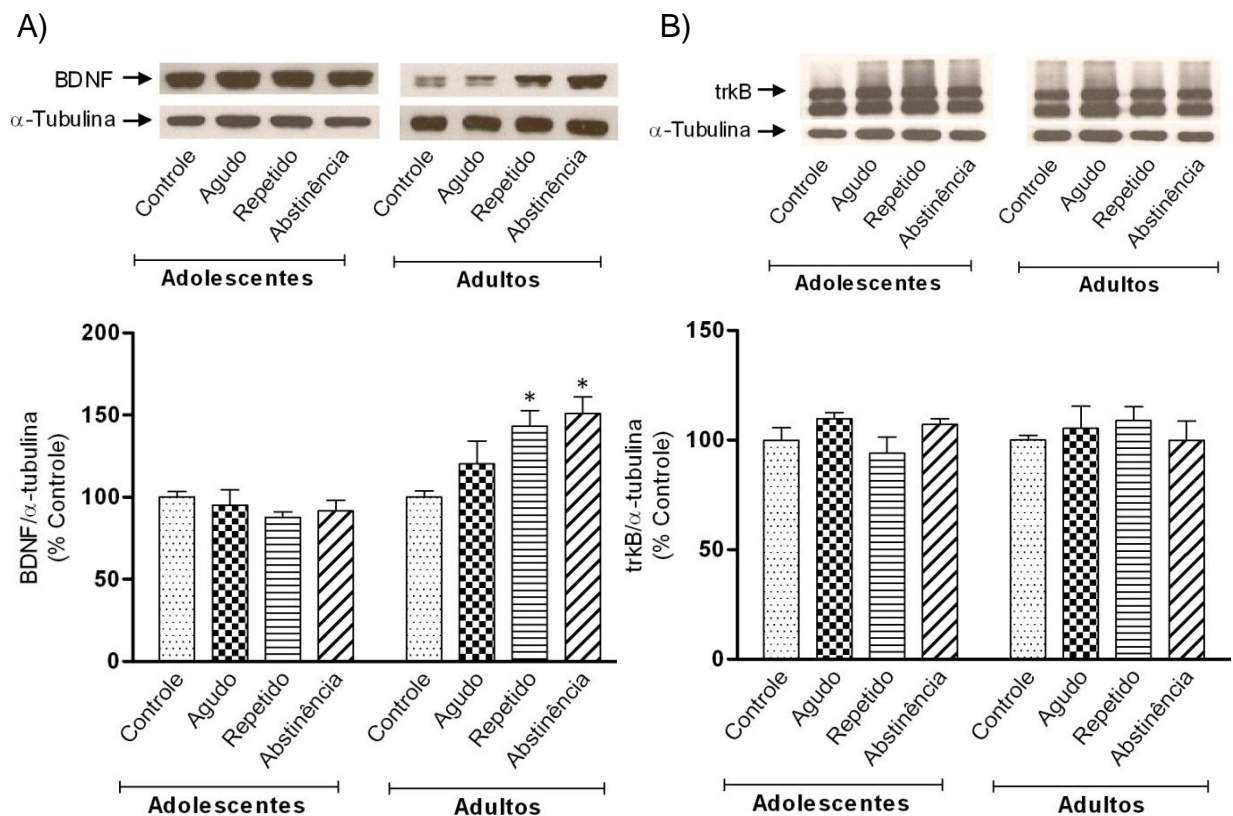


Figura 19 - A) Nível protéico de BDNF no córtex pré-frontal. Houve aumento dos níveis protéicos nos grupos Repetido e Abstinência adultos em relação ao grupo Controle (* $p < 0,05$). **B)** Nível protéico de TrkB no córtex pré-frontal. Os dados representam média \pm erro padrão médio. N=5.

4.3.4 Níveis protéicos de BDNF e TrkB no hipocampo

A figura 20 mostra um gel representativo e os níveis protéicos de BDNF (20A) e TrkB (20B) no hipocampo de camundongos adultos e adolescentes. A ANOVA-1

via para os animais adolescentes mostrou ausência de efeito no nível protéico de BDNF [$F_{(3,14)} = 1,07$; $p > 0,05$] e de TrkB [$F_{(3,15)} = 0,60$; $p > 0,05$]. A ANOVA-1 via para os grupos adultos revelou aumento do nível protéico de BDNF nos grupos Agudo e Repetido em relação ao Controle [$F_{(3,14)} = 5,01$; $p < 0,05$] e ausência de efeito no nível de TrkB [$F_{(3,16)} = 0,87$; $p > 0,05$].

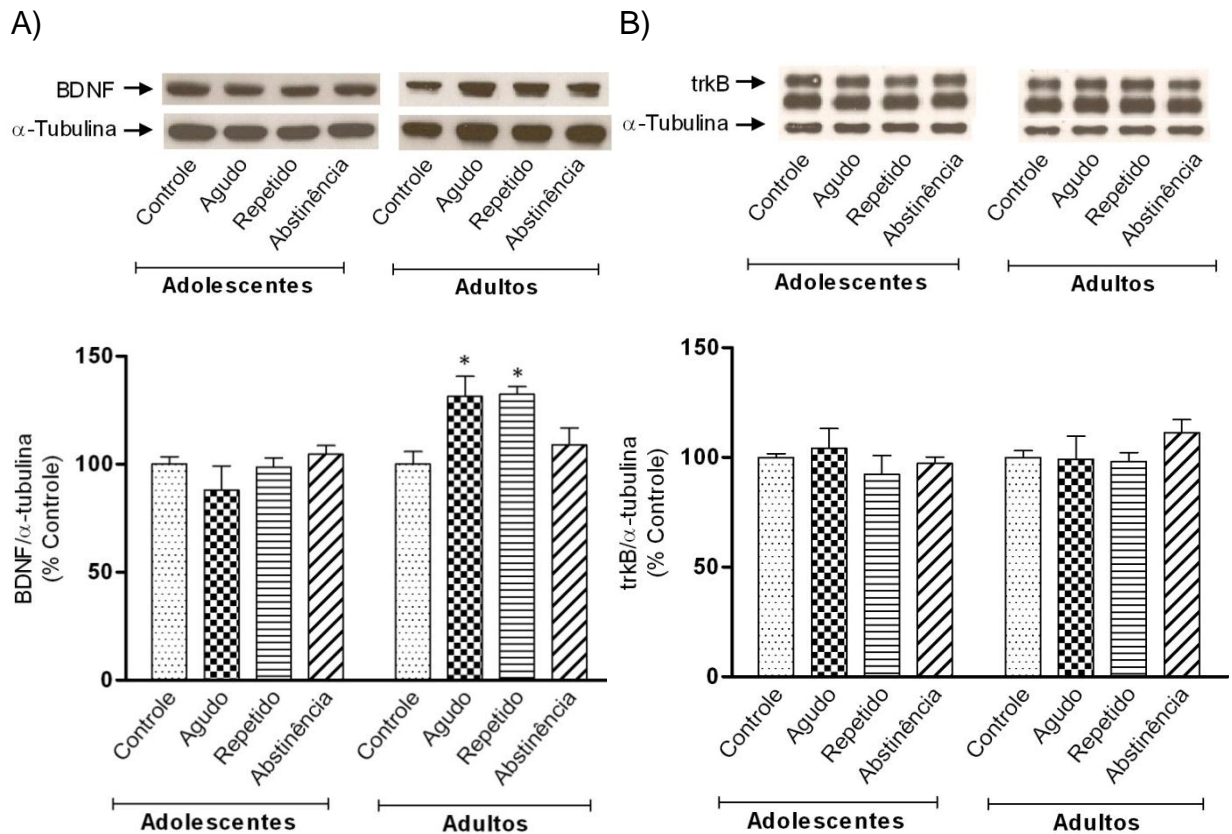


Figura 20 - A) Nível protéico de BDNF no hipocampo. Houve aumento do nível protéico nos grupos Agudo e Repetido adultos em relação ao grupo Controle (* $p < 0,05$). **B)** Nível protéico de TrkB no hipocampo. Os dados representam média \pm erro padrão médio. $N=5$.

4.4 Avaliação da expressão de RNAm por qPCR

Pelo fato dos dados representarem uma medida relativa, a análise de variância foi realizada entre os grupos de mesmo controle, desta forma, cada uma das idades foi analisada separadamente.

4.4.1 Expressão de BDNF e TrkB no córtex pré-frontal

A figura 21 mostra a expressão relativa de RNAm de BDNF (21A) e TrkB (21B) no córtex pré-frontal de camundongos adolescentes e adultos. A ANOVA-1 via para os animais adolescentes mostrou aumento da expressão de BDNF nos grupos Agudo e Repetido em relação ao grupo Controle e no grupo Abstinência em relação a todos os grupos [$F_{(3,14)} = 15,20$; $p < 0,01$], e na análise do TrkB, houve aumento de expressão nos grupos Agudo, Repetido e Abstinência em relação ao grupo Controle [$F_{(3,14)} = 3,99$; $p < 0,05$]. Por outro lado, a ANOVA-1 via para os grupos adultos revelou diminuição da expressão de BDNF nos grupos Agudo e Repetido em relação ao Controle [$F_{(3,16)} = 6,87$; $p < 0,01$] e diminuição da expressão de TrkB nos grupos Agudo, Repetido e Abstinência em relação ao Controle [$F_{(3,16)} = 8,34$; $p < 0,01$].

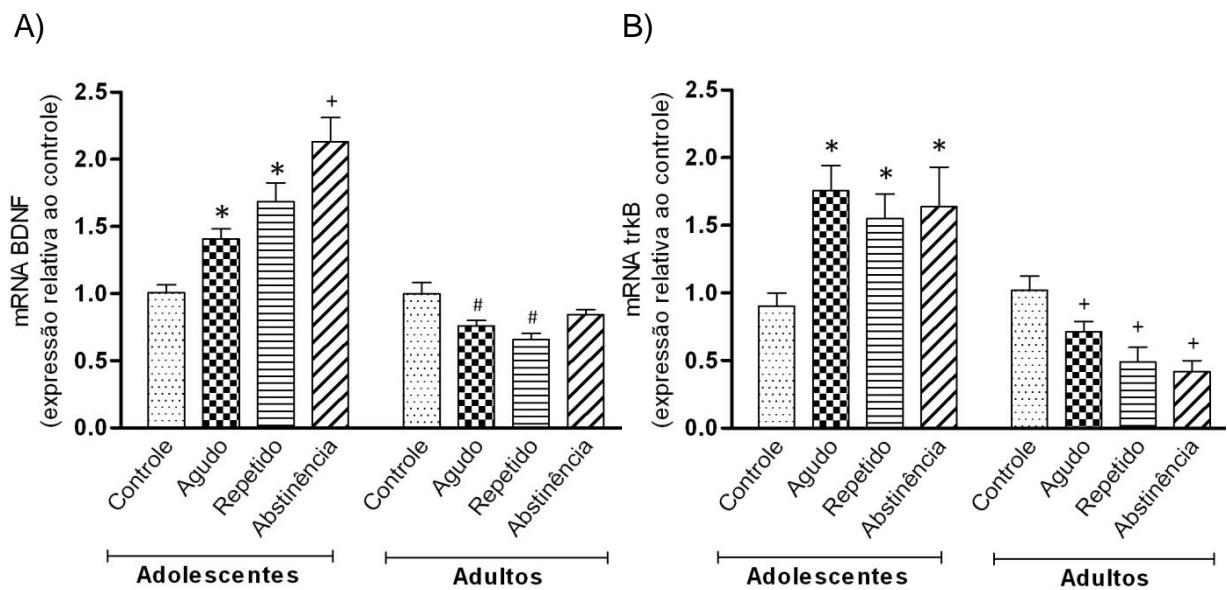


Figura 21 - A) Expressão de BDNF no córtex pré-frontal. Nos animais adolescentes, houve aumento de expressão nos grupos Agudo e Repetido em relação ao Controle (* $p < 0,01$) e aumento no grupo Abstinência em relação a todos os grupos (+ $p < 0,01$). Nos animais adultos, houve diminuição de expressão nos grupos Agudo e Repetido em comparação ao grupo Controle (# $p < 0,01$). **B)** Expressão de TrkB no córtex pré-frontal. Nos animais adolescentes, houve aumento de expressão nos grupos Agudo, Repetido e Abstinência em relação ao Controle (* $p < 0,05$). Nos animais adultos, houve diminuição nos grupos Agudo, Repetido e Abstinência em relação ao Controle (+ $p < 0,01$). Os dados representam média \pm erro padrão médio. N=5.

4.4.2 Expressão de BDNF e TrkB no hipocampo

A figura 22 mostra a expressão relativa de RNAm de BDNF (22A) e TrkB (22B) no hipocampo de camundongos adolescentes e adultos. A ANOVA-1 via para os animais adolescentes mostrou diminuição de expressão de BDNF nos grupos Repetido e Abstinência em relação ao grupo Controle e diminuição no grupo Agudo em relação aos grupos Controle e Repetido [$F_{(3,16)} = 9,58$; $p < 0,01$], e na análise do TrkB houve diminuição nos grupos Repetido e Abstinência em relação ao grupo Controle e diminuição no grupo Agudo em relação aos grupos Controle e Abstinência [$F_{(3,15)} = 11,34$; $p < 0,01$]. A ANOVA-1 via para os grupos adultos revelou diminuição da expressão de BDNF no grupo Agudo em relação a todos os outros grupos [$F_{(3,16)} = 3,82$; $p < 0,05$] e ausência de efeito na expressão de TrkB [$F_{(3,16)} = 0,36$; $p > 0,05$].

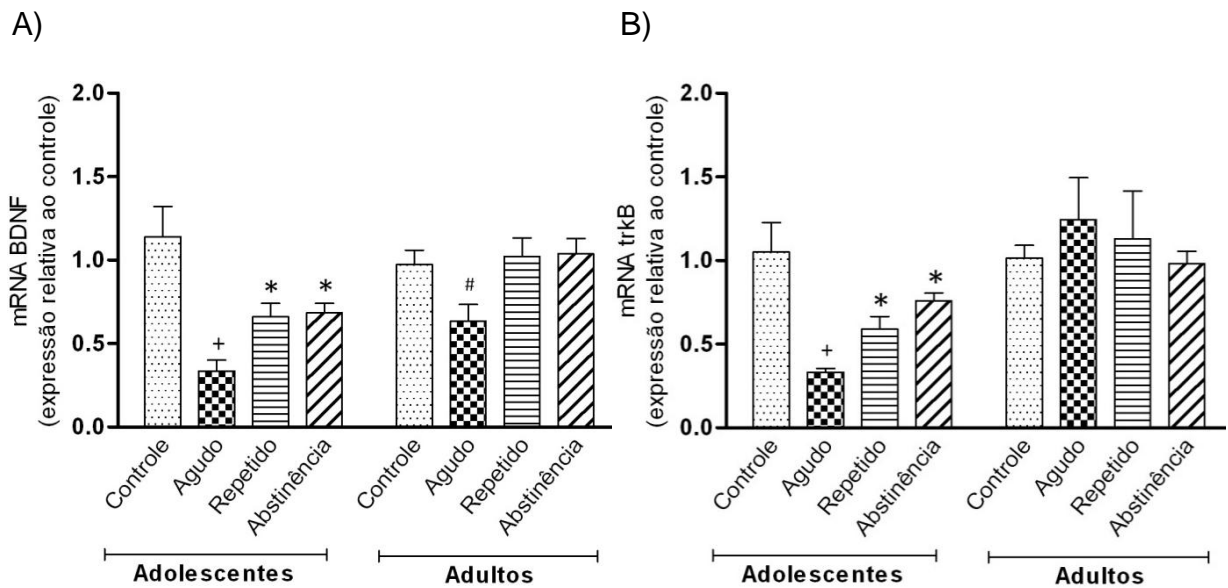


Figura 22 - A) Expressão de BDNF no hipocampo. Nos animais adolescentes, houve diminuição de expressão nos grupos Repetido e Abstinência em relação ao Controle (* $p < 0,01$) e diminuição no grupo Agudo em relação aos grupos Controle e Repetido (+ $p < 0,01$). Nos animais adultos, houve diminuição de expressão no grupo Agudo em comparação ao grupo Controle (# $p < 0,05$). **B)** Expressão de TrkB no hipocampo. Nos animais adolescentes, houve diminuição de expressão nos grupos Repetido e Abstinência em relação ao Controle (* $p < 0,01$) e diminuição no grupo Agudo comparado aos grupos Controle e Abstinência (+ $p < 0,01$). Os dados representam média \pm erro padrão médio. N=5.

5 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram sensibilização locomotora nos animais de ambas as idades e uma resposta exacerbada à cocaína pelos adolescentes, sugerindo uma maior sensibilidade aos efeitos da droga por esses animais, o que corrobora resultados do laboratório conduzidos com outra linhagem de camundongos (Camarini et al., 2008).

A diferença de resposta comportamental e neuroquímica entre adultos e adolescentes no tratamento com psicoestimulantes tem sido relatada por diversos autores (Laviola et al., 1995; Philpot e Kirstein, 1999; Collins e Izenwasser, 2002; Ehrlich et al., 2002; Stansfield e Kirstein, 2005; Frantz et al., 2007), no entanto, há divergências nos estudos sobre os efeitos da administração de psicoestimulantes dependente da idade. Por exemplo, muitos trabalhos têm mostrado que roedores adolescentes e periadolescentes apresentam sensibilidade reduzida à ativação locomotora da cocaína e anfetamina (Laviola et al., 1995; Maldonado e Kirstein 2005; Bolanos et al., 1998; Mathews e McCormick 2007; Mathews et al., 2009), enquanto outros mostram uma maior estimulação nesse grupo em comparação aos adultos, especialmente no tratamento com cocaína (Badanich et al., 2008; Caster et al., 2007; Catlow e Kirstein 2005). O mesmo ocorre em estudos de sensibilização, por exemplo, alguns mostram sensibilização aos efeitos locomotores de psicoestimulantes em roedores adolescentes e adultos (Laviola et al., 1995; Kameda et al., 2011), enquanto outros mostram ausência desse efeito em uma das idades (Collins e Izenwasser, 2002; Guerriero et al., 2006; Camarini et al., 2008). Essas divergências poderiam ser explicadas pela dose aplicada, manuseio dos animais, espécie ou linhagem utilizada. Em resumo, existem variações das respostas comportamentais à cocaína dependentes do genótipo e da idade, sugerindo: 1- que as respostas agudas e prolongadas à cocaína podem depender da dose, da espécie, linhagem e tempo de administração, dentre outros fatores; 2- que as diferenças neuronais entre adolescentes e adultos podem determinar respostas comportamentais diferenciais.

Estudos mostram que uma resposta locomotora inicial baixa à cocaína está associada a um aumento do comportamento relacionado à droga, por exemplo, aumento da sensibilização locomotora e da preferência condicionada. Por outro lado, Schramm-Sapyta et al. (2011) mostraram que ratos com alta resposta

locomotora à cocaína obtiveram mais infusões durante a auto-administração comparados aos que apresentaram baixa resposta locomotora. Apesar das divergências, a importância desses estudos é fortalecida por trabalhos que demonstram que as diferenças individuais de sensibilidade à experiência inicial com drogas psicoativas estão relacionadas ao risco de dependência (Lambert et al., 2006; Davidson et al., 1993; Foltin e Fischman, 1991).

A exposição a um ambiente novo e não familiar pode induzir aumento de exploração e comportamento ansioso induzido por *stress* nos animais, impactando os resultados de atividade locomotora (Dunne et al., 2007; Allan et al., 2007). Por esse motivo, os animais foram submetidos ao campo-aberto por dois dias, antes do início dos testes. Houve diminuição da atividade locomotora em H2 comparada a H1 sugerindo habituação ao aparato, no entanto, a desconstrução da ANOVA revelou uma habituação mais pronunciada nos adolescentes, fato relatado anteriormente por Stansfield e Kirstein (2005), que mostraram que ratos adolescentes habituam significativamente mais rápido do que os adultos tanto a um ambiente quanto a um estímulo novo.

Nesse sentido, é interessante notar que os animais adolescentes apresentaram uma resposta exacerbada à administração de cocaína apenas no último dia de tratamento, mas não em D1 e D8. A exacerbação da atividade locomotora em D1 e D8 (em comparação aos adultos) pode ter sido mascarada pelo fato dos animais adolescentes estarem sujeitos a uma habituação mais rápida do que os adultos. Uma única exposição breve ao ambiente de teste pode induzir uma inibição comportamental que é retida (Carey et al., 1998; Schiltein et al., 2002) e pode atenuar os efeitos locomotores da cocaína, já que uma dose da droga capaz de provocar estimulação locomotora em um ambiente de teste gera uma estimulação locomotora substancialmente menor quando administrada após familiarização dos animais com o ambiente (Carey et al., 2005; Kiyatkin, 1992). De fato, Maldonado e Kirstein (2005) mostraram que ratos adolescentes são mais sensíveis à alteração da ativação locomotora em resposta à cocaína em consequência de manipulações laboratoriais básicas.

A habituação é apontada por alguns autores como um modelo para os processos de memória (Schiltein et al., 2000; Tomaz et al., 1990). De acordo com Platel e Porsolt (1982), a habituação da atividade exploratória serve como um índice de retenção de memória e decresce conforme aumenta o intervalo entre as sessões

de exposição ao ambiente. Em geral esses estudos usam a atividade exploratória para medir os efeitos da habituação, por exemplo, quantifica-se o levantar ou a atividade locomotora central no campo-aberto, mas a atividade locomotora total também é usada nessa avaliação (Carey et al., 2005). Embora os animais de ambas as idades tenham apresentado habituação da atividade exploratória pela diminuição da atividade locomotora central em H2 em comparação à H1, os adolescentes mostraram uma habituação da atividade locomotora total mais robusta, o que pode estar relacionado a uma maior capacidade natural de retenção de memória nesse grupo. Vale ressaltar que o processo de memória responsável pela inibição comportamental pode bloquear os efeitos locomotores da cocaína sem alterar a ativação neuroquímica induzida pela droga (Carey et al., 2005).

O condicionamento Pavloviano reflete um processo de aprendizado associativo entre um estímulo inicialmente neutro, o estímulo condicionado (EC), com um estímulo, compensatório ou aversivo, não-condicionado (ENC). Assim, o aumento de atividade locomotora após uma injeção de salina em D9 parece ser o resultado da associação entre o EC (exposição ao campo-aberto) com o ENC (cocaína). Os animais previamente tratados com cocaína e expostos ao campo-aberto apresentaram um aumento da atividade locomotora quando re-expostos ao mesmo ambiente sob efeito da salina. Esse resultado vai ao encontro de diversos estudos que têm demonstrado o envolvimento de um forte componente contexto-dependente na sensibilização comportamental (Kalivas e Alesdatter, 1993a; Weiss et al., 1989), embora ela também ocorra quando a droga é administrada com uma exposição mínima ao ambiente de teste (Beinfeld et al., 2002; Carlezon et al., 1995). Os adolescentes apresentaram uma resposta locomotora maior em D9 comparados aos adultos, o que parece refletir um efeito mais pronunciado de condicionamento ao ambiente de teste nesse grupo.

Embora as variações neuroquímicas que contribuem para diferenças comportamentais entre adultos e adolescentes não sejam bem conhecidas, alguns estudos propõem que essas diferenças sejam mediadas primariamente por um diferente grau de maturação nos sistemas dopaminérgicos cerebrais (Shalaby et al., 1981; Spear e Brake, 1983; Kalsbeek et al., 1988). Conforme relatado em Camarini et al. (2008), os adolescentes apresentam um pico extracelular de dopamina no NAc mais rápido do que os adultos em resposta à administração de cocaína. Esse aumento precoce na liberação de dopamina poderia refletir uma

combinação do efeito da droga somado ao efeito da expectativa induzida por ela (Philpot e Kirstein, 1999). Assim, o fato dos animais adolescentes mostrarem um efeito de condicionamento ao ambiente mais pronunciado do que os adultos pode estar relacionado ao aumento da expectativa pela droga e a um possível aumento nos níveis de dopamina. Esse aumento de dopamina também poderia estar contribuindo para o aumento da resposta locomotora dos animais adolescentes na administração de cocaína.

Além da atividade locomotora total, a organização espacial da locomoção é um parâmetro de grande importância no estudo dos efeitos de psicoestimulantes. Já está bem estabelecido o fato de roedores mostrarem uma maior locomoção periférica próxima às paredes do campo-aberto e evitarem a área central, efeito denominado tigmotaxia (Eilam, 2003; Groenink et al., 2003; Paulus et al., 1999; Wang et al., 2003). O aumento da taxa de atividade locomotora central sem alteração da atividade locomotora total pode ser interpretado como um efeito ansiolítico, enquanto o oposto, isto é, diminuição da variável e consequente aumento de tigmotaxia, está associado a um efeito ansiogênico (Prut e Belzung, 2003). Os resultados mostraram que os adolescentes tratados com salina apresentaram menor tigmotaxia do que os adultos tratados com salina, sugerindo um nível de ansiedade basal mais baixo nos animais daquele grupo.

Diversos estudos mostram que os camundongos apresentam variação natural de comportamento ansioso dependente da linhagem, por exemplo, os do tipo BALB/c e DBA2J têm sido apontados como animais de comportamento mais ansioso em diversos paradigmas, enquanto a linhagem C57BL/6 apresenta menor comportamento ansioso (Griebel et al., 2000; Bouwknecht e Paylor, 2002; Kopp et al., 1999; Tang et al., 2002; Yilmazer-Hanke et al., 2003). Outros estudos mostram que os animais heterogênicos da linhagem *Swiss webster*, usada neste trabalho, apresentam diferentes níveis de *stress*, ansiedade e comportamento defensivo quando comparados a linhagens isogênicas (Van Bogaert et al., 2006; Yang et al., 2004; Rodgers et al., 2002). Apesar de diversos estudos mostrarem diferenças basais de ansiedade entre linhagens, pouco se sabe sobre as diferenças naturais de ansiedade entre adultos e adolescentes dentro de uma mesma linhagem. Neste aspecto, Moore et al. (2011) demonstraram pelo teste LCE uma menor ansiedade basal em animais adolescentes da linhagem DBA2J e uma maior ansiedade em adolescentes C57BL/6 comparados aos adultos.

Alguns trabalhos mostraram que um baixo nível de ansiedade basal pode determinar uma maior busca pela droga (Schramm-Sapyta et al., 2011; Bush e Vaccarino, 2007). Pelo fato da cocaína apresentar um conhecido efeito ansiogênico (Ettenberg e Geist, 1993; Geist e Ettenberg, 1990; Panlilio et al., 2007), pode-se pensar na hipótese de que a droga pode tornar-se mais aversiva em animais com alto índice de ansiedade basal, limitando os efeitos de recompensa da mesma.

O aumento de tigmotaxia nos animais tratados com cocaína em comparação aos tratados com salina em D1 e D8 demonstra um efeito ansiogênico da droga nos dois grupos de idade, porém, apenas os adolescentes tratados com cocaína apresentaram diferença significativa em relação ao seu controle. Em D20, houve aumento de tigmotaxia no grupo Agudo, no entanto, a desconstrução da ANOVA revelou efeito nos adolescentes dos grupos Agudo e Abstinência, mas não nos adultos. Esses resultados sugerem maior suscetibilidade aos efeitos ansiogênicos da droga nos animais adolescentes. A ausência de efeito no grupo Repetido pode estar relacionada ao aumento de atividade locomotora total, o que leva a um aumento nem sempre proporcional da atividade locomotora central, impedindo a avaliação correta da tigmotaxia.

O teste do labirinto em cruz elevado tem sido usado como um modelo simples para medir comportamento tipo ansiedade em roedores e para avaliar drogas ansiogênicas e ansiolíticas. Esse modelo explora a aversão gerada no animal quando colocado em um aparato elevado que possui um braço aberto. Drogas ansiogênicas reduzem o número de entradas e o tempo gasto no braço aberto, enquanto drogas ansiolíticas geram efeito oposto (Pellow et al., 1985). No teste realizado durante o período de abstinência, houve diminuição do tempo gasto nos braços abertos pelos animais tratados com cocaína. Esse dado sugere preferência dos animais pelos braços fechados durante a abstinência, refletindo aumento da aversão aos braços abertos causada pelo sinergismo do efeito da droga mais o medo e ansiedade induzidos pela altura e por espaços abertos (Rogerio e Takahashi, 1992; Pellow e File, 1986). No entanto, somente os animais adolescentes apresentaram diferença significativa em relação ao seu grupo controle, sugerindo um maior efeito ansiogênico nesse grupo. Os adolescentes tratados com salina gastaram mais tempo nos braços abertos em comparação a todos os outros grupos, além de apresentarem maior número de entradas nesse braço, demonstrando baixo índice de ansiedade basal. Em conclusão, o teste do LCE

mostrou os mesmos resultados encontrados na tigmotaxia, isto é, os adolescentes apresentaram um baixo nível de ansiedade basal em relação aos adultos e foram mais sensíveis aos efeitos ansiogênicos da cocaína.

Em resumo, os resultados dos testes de atividade locomotora mostraram que embora os animais de ambas as idades tenham sensibilizado, os adolescentes apresentaram maior ativação locomotora em resposta à cocaína, além de maior efeito de habituação e de condicionamento ao ambiente de teste. Os testes de ansiedade, por sua vez, mostraram que os adolescentes partem de um nível de ansiedade basal mais baixo e são mais sensíveis aos efeitos ansiogênicos da droga.

Além das manifestações comportamentais, a cocaína também promove alterações neuroquímicas. Muitos estudos indicam que a atividade neuronal no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico está relacionada com o efeito de recompensa da cocaína (Wise, 2004; Pierce e Kumaresan, 2006) e contribui para a recaída (Shalev et al., 2002; Kalivas e McFarland, 2003). Uma hipótese importante sobre a dependência à cocaína é a de que ela decorra de neuroadaptações induzidas pelo uso da droga nos processos de aprendizado e memória associados à recompensa no sistema acima citado e no circuito glutamatérgico corticolímbico (Nestler, 2002; Wolf et al., 2004; Everitt e Robbins, 2005). Essas neuroadaptações têm sido apontadas como causa da hipersensibilidade a sinais associados à droga (Di Chiara, 1998; Everitt e Wolf, 2002), da tomada de decisão impulsiva (Jentsch e Taylor, 1999; Volkow e Fowler, 2000) e do aprendizado de comportamentos/hábitos anormais (White, 1996). O córtex pré-frontal, uma região crítica para o controle impulsivo e comportamentos dirigidos a um objetivo, e o hipocampo, estrutura chave nos processos de memória, são duas das regiões em que essas neuroadaptações ocorrem.

A expressão gênica tem papel central na LTP (Nguyen et al., 1994). A plasticidade sináptica pode ser dividida em duas formas temporariamente distintas: uma forma curta, que dura minutos e depende de modificações covalentes de proteínas preexistentes e do reforço de conexões preexistentes, e a de longo prazo, que pode durar dias ou semanas e requer síntese protéica e o estabelecimento de novas conexões sinápticas (Kandel, 2001). A consolidação da memória depende de expressão gênica nova, e a inibição da síntese de RNAm ou de proteína prejudica a formação da memória de longo prazo (Flexner et al., 1965; Abel et al., 1998; Abel et al., 1997; Kida et al., 2002). Diversas evidências sugerem que o CREB, por meio da

indução da expressão gênica, seja um elemento chave na conversão da memória de curto em longo prazo, já que a diminuição da ação desse fator de transcrição prejudica a consolidação da memória e certas formas de LTP (Bourtchuladze et al., 1994; Kida et al., 2002; Pittenger et al., 2002). O gene da neurotrofina BDNF é um alvo de ativação do CREB (Tao et al., 1998; Shie et al., 1998), e seu produto protéico está envolvido em diferentes aspectos do processamento da memória e aprendizado (Alonso et al., 2002; Bekinschtein et al., 2008).

A dopamina é um neurotransmissor que desempenha um importante papel nos processos de aprendizado e memória, e muitas funções do aprendizado, como a recompensa, atenção e medo, são influenciadas pelo sistema dopaminérgico (Beninger e Miller, 1998; Cole e Robbins, 1989; Granon et al., 2000; Nader e LeDoux, 1999). Psicoestimulantes, em geral, atuam no sentido de aumentar a consolidação da memória, até mesmo facilitando o aprendizado de comportamentos que não envolvem o consumo da droga. Por exemplo, injeções sistêmicas de anfetamina após treinamento podem aumentar o aprendizado em tarefas de recompensa por alimentos (Krivanek e McGaugh, 1969; Wyvell e Berridge, 2001). Alguns estudos mostraram que a atividade do receptor dopaminérgico D1 no CPF pode influenciar o armazenamento da memória de longo prazo (Floresco e Phillips, 2001; Runyan e Dash, 2004). Por exemplo, Hotte et al. (2005) mostraram que uma dose alta de agonista dopaminérgico para RD1 em ratos facilita a recuperação de informação em testes de memória de reconhecimento e posição de objetos e na memória temporal após um período de 4 h, mas não após 15 min. Um estudo posterior mostrou que essa melhora na memória obtida pela injeção de agonista dopaminérgico para RD1 está associada a um aumento de fosforilação de CREB e DARPP-32 no córtex pré-frontal, e que o prejuízo de memória obtido pela administração de um antagonista dopaminérgico para RD1 está associado a uma diminuição de fosforilação dessas proteínas nessa mesma estrutura cerebral (Hotte et al., 2006).

Este trabalho mostrou aumento no nível protéico de CREB e pCREB no CPF dos animais 1 h após administração aguda de cocaína, sugerindo uma facilitação do processo de aprendizado e memória. Essa facilitação poderia estar envolvida na associação da droga com o contexto, demonstrada em D9. É interessante notar que os trabalhos da literatura não mostram aumento de ativação de CREB na administração aguda da cocaína, mas sim ausência de alteração nos níveis

protéicos desse fator (Edwards et al., 2007; Fumagalli et al., 2007). Essa diferença de resposta pode estar relacionada a variações de protocolo, por exemplo, esses trabalhos quantificaram a fosforilação de CREB, respectivamente 4 h e 2 h após a injeção da droga. Outra hipótese para explicar o aumento encontrado seria o fato dos animais já terem sido previamente expostos ao ambiente de teste, o que pode ter facilitado a formação de memória de associação, uma vez que Hotte et al. (2006) mostraram que a administração de um agonista dopaminérgico para RD1 aumenta o nível de pCREB no CPF de camundongos levando a uma melhora na performance de recuperação da memória. Além disso, a ativação de CREB no CPF de ratos tem sido relacionada ao aumento do comportamento de preferência condicionada (Haghparast et al., 2011).

Os animais adolescentes apresentaram diminuição de CREB e pCREB no hipocampo após tratamento repetido com a droga, acompanhada por um decréscimo de CREB no córtex pré-frontal, enquanto os adultos mostraram apenas uma tendência à diminuição de CREB no hipocampo. A literatura mostra divergências nos resultados obtidos após tratamento prolongado com cocaína tanto no córtex pré-frontal como no hipocampo de roedores, por exemplo, no CPF, foram relatados aumento de CREB e pCREB (Fumagalli et al., 2007), ausência de alteração de pCREB (Edwards et al., 2007) e diminuição de CREB acompanhada de aumento de pCREB (Hye-Jean et al., 2010), também é interessante notar que o nível de pCREB no CPF dos animais sob tratamento repetido encontrado no presente trabalho não tenha acompanhado a expressão da sensibilização comportamental, como relatado em Hye-Jean et al. (2010). No hipocampo, os estudos mostram tanto aumento como ausência de alteração nos níveis de pCREB (Edwards et al., 2007; Yu-Min et al., 2007). Essas respostas divergentes podem ocorrer devido a diferenças nos delineamentos experimentais. Vale ressaltar que os protocolos de tratamento prolongado com cocaína, em sua maioria, não envolvem períodos de abstinência, isto é, as estruturas encefálicas dos animais são avaliadas após a última injeção da droga. A importância dessa variação pode ser observada no trabalho de McDaid et al. (2006), que mostrou aumento de pCREB no córtex pré-frontal de ratos tratados cronicamente com metanfetamina após um período de 3 dias de abstinência, mas não após 14 dias de abstinência, enquanto no NAc não foram registradas alterações após 3 dias de abstinência, contrapondo-se à diminuição de pCREB encontrada após 14 dias de abstinência.

Um estudo mostrou que os efeitos ansiolíticos e antidepressivos do rolipram são acompanhados pelo aumento de pCREB no CPF e hipocampo de ratos, bem como pelo aumento da neurogênese nesta estrutura (Li et al., 2009), enquanto a diminuição da atividade de CREB no córtex de roedores tem sido associada ao aumento de ansiedade (Rubino et al., 2008). Desta forma, a diminuição dos níveis protéicos de CREB e/ou pCREB no CPF e hipocampo dos adolescentes em resposta à administração prolongada de cocaína pode, em parte, estar relacionada ao aumento do comportamento ansioso apresentado por esses animais. No entanto, podemos inferir que a modulação do CREB não está sendo determinada exclusivamente por mecanismos relacionados a esse comportamento já que, durante a abstinência, os adolescentes apresentaram ansiogênese acompanhada por aumento dos níveis de CREB.

Embora os adolescentes tenham apresentado diminuição nos níveis protéicos de CREB e/ou pCREB no CPF e hipocampo após tratamento repetido com a droga, a resposta durante a abstinência foi oposta, isto é, houve aumento desse fator de transcrição nessas estruturas. A ativação da expressão gênica dependente de CREB no hipocampo por sinalização monoaminérgica ou dopaminérgica facilita a indução de LTP e processos de aprendizado dependentes de LTP durante a excitação e atenção (Reymann e Frey, 2007; Barco et al., 2008). Esse efeito modulatório poderia levar a um estado favorável ao aprendizado no qual uma relativa alteração durável na excitabilidade neuronal suportaria uma facilitação no aprendizado de tarefas (Zelcer et al., 2006). Desta forma, o aumento nos níveis protéicos de CREB e pCREB encontrado nos adolescentes, mas não nos adultos, sugere uma facilitação da neuroplasticidade induzida pela droga durante a abstinência, que poderia estar envolvida com o aumento do risco de recaída nesse grupo.

A interrupção abrupta do uso de drogas de abuso pode originar sintomas de abstinência físicos e emocionais (Gawin e Ellinwood, 1989; Markou e Koob, 1991). Os fenômenos da tolerância e da abstinência parecem ser o resultado, pelo menos em parte, de adaptações compensatórias que ocorrem durante o uso de drogas. Em resposta à potente estimulação da substância, essas adaptações atuam no sentido de manter o equilíbrio reduzindo os efeitos da mesma (tolerância). Na ausência da droga essas adaptações não são mascaradas, e uma parte delas pode produzir sintomas geralmente opostos ao da droga (abstinência). Assim, a ativação de CREB encontrada no CPF dos animais após injeção aguda de cocaína, mas não nos

animais sob tratamento crônico parece refletir um efeito de tolerância, enquanto a diminuição nos níveis de CREB e pCREB encontrada no CPF e hipocampo dos adolescentes tratados repetidamente com cocaína em contraposição ao aumento desses fatores na abstinência sugere uma tentativa do organismo de reverter a modulação induzida pela droga com o objetivo de restaurar a homeostase.

A análise dos níveis de BDNF revelou uma divergência entre a expressão de RNAm e os níveis protéicos. Esse fato pode estar relacionado a uma importante questão, ainda em debate, sobre onde exatamente ocorre a modulação da expressão de BDNF. Ela pode ocorrer localmente ou por meio do transporte anterógrado/retrógrado via axônios aferentes/eferentes. A importância desse transporte pode ser exemplificada pelo estudo que mostrou que a fonte predominante de BDNF no estriado, incluindo o NAc, são os neurônios piramidais corticais originados no CPF (Altar et al., 1997). Outro estudo mostrou uma regulação positiva tardia na expressão de BDNF no córtex pré-frontal medial (CPFm) oito ou quatorze dias de abstinência após tratamento repetido com cocaína, mas não após um ou três dias e sugeriu que esse aumento tardio seja decorrente do tempo necessário para que a neurotrofina seja transportada de outras regiões cerebrais, como NAc, AVT, amígdala, onde tem sido encontrada uma alta elevação de BDNF após exposição repetida à cocaína, até o CPF (Lu et al., 2010). Sendo assim, o aumento no nível protéico de BDNF encontrado no CPF dos animais adultos após tratamento repetido e na abstinência pode ser dependente desse tipo de modulação, uma vez que a expressão de RNAm ocorreu no sentido oposto, isto é, houve diminuição de expressão de RNAm para BDNF no CPF desses animais. A análise de TrkB revelou essa mesma divergência entre a expressão de RNAm e os níveis protéicos, o que pode estar relacionado também ao transporte do receptor. Os receptores Trk são produzidos no corpo celular e anterogradamente transportados até a sinapse por um eixo axonal e então, inseridos na membrana plasmática (Segal, 2003), e após a ativação mediada por neurotrofinas os receptores retornam para o soma por transporte retrógrado (Deinhardt et al., 2006).

Por outro lado, o aumento e a diminuição da expressão de BDNF foram acompanhados igualmente por aumento ou diminuição da expressão de TrkB, mostrando uma íntima relação entre a regulação da neurotrofina e de seu receptor.

De forma geral, o aumento de BDNF no CPF tem sido associado à diminuição dos efeitos de recompensa da droga, por exemplo, a infusão de BDNF no CPF

normalizou as neuroadaptações induzidas pela cocaína e suprimiu o efeito de busca pela droga na abstinência e durante testes de restabelecimento induzidos por sinais ou por injeção da droga (Berglind et al., 2007, 2009; McGinty et al., 2010). Além disso, a deleção de BDNF no CPF de ratos levou ao aumento da auto-administração de cocaína (Sadri-Vakili et al., 2010). Assim, o aumento da expressão de RNAm de BDNF e TrkB encontrado no CPF dos adolescentes poderia estar relacionado à diminuição dos efeitos da droga, no entanto, esse aumento de expressão não foi acompanhado de variação no nível protéico, o que dificulta essa interpretação, além disso, os resultados de comportamento desse grupo não refletiram esse efeito, mas sim o oposto, isto é, apresentaram maior sensibilidade à ativação locomotora da droga e maior efeito de condicionamento ao ambiente. Da mesma forma, a análise dos resultados no grupo adulto também não é simples, pois embora tenham apresentado diminuição de RNAm de BDNF, houve aumento do nível protéico da neurotrofina nessa estrutura.

Diversos estudos mostram a importância do BDNF para a plasticidade sináptica e memória (Furini et al., 2010; Heldt et al., 2007; Hennigan et al., 2009). O BDNF é necessário para a indução e estabilização da LTP em várias regiões cerebrais (Pang e Lu, 2004). O CPF é uma importante estrutura onde a LTP pode ser facilitada pela administração repetida de cocaína. Um estudo mostrou aumento da expressão de BDNF no CPF de ratos após administração repetida de cocaína, e esse aumento ocorreu em um curso de tempo paralelo ao da indução de LTP (Lu et al., 2010). Assim, o aumento da expressão de BDNF e TrkB no CPF dos animais adolescentes em contraposição à diminuição de expressão nos adultos sugere que o sistema nervoso daquele grupo possa ser mais suscetível às alterações de longo prazo induzidas pela cocaína por estar sujeito a uma facilitação da plasticidade neuronal que poderia resultar em um aprendizado aberrante.

Assim como no CPF, o BDNF promove LTP no hipocampo por meio de ligação ao TrkB (Patterson et al., 1996; Minichiello et al., 1999), enquanto sua ausência ou diminuição prejudica a LTP (Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996), e uma mutação no gene de TrkB resulta em déficits na aquisição e consolidação de memória em várias tarefas de aprendizado dependentes do hipocampo (Minichiello et al., 1999). No entanto, ao contrário do resultado encontrado no CPF, houve diminuição da expressão de BDNF e TrkB no hipocampo dos adolescentes. Essa regulação negativa de BDNF e TrkB aliada à diminuição dos níveis protéicos de

CREB e pCREB no hipocampo dos adolescentes após tratamento repetido com a droga poderia indicar uma redução de neuroplasticidade nessa estrutura relacionada a prejuízos de memória decorrentes do uso da droga nesse grupo. No entanto, alguns estudos mostram que o córtex pré-frontal medial pode atuar como uma área de ligação na memória remota de forma semelhante à atuação do hipocampo na memória recente (Frankland e Bontempi, 2005, 2006). O envolvimento desta estrutura decresce consistentemente com a consolidação, enquanto o envolvimento do córtex pré-frontal medial aumenta. Estudos mostraram que lesões no córtex pré-frontal medial e no córtex cingulado anterior resultaram em deterioração da memória remota, sem prejuízo para a recuperação de memória recente (Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004; Takehara et al., 2003). A separação da função do hipocampo e CPFm na recuperação da memória recente e remota, respectivamente, sugere que o CPFm possa tomar parte ou até mesmo substituir a função de ligação do hipocampo na memória remota (Frankland e Bontempi, 2006).

A ação neurotóxica da cocaína parece levar à ativação de MAPKs e do fator nuclear-kappaB (NF-kB), dentre outros fatores (Medders e Kaul, 2011; Ang et al., 2001; Imam et al., 2005). De fato, a via da MAPK está envolvida em respostas antiinflamatórias e antioxidativas (Jeong et al., 2011; Liu et al., 2007). E essas respostas podem envolver a ativação de BDNF, uma vez que essa neurotrofina é capaz de proteger os neurônios da toxicidade induzida por *stress* ou por excitotoxinas (Nakao et al., 1995; Martinez-Serrano e Bjorklund, 1996; Bemelmans et al., 1999). Assim, a diminuição da expressão de RNAm de BDNF no hipocampo dos animais após injeção aguda da cocaína parece estar relacionada ao efeito neurotóxico da droga. Após o uso prolongado, os adultos não mais apresentaram diminuição de BDNF, sugerindo que o organismo promoveu adaptações no sentido de diminuir esse efeito. Os adolescentes também mostraram essa resposta homeostática, porém, sem conseguir reverter a diminuição da neurotrofina, mostrando-se mais suscetíveis aos efeitos neurotóxicos da droga.

Essa maior suscetibilidade dos animais adolescentes aos efeitos neurotóxicos da cocaína pode estar relacionada ao aumento do comportamento ansioso nesse grupo, o que é condizente com estudos que apontam para uma relação inversa entre o nível de BDNF no hipocampo e a ansiogênese, por exemplo, ratos que receberam infusão de BDNF intra-hipocampal mostraram diminuição de comportamento ansioso (Cirulli et al., 2004), da mesma forma, o aumento da concentração de BDNF no

hipocampo induzido por beta-alanina está relacionado a um efeito ansiolítico (Murakami e Furuse, 2010). Os adolescentes também apresentaram diminuição hipocampal de CREB e pCREB após tratamento repetido com cocaína, reforçando a hipótese de que esse grupo seja mais afetado pelos efeitos neurotóxicos da droga.

A expressão de pCREB e BDNF no hipocampo também tem sido associada à neurogênese, uma forma de plasticidade neural que contribui para a habilidade de adaptação e resposta do hipocampo a vários estímulos (Lee et al., 2002a,b; Nakagawa et al., 2002; Fujioka et al., 2004), e a diminuição da ativação de CREB tem sido associada à redução da neurogênese (Nakagawa et al., 2002). A redução da neurogênese, por sua vez, está relacionada ao aumento do comportamento ansioso. Por exemplo, um estudo mostrou que a deleção de TrkB em neurônios recém-formados do hipocampo leva a um prejuízo da neurogênese acompanhado de aumento de ansiedade (Bergami et al., 2008). Assim, a diminuição de BDNF, TrkB, CREB/pCREB no hipocampo dos animais adolescentes pode estar relacionada a uma diminuição da neurogênese, contribuindo para o aumento do comportamento ansioso.

O CPF é uma estrutura crítica para os processos de recaída, estudos de imagem em dependentes revelaram diminuição de atividade basal nessa região durante a abstinência (Goldstein e Volkow, 2002) e grandes aumentos de atividade metabólica após exposição a sinais previamente pareados com a droga (Grant et al., 1996; Maas et al., 1998). A recaída disparada por *stress*, estímulo condicionado e drogas é mediada por atividade do CPF, e estudos farmacológicos mostraram que a inativação dessa estrutura bloqueia a reinstalação da dependência em modelos animais de adição (McLaughlin e See, 2003; McFarland e Kalivas, 2001). Estudos com ratos revelaram que durante a abstinência de cocaína a exposição a sinais previamente associados à droga leva à ativação do CPF (Rebec e Sun, 2005). Neste trabalho, houve aumento na expressão de RNAm de BDNF no CPF dos animais adolescentes durante a abstinência, e esse aumento foi maior do que o verificado nos grupos sob tratamento repetido ou agudo. Essa regulação positiva de BDNF também foi acompanhada pelo aumento na expressão de RNAm de TrkB e no nível protéico de CREB no córtex pré-frontal, bem como pelo aumento protéico de CREB e pCREB no hipocampo desses animais, revelando uma maior vulnerabilidade dos adolescentes aos efeitos da abstinência quando comparados aos adultos. Esses resultados sugerem que os adolescentes apresentam uma facilitação da plasticidade

induzida pela droga maior que a dos adultos, tornando o sistema nervoso desse grupo mais suscetível às alterações de memória e aprendizado. De fato, um estudo mostrou que, durante a abstinência de cocaína, ocorre aumento de BDNF no CPF de ratos, e esse aumento leva a uma facilitação da LTP nas sinapses excitatórias dos neurônios piramidais do CPFm por meio da inibição dos receptores gabaérgicos na superfície celular (Lu et al., 2010).

Utilizando camundongos mutantes para o gene BDNF, Hong et al. (2008) mostraram que a expressão de BDNF é necessária para o adequado desenvolvimento da inibição do córtex via neurônios gabaérgicos, embora pareça não afetar a sobrevivência ou diferenciação destes neurônios. De fato, uma má formação do sistema inibitório gabaérgico no córtex pré-frontal poderia resultar em diminuição do controle comportamental com aumento do risco de dependência e comportamento impulsivo, especialmente entre os adolescentes cujo sistema nervoso ainda está em desenvolvimento.

Embora BDNF seja um alvo da ativação induzida por CREB, a regulação dessa neurotrofina mostrou-se independente da ação do CREB/pCREB após o tratamento com cocaína, sugerindo a participação de outras vias nessa regulação ou que essa variação esteja sendo determinada pelo transporte anterógrado/retrógrado da neurotrofina. O estudo também mostrou que a atuação da cocaína varia de acordo com a região cerebral onde atua, isto é, pode haver aumento de um fator no córtex pré-frontal ao mesmo tempo em que há diminuição desse mesmo fator no hipocampo. Esses resultados mostram a complexidade do tratamento da dependência e a necessidade da continuidade de estudos na área.

Este trabalho mostrou diferenças comportamentais e neuroquímicas entre adolescentes e adultos em resposta à administração de cocaína. Vimos que os animais de ambas as idades sofreram os efeitos comportamentais e neuroquímicos da droga, mas de maneira geral, os adolescentes parecem ter respondido de forma mais proeminente a esses efeitos, sugerindo que a ação das substâncias psicoativas em um sistema nervoso ainda em desenvolvimento possa provocar alterações mais intensas do que em um sistema nervoso já formado e levar ao aumento do comportamento de busca pela droga, recaída e consumo relatado por diversos autores nesse grupo de idade (Pascual et al., 2009; Brandon et al., 2001; Levin et al., 2003). Esses resultados apontam para a necessidade de abordagens

terapêuticas diferentes para o tratamento da dependência à cocaína de acordo com as diferenças neuronais ontogênicas.

6 CONCLUSÕES

Os resultados dos testes de atividade locomotora mostraram que embora os animais de ambas as idades tenham sensibilizado, os adolescentes apresentaram maior ativação locomotora em resposta à cocaína, além de maior efeito de habituação e de condicionamento ao ambiente de teste. Os testes de ansiedade, por sua vez, mostraram que os adolescentes partem de um nível de ansiedade basal mais baixo e são mais sensíveis aos efeitos ansiogênicos da droga.

A administração aguda de cocaína levou ao aumento dos níveis protéicos de CREB e pCREB no córtex pré-frontal dos animais, o que pode estar relacionado ao processo de aprendizagem da associação do contexto com os efeitos da droga. Já a administração prolongada da droga levou à diminuição dos níveis protéicos de CREB nessa mesma estrutura nos animais adolescentes, o que pode, em parte, estar relacionado ao aumento do comportamento ansioso.

Durante a abstinência, houve aumento dos níveis protéicos de CREB e/ou pCREB no córtex pré-frontal e hipocampo e da expressão gênica de BDNF e TrkB no córtex pré-frontal dos adolescentes, sugerindo uma facilitação neuroplástica que poderia estar envolvida em alterações neuronais de longo prazo, levando ao aumento do risco de recaída relatado por diversos autores nesse grupo de idade.

O aumento da expressão de BDNF e TrkB no córtex pré-frontal dos animais adolescentes em contraposição à diminuição da expressão nos adultos reforça nossa hipótese de que o sistema nervoso daquele grupo possa ser mais suscetível às alterações de longo prazo induzidas pela cocaína por estar sujeito a uma facilitação da plasticidade neuronal que poderia resultar em um aprendizado aberrante. Já a diminuição de RNAm de BDNF e TrkB no hipocampo desses animais parece indicar uma maior suscetibilidade à neurotoxicidade induzida pela cocaína.

Portanto, apesar dos animais de ambas as idades sofrerem os efeitos da droga, de maneira geral, os adolescentes parecem ter respondido de forma mais proeminente a vários efeitos, sugerindo que a ação das substâncias psicoativas em um sistema nervoso ainda em desenvolvimento possa provocar alterações mais intensas do que em um sistema nervoso já formado e levar ao aumento do comportamento de busca pela droga, recaída e consumo relatado por diversos autores nesse grupo de idade.

A regulação de BDNF mostrou-se independente da ação do CREB/pCREB após o tratamento com cocaína, o que sugere que essa neurotrofina esteja sendo regulada por outras vias (por ex., MAPK) ou que essa variação esteja sendo determinada pelo transporte anterógrado/retrógrado. O estudo também mostrou que a cocaína tem atuação diferente dependente da região cerebral, isto é, pode haver aumento de um fator no córtex pré-frontal ao mesmo tempo em que há diminuição desse mesmo fator no hipocampo.

Esses resultados mostram a complexidade do tratamento da dependência e a necessidade das abordagens terapêuticas considerarem as diferenças ontogênicas.

REFERÊNCIAS*

- Abel T, Martin KC, Bartsch D, Kandel ER. Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science*. 1998;279(5349):338-41.
- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*. 1997;88(5):615-26.
- Adriani W, Laviola G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology*. 2000;39:334-46.
- Adriani W, Laviola G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol*. 2004;15(5-6):341-52.
- Allan VK, Jensen CL, Murphy DL. Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. *Brain Res*. 2007;169:87-97.
- Alonso M, Vianna MR, Depino AM et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*. 2002;12(4):551-60.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*. 1997;389(6653):856-60.
- Anderson KA, Means AR. Defective signaling in a subpopulation of CD4 T cells in the absence of Ca(2)/calmodulin-dependent protein kinase IV. *Mol Cell Biol*. 2002;22:23-9.
- Ang E, Chen J, Zagouras P, Magna H, Holland J, Schaeffer E, Nestler EJ. Induction of nuclear factor-kB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *Journal of Neurochemistry*. 2001;79:221-4.
- Anthony J, Helzer J. Syndromes of drug abuse and dependence. In: Robins LN, Regier DA. *Psychiatric disorders in America: the epidemiologic catchment area study*. New York: Free Press;1991. p. 116-54.
- Arthur JS, Cohen P. MSK1 is required for CREB phosphorylation in response to mitogens in mouse embryonic stem cells. *FEBS Lett*. 2000;482:44-8.
- Avants SK, Margolin A, Kosten TR, Cooney NL. Differences between responders and nonresponders to cocaine cues in the laboratory. *Addict Behav*. 1995;20:215-24.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Badanich KA, Maldonado AM e Kirstein CL. Early adolescents show enhanced acute cocaine-induced locomotor activity in comparison to late adolescent and adult rats. *Dev Psychobiol.* 2008;50:127–33.

Barco A, Lopez de Armentia M, Alarcon JM. Synapse-specific stabilization of plasticity processes: The synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(4):831–51.

Bartsch D, Ghirardi M, Skehel PA, Karl KA, Herder SP, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell.* 1995;83(6):979-92.

Bechara A. Neurobiology of decision-making: risk and reward. *Semin Clin Neuropsychiatry.* 2001;6(3):205-16.

Beinfeld MC, Connolly KJ, Pierce RC. Cocaine treatment increases extracellular cholecystinin (CCK) in the nucleus accumbens shell of awake, freely moving rats, an effect that is enhanced in rats that are behaviorally sensitized to cocaine. *J Neurochem.* 2002;81:1021–7.

Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist.* 2008;14(2):147-56.

Bemelmans AP, Horellou P, Pradier L, Brunetl, Colin P, Mallet J. Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adeno viral gene transfer. *Hum Gene Ther.* 1999;10:2987–97

Beninger RJ, Miller R. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998;22(2):335-45.

Benito E, Barco A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends in Neurosciences.* 2010;33:230-40.

Bergami M, Berninger B, Canossa M. Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(40):15570-5.

Berglind WJ, See RE, Fuchs RA, Ghee SM, Whitfield Jr TW, Miller SW, McGinty JF. A BDNF infusion into the medial prefrontal cortex suppresses cocaine seeking in rats. *Eur J Neurosci.* 2007;26(3):757-66.

Berglind WJ, Whitfield Jr TW, LaLumiere RT, Kalivas PW, McGinty JF. A single intra-PFC infusion of BDNF prevents cocaine-induced alterations in extracellular glutamate within the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 2009;29(12):3715-9.

Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine and the molecular mechanisms of memory. *Neuron.* 2000;25:515–32.

Bolanos CA, Glatt SJ, Jackson D. Subsensitivity to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. *Dev Brain Res.* 1998;111:25–33.

Bonnie E, Lonze, Ginty DD. Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron.* 2002;35:605–23.

Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell.* 1994;79(1):59-68.

Bouwknicht JA, Paylor R. Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: a survey in nine mouse strains. *Behav Brain Res.* 2002;136:489–501.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Bramham CR, Southard T, Sarvey JM, Herkenham M, Brady LS. Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. *J Comp Neurol.* 1996;368(3):371-82.

Brandon CL, Marinelli M, Baker LK, White FJ. Enhanced reactivity and vulnerability to cocaine following methylphenidate treatment in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology.* 2001;25(5):651-61.

Breiter HC, Aharon I, Kahneman D, Dale A, Shizgal P. Functional imaging of neuronal responses to expectancy and experiences of monetary gains and losses. *Neuron.* 2001;30:619–39.

Breslau N, Johnson EO, Hiripi E, Kessler R. Nicotine dependence in the United States: prevalence, trends, and smoking persistence. *Arch Gen Psychiatry.* 2001;58:810–6.

Bush DE, Vaccarino FJ. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted progressive-ratio cocaine self-administration break points in Wistar rats. *Psychopharmacology.* 2007;194:211–9.

Camarini R, Griffin WC, Yanke AB, dos Santos BR, Foster Olive M. Effects of adolescent exposure to cocaine on locomotor activity and extracellular dopamine and glutamate levels in nucleus accumbens of DBA/2J mice. *Brain Res.* 2008;1193:34-42.

Cantley LC. The phospho inositide3-kinase pathway. *Science.* 2002;296:1655–1657.

Carey RJ, Dai H, Gui J. Effects of dizocilpine (MK-801) on motor activity and memory. *Psychopharmacology.* 1998;137:241–6.

Carey RJ, DePalma G, Damianopoulos E. Acute and chronic cocaine behavioral effects in novel versus familiar environments: open-field familiarity differentiates cocaine locomotor stimulant effects from cocaine emotional behavioral effects. *Behav Brain Res.* 2005;158:321–30.

Carlezon Jr WA, Mendrek A, Wise RA. MK-801 disrupts the expression but not the development of bromocriptine sensitization: a state-dependency interpretation. *Synapse.* 1995;20:1–9.

Carlezon Jr WA, Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ. Regulation of cocaine reward by CREB. *Science.* 1998;282:2272–5.

Caster JM, Walker QD, Kuhn CM. A single high dose of cocaine induces differential sensitization to specific behaviors across adolescence. *Psychopharmacology (Berl).* 2007;193:247–60.

Catlow BJ, Kirstein CL. Heightened cocaine-induced locomotor activity in adolescent compared to adult female rats. *J Psychopharmacol.* 2005;19:443–7.

Chambers RA, Taylor JR, Potenza MN. Developmental Neurocircuitry of Motivation in Adolescence: A Critical Period of Addiction Vulnerability. *Am J Psychiatry.* 2003;160:1041–52.

Chang JY, Janak PH, Woodward DJ. Neuronal and behavioral correlations in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens during cocaine self-administration by rats. *Neuroscience.* 2000;99:433–43.

Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(4):299-309.

Cirulli F, Berry A, Chiarotti F, Alleva E. Intra hippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus.* 2004;14:802–7.

Clark DB, Kirisci L, Tarter RE. Adolescent versus adult onset and the development of substance use disorders in males. *Drug and Alcohol Depend.* 1998;49:115–21.

Cole BJ, Robbins TW. Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens septi on performance of a 5-choice serial reaction time task in rats: implications for theories of selective attention and arousal. *Behav Brain Res.* 1989;33(2):165-79.

Cole RL, Konradi C, Douglass J, Hyman SE. Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron.* 1995;14:813–23.

Collins SL, Izenwasser S. Cocaine differentially alters behavior and neurochemistry in periadolescent versus adult rats. *Brain Res Dev.* 2002;138:27–34.

Conkright MD, Guzmán E, Flechner L, Su AI, Hogenesch JB, Montminy M. Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Molecular Cell*. 2003;11(5):1417.

Corominas M, Roncero C, Ribases M, Castells X, Casas M. Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. *Neuropsychobiology*. 2007;55:2–13.

Davidson ES, Finch JF, Schenk S. Variability in subjective responses to cocaine: initial experiences of college students. *Addictive Behaviors*. 1993;18:445–53.

Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull*. 1984;96(3):518-59.

De Cesare D, Jacquot S, Hanauer A, Sassone-Corsi P. Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(21):12202-7.

Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi, DR. Mitogen and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMB O J*. 1998;17:4426–41.

Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, Watson R, Worth D, Hanrahan S, Bucci C, Schiavo G. Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron*. 2006;52:293–305.

Di Chiara G. A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol*. 1998;12(1):54-67.

Dunne F, O'Halloran A, Kelly JP. Development of a home cage locomotor tracking system capable of detecting the stimulant and sedative properties of drugs in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31:1456–63.

Durstun S, Casey BJ. What have we learned about cognitive development from neuroimaging? *Neuropsychologia*. 2006;44(11):2149-57.

Edwards S, Graham DL, Bachtell RK, Self DW. Region-specific tolerance to cocaine-regulated cAMP-dependent protein phosphorylation following chronic self-administration. *European Journal of Neuroscience*. 2007;25:2201–13.

Ehrlich ME, Sommer J, Canas E, Unterwald EM. Periadolescent mice show enhanced ΔFosB up regulation in response to cocaine and amphetamine. *J Neurosci*. 2002;22:9155–9.

Eilam D. Open-field behavior with stands drastic changes in arena size. *Behav Brain Res*. 2003;142:53–62.

Ehrman RN, Robbins SJ, Childress AR, O'Brien CP. Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients. *Psychopharmacology (Berl.)*. 1992;107:523–9.

Estroff TW, Schwartz RH, Hoffman NG. Adolescent cocaine abuse: addictive potential, behavioral and psychiatric effects. *Clin Pediatr*. 1989;28:550–5.

Ettenberg A, Geist TD. Qualitative and quantitative differences in the operant runway behavior of rats working for cocaine and heroin reinforcement. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;44:191–8.

Everitt BJ, Dickinson A, Robbins TW. The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Res Rev*. 2001;36:129–38.

Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci*. 2005;8(11):1481–9.

Everitt BJ, Wolf ME. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci*. 2002;22(9):3312–20.

Filip M, Faron-Gorecka A, Kusmider M, Golda A, Frankowska M, Dziedzicka-Wasylewska M. Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Res*. 2006;1071: 218–25.

Finch DM. 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*. 1996;6:495–512.

Fischman MW, Foltin RW. Self-administration of cocaine by humans: a laboratory perspective. In: Bock GR, Whelan J. *Cocaine: Scientific and social dimensions*. CIBA Foundation Symposium 166;1992. p.165–80.

Flexner LB, Flexner JB, De La Haba G, Roberts RB. Loss of memory as related to inhibition of cerebral protein synthesis. *J Neurochem*. 1965;12(7):535–41.

Floresco SB, Phillips AG. Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D1 agonist into the rat medial prefrontal cortex. *Behav Neurosci*. 2001;115(4):934–9.

Foltin RW, Fischman MW. Assessment of abuse liability of stimulant drugs in humans: a methodological survey. *Drug and Alcohol Dependence*. 1991;28:3–48.

Frankland PW, Bontempi B. The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005;6(2):119–30.

Frankland PW, Bontempi B. Fast track to the medial prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(3):509–10.

Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*. 2004;304(5672):881–3.

Frantz KJ, O'Dell LE, Parsons LH. Behavioral and neurochemical responses to cocaine in periadolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32:625–37.

Fujioka T, Fujioka A, Duman RS. Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. *J Neurosci*. 2004;24:319–38.

Fumagalli F, Di Pasquale L, Caffino L, Racagni G, Riva MA. Repeated exposure to cocaine differently modulates BDNF mRNA and protein levels in rat striatum and prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience*. 2007;26:2756–63.

Furini CR, Rossato JI, Bitencourt LL, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus*. 2010;20(5):672-83.

Gawin FH, Ellinwood Jr EH. Cocaine dependence. *Annu Rev Med*. 1989;40:149-61.

Geist TD, Ettenberg A. A simple method for studying intravenous drug reinforcement in a runaway. *Pharmacol Biochem Behav*. 1990;36:703–6.

Ghinelli E, Johansson JD, Rios J, Chen LL, Zoukhri D, Hodges RR, Dartt DA. Presence and localization of neurotrophins and neurotrophin receptors in rat lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:3352-7.

Giedd JN, Snell JW, Lange N, Rajapakse JC, Casey BJ, Kozuch PL, Vaituzis AC, Vauss YC, Hamburger SD, Kaysen D, Rapoport JL. Quantitative magnetic resonance imaging of human brain development: ages 4–18. *Cereb Cortex*. 1996;6:551–60.

Giovino GA. Epidemiology of tobacco use among US adolescents. *Nicotine Tob Res*. 1999;Suppl 1:31-40.

Goldstein RZ, Volkow ND. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry*. 2002;159(10):1642-52.

Granon S, Passetti F, Thomas KL, Dalley JW, Everitt BJ, Robbins TW. Enhanced and impaired attentional performance after infusion of D1 dopaminergic receptor agents into rat prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2000;20(3):1208-15.

Grant BF. Prevalence and correlates of alcohol use and DSM-IV alcohol dependence in the United States: results of the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J Stud Alcohol*. 1997;58:464–73.

Grant S, London ED, Newlin DB, Villemagne VL, Liu X, Contoreggi C, Phillips RL, Kimes AS, Margolin A. Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(21):12040-5.

Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berlin)*. 2000;148:164–170.

Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su TP, Shaham Y. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *J Neurosci*. 2003;23:742–7.

Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV, Voorn P. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann NY Acad Sci*. 1999;877:49–63.

Groenink L, Pattij T, DeJongh R, Vander Gugten J, Oosting RS, Dirks A. 5-HT_{1A} receptor knockout mice and mice overexpressing corticotropin-releasing hormone in models of anxiety. *Eur J Pharmacol*. 2003;463:185–97.

Guerriero R, Hayes M, Dhaliwal S, Ren J, Kosofsky B. Preadolescent methylphenidate versus cocaine treatment differ in the expression of cocaine-induced locomotor sensitization during adolescence and adulthood. *Biol Psychiatry*. 2006;60:1171–80.

Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P, 2001. BDNF controls dopamine D₃ receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature*. 411:86–9.

Haghighparast A, Taslimi Z, Ramin M, Azizi P, Khodaghali F, Hassanpour-Ezatti M. Changes in phosphorylation of CREB, ERK, and c-fos induction in rat ventral tegmental area, hippocampus and prefrontal cortex after conditioned place preference induced by chemical stimulation of lateral hypothalamus. *Behav Brain Res*. 2011;220(1):112-8.

Hasin D, Hatzenbuehler ML, Keyes K, Ogburn E. Substance use disorders: diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed. (DSM-IV) and International Classification of Diseases, 10th ed. (ICD-10). *Addiction*. 2006;101 (Suppl 1): 59–75.

Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry*. 2007;12(7):656-70.

Helzer JE, Burnam MA, McEvoy LT. Alcohol abuse and dependence. In: Robins LN, Regier DA. *Psychiatric disorders in America: the epidemiologic catchment area study*. New York: Free Press;1991. p. 81-115.

Hennigan A, Callaghan CK, Kealy J, Rouine J, Kelly AM. Deficits in LTP and recognition memory in the genetically hypertensive rat are associated with decreased expression of neurotrophic factors and their receptors in the dentate gyrus. *Behav Brain Res*. 2009;197(2):371-7.

Hong EJ, McCord AE, Greenberg ME. A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron*. 2008;60(4):610-24.

Horger BA, Iyasere CA, Berhow MT, Messer CJ, Nestler EJ, Taylor JR. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1999;19:4110–22.

Hotte M, Naudon L, Jay TM. Modulation of recognition and temporal order memory retrieval by dopamine D1 receptor in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2005;84(2):85-92.

Hotte M, Thuault S, Lachaise F, Dineley KT, Hemmings HC, Nairn AC, Jay TM. D1 receptor modulation of memory retrieval performance is associated with changes in pCREB and pDARPP-32 in rat prefrontal cortex. *Behav Brain Res*. 2006;171(1):127-33.

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677–736.

Hye-Jean P, Feng JC, Jae YH, Ung GK. Effects of clozapine on behavioral sensitization induced by cocaine. *Psychiatry Research*. 2010;175:165–70.

Hyman SE, Malenka RC. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:695–703.

Imam SZ, Duhart HM, Skinner JT, Ali SF. Cocaine induces a differential dose-dependent alteration in the expression profile of immediate early genes, transcription factors and caspases in PC12 cells. A possible mechanism of neurotoxic damage in cocaine addiction. *Ann NY Acad Sci*. 2005;1053:482–90.

Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, Dwyer JM, Yochum GS, Boss JM, McWeeney S, Dunn JJ, Mandel G, Goodman RH. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*. 2004;119:1041-54.

Ito R, Dalley JW, Robbins TW, Everitt BJ. Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J Neurosci*. 2002;22:6247–53.

Jentsch JD, Roth RH, Taylor JR. Role for dopamine in the behavioral functions of the prefrontal corticostriatal system: implications for mental disorders and psychotropic drug action. *Prog Brain Res*. 2000;126:433–53.

Jentsch JD, Taylor JR. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999;146(4):373-90.

Jeong GS, Lee DS, Kim DC, Jahng Y, Son JK, Lee SH, Kim YC. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of mollugin via up-regulation of hemeoxygenase-1 in

mouse hippocampal and microglial cells. *European Journal of Pharmacology*. 2011;654:226–34.

Johannessen M, Delghandi MP, Moens U. What turns CREB on? *Cell Signal*. 2004;16(11):1211-27.

Kalivas PW, Alesdatter JE. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor stimulation in the ventral tegmental area and amygdala in behavioral sensitization to cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993a;267:486–95.

Kalivas PW, Churchill L, Romanides A. Involvement of the pallidal-thalamocortical circuit in adaptive behavior. *Ann NY Acad Sci*. 1999;877:64–70.

Kalivas PW, McFarland K. Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;168(1-2):44-56.

Kalivas PW. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Ver*. 1993b;18:75–113.

Kalsbeek AP, Voorn RM, Buijs RM, Uylings HBM. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 1988;269:58-72.

Kameda SR, Fukushiro DF, Trombin TF, Procópio-Souza R, Patti CL, Hollais AW, Calzavara MB, Abílio VC, Ribeiro RA, Tufik S, D'Almeida V, Frussa-Filho R. Adolescent mice are more vulnerable than adults to single injection-induced behavioral sensitization to amphetamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2011;98(2):320-24.

Kandel DB, Chen K. Extent of smoking and nicotine dependence in the United States: 1991–1993. *Nicotine Tob Res*. 2000;2:263–74.

Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 2001;294(5544):1030-8.

Kang H, Schuman EM. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science*. 1996;273(5280):1402-6.

Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci*. 2002;22:3306–11.

Kety SS. Human cerebral blood flow and oxygen consumption as related to aging. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1956;35:31–45.

Kida S, Josselyn SA, Peña de Ortiz S, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci*. 2002;5(4):348-55.

Kiyatkin EA. State-dependent peculiarities of cocaine-induced behavioral sensitization and their possible reasons. *Int J Neurosci*. 1992;67:93–103.

Kopp C, Vogel E, Rettori MC, Delagrang P, Guardiola-Lemaitre B, Misslin R. Effects of melatonin on neophobic responses in different strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999;63:521–6.

Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:8856–60.

Krivanek JA, McGaugh JL. Facilitating effects of pre and posttrial amphetamine administration on discrimination learning in mice. *Agents Actions.* 1969;1(2):36-42.

Kuczewski N, Porcher C, Lessmann V, Medina I, Gaiarsa JL. Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. *Mol Neurobiol.* 2009;39(1):37-49.

Lamb RJ, Preston KL, Schindler CW, Meisch RA, Davis F. The reinforcing and subjective effects of morphine in post addicts: a dose-response study. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;259:1165–73.

Lambert NM, McLeod M, Schenk S. Subjective responses to initial experience with cocaine: an exploration of the incentive-sensitization theory of drug abuse. *Addiction.* 2006;101(5):713-25.

Lambert W, Agarwal R, Howe W, Clark AF, Wordinger RJ. Neurotrophin and neurotrophin receptor expression by cells of the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2315–23.

Laviola G, Wood RD, Kuhn C, Francis R, Spear LP. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;275:345–57.

Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem.* 2002a;82:1367–75.

Lee J, Seroogy KB, Mattson MP. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice, *J. Neurochem.* 2002b;80:539–47.

Levin ED, Rezvani AH, Montoya D, Rose JE, Swartzwelder HS. Adolescent-onset nicotine self-administration modeled in female rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2003;169(2):141-9.

Li YF, Huang Y, Amsdell SL, Xiao L, O'Donnell JM, Zhang HT. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram on behavior depend on cyclic AMP response element binding protein-mediated neurogenesis in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology.* 2009;34(11):2404-19.

Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. MAPK phosphatases — regulating the immune response. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:202–12.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. 2001;25:402-8.

Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6:603–14.

Lu H, Cheng PL, Lim BK, Khoshnevisrad N, Poo MM. Elevated BDNF after cocaine withdrawal facilitates LTP in medial prefrontal cortex by suppressing GABA inhibition. *Neuron*. 2010;67(5):821-33.

Lu L, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM, Shaham Y. A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *J Neurosci*. 2004;24:1604–11.

Maas LC, Lukas SE, Kaufman MJ, Weiss RD, Daniels SL, Rogers VW, Kukes TJ, Renshaw PF. Functional magnetic resonance imaging of human brain activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry*. 1998;155(1):124-6.

Maldonado AM, Kirstein CL. Cocaine-induced locomotor activity is increased by prior handling in adolescent but not adult female rats. *Physiol Behav*. 2005;86:568–72.

Markou A, Koob GF. Post cocaine anhedonia. An animal model of cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology*. 1991;4(1):17-26.

Markwiese BJ, Acheson SK, Levin ED et al. Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22:416–21.

Martinez-Serrano A, Bjorklund A. Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *J Neurosci*. 1996;16:4604–16.

Masterman DL, Cummings JL. Frontal-subcortical circuits: the anatomical basis of executive, social and motivational behaviors. *J Psychopharmacol*. 1997;11:107–14.

Mathews IZ, McCormick CM. Female and male rats in late adolescence differ from adults in amphetamine-induced locomotor activity, but not in conditioned place preference for amphetamine. *Behav Pharmacol* 2007;18:641–50.

Mathews IZ, Waters P, McCormick CM. Changes in hyporesponsiveness to acute amphetamine and age differences in tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the brain over adolescence in male and female rats. *Dev Psychobiol*. 2009;51:417–28.

Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science*. 2004;305(5680):96–9.

McDaid J, Graham MP, Napier TC. Methamphetamine-Induced Sensitization Differentially Alters pCREB and deltaFosB throughout the Limbic Circuit of the Mammalian Brain. *Mol Pharmacol*. 2006;70:2064–74.

McFarland K, Kalivas PW. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci*. 2001;21:8655–63.

McGinty JF, Whitfield Jr TW, Berglund WJ. Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain Res*. 2010;1314:183-93.

McLaughlin J, See RE. Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdala attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;168(1-2):57-65.

Medders KE, Kaul M. Mitogen-Activated protein kinase p38 in HIV infection and associated brain injury. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2011;6:202–15.

Messaoudi E, Bårdsen K, Srebro B, Bramham CR. Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus *J Neurophysiol*. 1998;79(1):496-9.

Minichiello L, Korte M, Wolfner D, Kühn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*. 1999;24:401–14.

Mogenson GJ. Limbic-motor integration. In: Epstein AN, editor. *Progress in psychobiology and physiological psychology*. London, UK: Academic Press; 1987. vol.12. p.117–70.

Moore EM, Linsenbardt DN, Melón LC, Boehm II SL. Ontogenetic differences in adolescent and adult C57BL/6J and DBA/2J mice: Anxiety-like, locomotor, and consummatory behaviors. *Developmental Psychobiology*. 2011;53(2):141-56.

Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to Brain derived Neurotrophic Factor. *J Biol Chem*. 2001;276:12660-6.

Murakami T, Furuse M. The impact of taurine and beta-alanine supplemented diets on behavioral and neurochemical parameters in mice: antidepressant versus anxiolytic-like effects. *Amino Acids*. 2010;39:427–34.

Nader K, LeDoux JE. Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behav Neurosci*. 1999;113(5):891-901.

Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci*. 2002;22(9):3673-82.

Nakao N, Kokaia Z, Odin P, Lindvall O. Protective effects of BDNF and NT-3 but not PDGF against hypoglycemic injury to cultured striatal neurons. *Exp Neurol*. 1995;131:1–10.

Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL. Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron*. 1993;11:995–1006.

Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2002;78:637–47.

Nestler EJ. Total recall—The memory of addiction. *Neurobiology Science*. 2001;292:2266–7.

Nguyen PV, Abel T, Kandel ER. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science*. 1994;265(5175):1104-7.

Niculescu M, Ehrlich ME, Unterwald EM. Age-specific behavioral responses to psychostimulants in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;82:280–8.

Nixon K, Crews FT. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem*. 2002;83(5):1087-93.

O'Donnell P, Greene J, Pabello N, Lewis BL, Grace AA. Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. *Ann NY Acad Sci*. 1999;877:157–75.

Pang PT, Lu B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev*. 2004;3(4):407-30.

Panksepp J. Seeking systems and anticipatory states of the nervous system. In: Panksepp J. *Affective Neuroscience: The foundations of human and animal emotions*. New York: Oxford University Press;1998. p. 144–63.

Panlilio LV, Solinas M, Matthews SA, Goldberg SR. Previous exposure to THC alters the reinforcing efficacy and anxiety-related effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32:646–57.

Pascual M, Boix J, Felipe V, Guerri C. Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *J Neurochem*. 2009;108(4):920-31.

Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*. 1996(6);16:1137–45.

Paulus MP, Dulawa SC, Ralph RJ, Mark AG. Behavioral organization is independent of locomotor activity in C57 mouse strains. *Brain Res*. 1999;835:27–36.

Paus T, Zijdenbos A, Worsley K, Collins DL, Blumenthal J, Giedd JN, Rapoport JL, Evans AC. Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science*. 1999;283:1908–11.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14:149-67.

Pellow S, File SE. Anxiolytic and Anxiogenic Drug Effects on Exploratory Activity in an Elevated Plus-Maze: a Novel Test of Anxiety in the Rat. *Pharmacology Biochem and Behavior*. 1986;24:525-9.

Pennartz CMA, Groenewegen HJ, Lopez da Silva FH. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioral, electrophysiological and anatomical data. *Prog Neurobiol*. 1994;42:719–61.

Philpot RM, Kirstein CL. Repeated cocaine exposure: Effects on catecholamines in the nucleus accumbens septi of periadolescent animals. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999;62(3): 465-72.

Pierce RC, Kumaresan V. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev*. 2006;30(2):215-38.

Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, Kandel ER. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron*. 2002;34(3):447-62.

Platel A, Porsolt RD. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. *Psychopharmacology*. 1982;78:346-52.

Poser S, Storm DR. Role of Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases in LTP and memory formation. *Int J Dev Neurosci*. 2001;19:387–94.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003;463:3-33.

Rebec GV, Sun W. Neuronal substrates of relapse to cocaine-seeking behavior: role of prefrontal cortex. *J Exp Anal Behav*. 2005;84(3):653-66.

Reymann KG, Frey JU. The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. *Neuropharmacology*. 2007;52:24–40.

Robbins TW, Everitt BJ. Drug addiction: Bad habits add up. *Nature*. 1999;398:567–70.

Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev*. 1993;18:247–91.

Robinson TE, Berridge KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction*. 2000;95(Suppl 2):91–117.

Robinson TE, Berridge KC. *Addiction*. *Annu Ver Psychol*. 2003;54:25-53.

Robinson TE, Berridge KC. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008;363(1507):3137-46.

Robinson TE, 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*. 1999;11:1598–604.

Rodgers RJ, Davies B, Shore R. Absence of anxiolytic response to chlordiazepoxide in two common background strains exposed to the elevated plus-maze: importance and implications of behavioural baseline. *Genes Brain Behav*. 2002;1(4):242-51.

Rogerio R, Takahashi RN. Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992;43:631-3.

Ron D, Jurd R. The “ups and downs” of signaling cascades in addiction. *Sci STKE*. 2005;309:re14.

Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem*. 1996;67(2):662-8.

Rubino T, Guidali C, Vigano D, Realini N, Valenti M, Massi P, Parolaro D. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology*. 2008;54(1):151-60.

Runyan JD, Dash PK. Intra-medial prefrontal administration of SCH-23390 attenuates ERK phosphorylation and long-term memory for trace fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2004;82(2):65-70.

Sadri-Vakili G, Kumaresan V, Schmidt HD, Famous KR, Chawla P, Vassoler FM, Overland RP, Xia E, Bass CE, Terwilliger EF, Pierce RC, Cha JH. Cocaine-induced chromatin remodeling increases brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat medial prefrontal cortex, which alters the reinforcing efficacy of cocaine. *J Neurosci*. 2010;30(35):11735-44.

Schilwein S, Huston JP, Schwarting RKW. Injections of tacrine and scopolamine into the nucleus accumbens: opposing effects of immediate versus delayed post-Trial treatment on memory of an open field. *Neurobiol Learn Mem*. 2000;73:21–30.

Schilwein S, Huston JP, Schwarting RKW. Open-field habituation learning is improved by nicotine and attenuated by mecamylamine administered post-Trial into the nucleus accumbens. *Neurobiol Learn Mem*. 2002;77:277–90.

Schramm-Sapyta NL, Cauley MC, Stangl DK, Glowacz S, Stepp KA, Levin ED, Kuhn CM. Role of individual and developmental differences in voluntary cocaine intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011;215(3):493-504.

Segal D, Mandell A. Long-term administration of d-amphetamine: progressive augmentation of motor activity and stereotypy. *Pharmac Biochem and Behav*. 1974;249-55.

Segal RA. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26:299-330.

Self DW, Genova LM, Hope BT, Barnhart WJ, Spencer JJ, Nestler EJ. Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the nucleus accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci*. 1998;18(5):1848-59.

Self DW, Nestler EJ. Relapse to drug-seeking: neural and molecular mechanisms. *Drug Alcohol Depend*. 1998;51(1-2):49-60.

Shalaby IA, Dendel OS, Spear LP. Differential functional ontogeny of dopamine presynaptic receptor regulation. *Develop Brain Res*. 1981;1:4-34.

Shalev U, Grimm JW, Shaham Y. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol Rev*. 2002;54(1):1-42.

Shieh PB, Hu SC, Bobb K, Timmusk T, Ghosh A. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 1998;20(4):727-40.

Shuster L, Hudson M, Anton M, Righi D. Sensitization of mice to methylphenidate. *Psychopharmacology*. 1982;77(1):31-6.

Shuster L, Yu G, Bates A. Sensitization to cocaine stimulation in mice. *Psychopharmacology*. 1977;52:185-90.

Sorg BA, Davidson DL, Kalivas PW, Prasad BM. Repeated daily cocaine alters subsequent cocaine-induced increase in extracellular dopamine in the medial prefrontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;281:54-61.

Soule J, Messaoudi E, Bramham CR. Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(4):600-604.

Sowell ER. Longitudinal mapping of cortical thickness and brain growth in normal children. *J Neurosci*. 2004;24: 8223-31.

Spear LP, Brake SC. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol*. 1983;16:83-109.

Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Ver*. 2000;24:417-63.

Stansfield KH, Kirstein CL. Neurochemical effects of cocaine in adolescence compared to adulthood. *Dev Brain Res.* 2005;159:119–25.

Takehara K, Kawahara S, Kirino Y. Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eye blink conditioning. *Journal of Neuroscience.* 2003;23(30):9897–905.

Tang X, Orchard SM, Sanford LD. Home cage activity and behavioral performance in inbred and hybrid mice. *Behav Brain Res.* 2002;136:555–69.

Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 1998;20(4):709-26.

Tomaz C, Aguiar MS, Nogueira PJ. Facilitation of memory by peripheral administration of substance P and naloxone using avoidance and habituation learning tasks. *Neurosci Biobehav Rev.* 1990;14:447–53.

Van Bogaert MJ, Groenink L, Oosting RS, Westphal KG, van der Gugten J, Olivier B. Mouse strain differences in autonomic responses to stress. *Genes Brain Behav.* 2006;5(2):139-49.

Vanderschuren LJ, Kalivas PW. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology.* 2000;151:99–120.

Veizina, Stewart J. The effect of dopamine receptor blockade on the development of sensitization to the locomotor activating effects of amphetamine and morphine. *Brain Res.* 1989;499(1):108-20.

Volkow ND, Fowler JS. Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex.* 2000;10(3):318-25.

Wagner FA, Anthony JC. From first drug use to drug dependence: developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology.* 2002;26:479–88.

Walters CL, Blendy JA. Different requirements for cAMP response element binding protein in positive and negative reinforcing properties of drugs of abuse. *J Neurosci.* 2001;21:9438–44.

Walters CL, Kuo YC, Blendy JA. Differential distribution of CREB in the mesolimbic dopamine reward pathway. *J Neurochem.* 2003;87:1237–44.

Wang YQ, Zhu CY, Wei EQ. A new model for evaluating locomotor activity and central depressive drugs in different strain mice. *Bull Sci Tach.* 2003;19:292–6.

Warner LA, Kessler RC, Hughes M, Anthony JC, Nelson CB. Prevalence and correlates of drug use and dependence in the United States: results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*. 1991;52:219–29.

Weiss SRB, Post RM, Pert A, Woodward R, Murman D. Context-dependent cocaine sensitization: differential effect of haloperidol on development versus expression. *Pharmacol Biochem Behav*. 1989;34:655–61.

White AM, Swartzwelder HS. Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1021:206–20.

White FJ, Kalivas PW. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend*. 1998;51:141–53.

White NM. Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. *Addiction*. 1996;91(7):921-49.

Wilcock J, Broadhurst PL. Strain differences in emotionality: open-field and conditioned avoidance behavior in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1967;63(2):335-8.

Wise RA. Rewards wanted: Molecular mechanisms of motivation. *Discov Med*. 2004;4(22):180-6.

Wise RA, Bozarth MA. A Psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological Review*. 1987;94:469-92.

Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology*. 2004;47(1):61-79.

Woodward D, Chang J, Janak P, Azarov A, Anstrom K. Mesolimbic neuronal activity across behavioral states. *Ann NY Acad Sci*. 1999;877:91–112.

Wyvell CL, Berridge KC. Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: increased cue-triggered “wanting” for sucrose reward. *J Neurosci*. 2001;21:7831–40.

Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs III WH, Montminy MR. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*. 1988;334:494-8.

Yang M, Augustsson H, Markham CM, Hubbard DT, Webster D, Wall PM, Blanchard RJ, Blanchard DC. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiol Behav*. 2004;81(3):465-73.

Yilmazer-Hanke DM, Roskoden T, Zilles K, Schwegler H. Anxiety-related behavior and densities of glutamate, GABA A, acetylcholine and serotonin receptors in the amygdala of seven inbred mouse strains. *Behav Brain Res*. 2003;145:145–59.

Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell*. 1994;79(1):49-58.

Yu-Min K, Keng CL, Hsiang-Hua C, Chianfang GC, Hsueh-Te L, Yinchiu L, A-Min H, Ruey-Ming L, Lung Y. Cocaine-but not methamphetamine-associated memory requires de novo protein synthesis. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2007; 87:93–100.

Zelcer I, Cohen H, Richter-Levin G, Lebiosn T, Grossberger T, Barkai E. A cellular correlate of learning-induced metaplasticity in the hippocampus. *Cereb Cortex*. 2006;16:460–8.

Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:4459-64.