Maria Cristina Valzachi Rocha Maluf

Estudo das vias de ativação do CREB na neuroplasticidade induzida por cocaína em camundongos adolescentes e adultos

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

São Paulo
2017

MARIA CRISTINA VALZACHI ROCHA MALUF

**Estudo das vias de ativação do CREB na neuroplasticidade induzida por
cocaína em camundongos adolescentes e adultos**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Camarini

Versão original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Valzachi Rocha Maluf, Maria Cristina
Estudo das vias de ativação do CREB na
neuroplasticidade induzida por cocaína em
camundongos adolescentes e adultos. / Maria
Cristina Valzachi Rocha Maluf; orientadora Rosana
Camarini. -- São Paulo, 2017.
114 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Adolescentes. 2. Cocaína. 3. Sensibilização. 4.
Neuromolecular. 5. CREB. I. Camarini, Rosana,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Maria Cristina Valzachi Rocha Maluf.

Título da Tese: Estudo das vias de ativação do CREB na neuroplasticidade induzida por cocaína em camundongos adolescentes e adultos.

Orientadora: Rosana Camarini.

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

() Aprovada

() Reprovada

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:.....
Examinador(a):	Assinatura:.....
	Nome:
	Instituição:.....
Examinador(a):	Assinatura:.....
	Nome:
	Instituição:.....
Examinador(a):	Assinatura:.....
	Nome:
	Instituição:.....
Presidente:	Assinatura:.....
	Nome:
	Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **032** nas fls. **126** 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 "*Estudo das vias de ativação do CREB na neuroplasticidade induzida por cocaína em camundongos adolescentes e adultos*" do qual participam o(s) alunos(s) **André Veloso Lima Rueda, Mariana Beu Rae, Mateus Teixeira Cavalcante, Maria Crsitina Valzachi Rocha Maluf**, 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 NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **10.04.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 12 de abril de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam e confiam na Ciência do Brasil. Em especial ao meu marido, Rodrigo, pelo companheirismo verdadeiro; ao meu filho, Ricardo, que trouxe alegria para o meu caminho; à minha irmã Patrícia, por me ajudar a cuidar do meu bem mais precioso; e aos amigos que, como anjos, estiveram ao meu lado quando mais precisei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente na minha vida, me guiando, orientando e amparando, permitindo que meu caminho seja traçado, apesar de todas as dificuldades.

À minha família, cuja ajuda foi essencial para a realização deste trabalho. Ao meu marido, Rodrigo, pelo companheirismo, compreensão e paciência durante esse longo período acadêmico. Ao meu filho, Ricardo, por preencher minha vida com alegria. À minha irmã Patrícia, por estar presente nos momentos em que eu não pude estar.

À Profa. Dra. Rosana Camarini por abrir as portas do seu laboratório para mim, mais uma vez.

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 e doutorado, por toda a ajuda, conselhos, apoio, companheirismo e amizade. Guardo com muito carinho as lembranças dos momentos que compartilhamos.

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.

“Quando alguma coisa escapa da nossa consciência, essa coisa não deixou de existir, do mesmo modo que um automóvel que desaparece na esquina não se desfez no ar. Apenas o perdemos de vista. (...)

Parte do inconsciente consiste, portanto, de uma profusão de pensamentos, imagens e impressões provisoriamente ocultos e que continua a influenciar nossas mentes conscientes. Um homem desatento ou distraído pode atravessar uma sala para buscar alguma coisa. Ele esquece o que buscava. Suas mãos tateiam pelos objetos de uma mesa; não se lembra do seu objetivo inicial, mas ainda se deixa, inconscientemente, guiar por ele. Percebe então o que queria. Foi o seu inconsciente que o ajudou a se lembrar.”

Carl G. Jung

RESUMO

Maluf MCVR. Estudo das vias de ativação do CREB na neuroplasticidade induzida por cocaína em camundongos adolescentes e adultos [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A fase da adolescência difere da adulta em parâmetros comportamentais e neurológicos. A proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB) é um fator de transcrição regulado por três vias principais no circuito mesolímbico-dopaminérgico: PKA, CaMK e ERK, as quais apresentam atividade alterada em resposta à cocaína. Resultados anteriores deste laboratório mostraram que essa droga provoca diferentes modulações nos níveis de CREB no córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo de camundongos adolescentes em comparação aos adultos. Sendo assim, este trabalho avaliou a atividade dessas vias, responsáveis pela modulação do CREB, bem como os níveis de um dos seus genes alvo (a prodinorfina), do inibidor endógeno de CRE (Icer) e da proteína ativadora de CREB (CBP) em resposta à administração de cocaína, além dos comportamentos induzidos pelo psicoestimulante. Os adolescentes apresentaram maior ativação locomotora, sensibilização psicomotora e aumento da atividade exploratória quando comparados aos adultos; os testes de ansiedade, por sua vez, confirmaram o efeito ansiogênico do psicoestimulante e apontaram para uma maior suscetibilidade dos adolescentes aos efeitos ansiogênicos induzidos pela administração da droga. As respostas neuromoleculares também foram substancialmente diferentes. Enquanto os adolescentes exibiram aumento da atividade da via da PKA e da expressão de Icer, CBP e Pdyn; os adultos apresentaram diminuição de CaMKs, GluR1 e Icer. Essas diferentes respostas neuroadaptativas podem ajudar na compreensão dos mecanismos ontogênicos envolvidos na dependência e sugerem a necessidade de abordagens terapêuticas diferentes para esses dois grupos etários.

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

ABSTRACT

Maluf MCVR. Study of the pathways of CREB activation in cocaine-induced neuroplasticity in adolescent and adult mice. [PhD thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

The adolescence differs from adulthood in behavioral and neurochemical aspects. The cAMP responsive binding protein (CREB) is a transcription factor regulated by three main pathways in the mesolimbic-dopaminergic circuit: PKA, CaMK and ERK, which are modulated by cocaine. Previous results from this laboratory showed that CREB levels in the prefrontal cortex (CPF) and hippocampus of adolescent mice and adults are differently modulated by cocaine. Therefore, this study evaluated the activity of these pathways, responsible for CREB's modulation, as well as the levels of one of its main target genes (prodynorphin), endogenous CRE inhibitor (Icer) and CREB binding protein (CBP) in response to cocaine administration, besides the behaviors induced by the psychostimulant. Adolescents presented greater locomotor activation, psychomotor sensitization and increased exploratory activity compared to adults; the anxiety tests confirmed the anxiogenic effect of cocaine and pointed to a greater susceptibility of the adolescents to the anxiogenic effects induced by the administration of the drug. Neuromolecular responses were substantially differently. While adolescents exhibited increased PKA pathway activity and expression of Icer, CBP, and Pdyn; adults showed decreased levels of CaMKs, GluR1 and Icer. These different neuroadaptive responses may help understanding the ontogenic mechanisms involved in addiction, and suggest the need for different therapeutic approaches according to the age group.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Circuito motivacional.....	22
Figura 2 – Fosforilação do CREB.....	31
Figura 3 – Vias de regulação da ativação do CREB.....	33
Figura 4 – Delineamento experimental.....	38
Figura 5 – Campo-aberto.	38
Figura 6 – Labirinto em cruz elevado.	40
Figura 7 – Visualização do RNA extraído (gel de agarose 2,5%).....	45
Figura 8 – Verificação da síntese de DNAc (gel de agarose 2,5%).....	46
Figura 9 – Eficiência dos primers e coeficiente de correlação (R^2) da curva de diluição das corridas.....	47
Figura 10 – Atividade locomotora total.	50
Figura 11 – Atividade locomotora central.....	51
Figura 12 – Labirinto em cruz elevado.....	53
Figura 13 – Atividade da PKA.....	55
Figura 14 – Correlação atividade PKA e atividade locomotora.....	56
Figura 15 – Fosforilação da CaMKII.....	57
Figura 16 – Fosforilação da CaMKIV.....	59
Figura 17 – Correlação fosforilação CaMKIV e atividade locomotora.....	60
Figura 18 – Níveis proteicos de CBP.....	61
Figura 19 – Níveis proteicos de PDYN.....	62
Figura 20 – Atividade da ERK.....	63
Figura 21 – Correlação atividade ERK e atividade locomotora.....	64
Figura 22 – Expressão mRNA Icer.....	65
Figura 23 – Expressão mRNA Cbp.....	65
Figura 24 – Expressão mRNA Pdyn.....	66
Figura 25 – Modulação do CREB nos adolescentes.....	74
Figura 26 – Modulação do CREB nos adultos.....	74
Figura 27 – Principais respostas moleculares e comportamentais dos animais adolescentes, nas diferentes fases da administração de cocaína.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA - Receptor ácido-amino- 3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico

AMPC - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ANOVA - Análise de Variância

ATP - Adenosina trifosfato

AVT - Área Ventral Tegmental

CA - Campo-aberto

C α - Subunidade catalítica da PKA

Ca-Cam - Complexo cálcio-calmodulina

CaMK - Cálcio-calmodulina quinase

CBP - Proteína de ligação ao CREB

CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas

CPF - Córtex pré-frontal

CPFdl - Córtex pré-frontal dorso-lateral

CPFdm - Córtex pré-frontal dorso-medial

CPP - Preferência condicionada de lugar

CRE - Sítio de ligação para o CREB

CREB - Proteína de ligação responsiva ao AMPC

CREM – Modulador CRE

CRF – Fator de liberação de corticotropina

Ct - Ciclo do *threshold*

D(1-20) - Dias de tratamento dos animais

DAT - Transportador de dopamina neuronal

DNAc - DNA complementar

DSM - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

Dyn - Dinorfina

EC - Estímulo condicionado

ELK1 - Proteína contendo domínio ETS

ENC - Estímulo não-condicionado

ERK - Proteína quinase regulada por sinal extracelular

GluR – Subunidade do receptor AMPA

GPCR - Receptor acoplado à proteína G

Gs - Proteína G estimulatória

H(1-2) - Dias de habituação dos animais ao aparato
5-HT_{2A} - Receptor serotoninérgico
ICB-USP - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
Icer - Repressor indutível por cAMP
KA – Receptor kainato
KID - Domínio indutível de quinase
LCE - Labirinto em cruz elevado
LTP - Potenciação de longo prazo
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
NAc – Núcleo Accumbens
NET - Transportador de norepinefrina
NMDA - Receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato
pCREB - CREB fosforilado
Pdyn - Prodinorfina
PI3/Akt - Fosfatidilinositol-3-quinase/Akt
PKA - Proteína quinase A
PND – Dia após o nascimento
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
Ser133 - Resíduo de serina 133 do pCREB
SERT - Transportador de serotonina
SOE – Sistema opioide endógeno
Threshold - Linha horizontal definida na fase exponencial da qPCR
Trk – Receptor tirosina quinase
VSCC - Canal de cálcio dependente de voltagem
WB – Western blotting

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Dependência e cocaína	16
1.1.1 Dependência	16
1.1.2 Dados epidemiológicos	17
1.1.3 Cocaína: Mecanismo de ação	18
1.1.4 Cocaína: Tratamentos atuais e suas limitações	19
1.2 Neurobiologia da dependência e sensibilização psicomotora	20
1.2.1 Circuito motivacional	20
1.2.2 Sensibilização da atribuição de saliência ao incentivo e sensibilização psicomotora	22
1.2.3 Estágios da dependência	24
1.3 Adolescência como grupo de risco para a dependência	26
1.4 CREB e neuroplasticidade	29
1.5 Vias de ativação do CREB em resposta às drogas	30
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Animais	36
3.2 Drogas	36
3.3 Delineamento experimental	37
3.4 Registro da atividade locomotora	38
3.5 Labirinto em cruz elevado (LCE)	39
3.6 Atividade das quinases e níveis proteicos por Western blotting	40
3.6.1 Extração de proteínas	41
3.6.2 Eletroforese e transferência	41
3.6.3 Imunodeteção	42
3.7 Ensaio da atividade enzimática da ERK	43
3.7.1 Extração de proteínas	43
3.7.2 Imunoprecipitação	43
3.7.3 Ensaio enzimático	44

3.8 Análise da expressão gênica	44
3.8.1 Extração de RNA	44
3.8.2 Transcrição reversa	45
3.8.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real	46
3.8.4 Quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	47
3.9 Análise estatística	48
4 RESULTADOS	49
4.1 Atividade locomotora no campo-aberto	49
4.1.1 Atividade locomotora total	49
4.1.2 Atividade locomotora central	51
4.2 Comportamento ansioso no labirinto em cruz elevado	52
4.3 Avaliação dos níveis proteicos por Western blotting e Ensaio de Atividade Enzimática	54
4.3.1 Fosforilação e níveis de GluR1 no córtex pré-frontal e hipocampo	54
4.3.2 Correlações entre a atividade da PKA e a atividade locomotora	56
4.3.3 Fosforilação e níveis de CaMKII no córtex pré-frontal e hipocampo	56
4.3.4 Fosforilação e níveis de CaMKIV no córtex pré-frontal e hipocampo	58
4.3.5 Correlações entre os níveis de pCaMKIV e atividade locomotora	60
4.3.6 Níveis de CBP no córtex pré-frontal e hipocampo	60
4.3.7 Níveis proteicos de PDYN no córtex pré-frontal e hipocampo	61
4.3.8 Atividade da ERK no córtex pré-frontal e hipocampo	62
4.3.9 Correlações entre a atividade da ERK e a atividade locomotora	63
4.4 Avaliação da expressão de RNAm por qPCR	64
4.4.1 Expressão de Icer no córtex pré-frontal e hipocampo	64
4.4.2 Expressão de Cbp no córtex pré-frontal e hipocampo	65
4.4.3 Expressão de Pdyn no córtex pré-frontal e hipocampo	66
5. DISCUSSÃO	67
5.1 Diferenças comportamentais entre os animais adolescentes e adultos em resposta à cocaína	67
5.1.1 Sensibilização psicomotora	67
5.1.2 Comportamento tipo-ansiedade	70
5.2 Atividade das vias moleculares envolvidas na modulação do CREB em animais expostos à cocaína na fase adulta ou na adolescência	72

5.3 Alterações moleculares em resposta à cocaína e sua relação com a plasticidade sináptica e comportamentos relacionados à droga	78
5.4 Alterações moleculares em resposta à cocaína e sua relação com a sensibilização psicomotora e o comportamento tipo-ansiedade	84
5.5 Caracterização das respostas dos animais adolescentes à cocaína e o risco de dependência	88
5.5.1 Transição: Homeostasia vs Alostasia.....	88
5.5.2 Respostas moleculares e comportamentais dos animais adolescentes nos diferentes estágios do consumo da cocaína	89
6 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dependência e cocaína

1.1.1 Dependência

A dependência pode ser definida como uma desordem crônica recidiva, caracterizada pela compulsão de busca e uso da droga, perda da capacidade de limitar o seu consumo e a emergência de um estado emocional negativo (ex: disforia, ansiedade, irritabilidade) quando o acesso à droga é restrito (Koob, Volkow, 2016). É um estado que compreende características cognitivas, comportamentais e fisiológicas que, juntas, determinam o uso continuado da substância, apesar das consequências negativas (Mack, Frances, 2003).

Do ponto de vista diagnóstico, a dependência é definida pelo *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM), o manual usado por clínicos e pesquisadores para diagnosticar e classificar as desordens mentais. A Associação Americana de Psiquiatria publicou a sua quinta versão (DSM-5) em 2013, representando um processo de revisão de 14 anos. Nesta nova versão, as categorias “Dependência a substâncias” e “Abuso de substâncias”, presentes no DSM-IV, foram unidas em uma única categoria que passou a ser classificada em leve, moderada ou severa, de acordo com a manifestação dos critérios estabelecidos para o diagnóstico, dentre os quais podemos citar:

1) tolerância, definida como:

- a necessidade de um aumento significativo na quantidade de substância consumida para obter o efeito desejado,
- a diminuição marcante dos efeitos com o uso contínuo da mesma quantidade da substância.

2) abstinência, manifestada da seguinte forma:

- pela síndrome de abstinência característica da substância,
- a mesma substância (ou uma similar) é consumida com o objetivo de aliviar ou evitar os sintomas da abstinência.

3) a substância é consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido;

4) há um persistente desejo ou esforço, sem sucesso, para parar ou controlar o uso da substância;

- 5) uma grande quantidade de tempo é gasto em atividades necessárias para obter a substância (por exemplo, visitar vários médicos ou dirigir longas distâncias), usar a substância, ou recuperar-se de seus efeitos;
- 6) importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas são abandonadas ou reduzidas por causa do uso da substância;
- 7) o uso da substância é continuado apesar de o indivíduo reconhecê-lo como causa ou exacerbação de um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente (por exemplo, continuar o uso de cocaína apesar de reconhecer a depressão induzida pela droga, ou continuar a beber apesar de saber que o consumo do álcool levou ao agravamento de uma úlcera);
- 8) fissura, ou um intenso desejo ou impulso para usar a substância.

1.1.2 Dados epidemiológicos

A dependência a substâncias psicoativas, como anfetamina e cocaína, está entre um dos distúrbios psiquiátricos de maior prevalência, contribuindo significativamente para a mortalidade e a morbidade física e social. Embora as tendências no consumo de drogas variem entre as regiões, a extensão do uso dessas substâncias entre a população mundial tem-se mantido estável ao longo dos últimos quatro anos. De acordo com o *United Nations Office on Drugs and Crime* (2016), um em cada 20 adultos (ou um quarto de bilhão de pessoas entre 15 a 64 anos de idade) usaram pelo menos um tipo de droga em 2014, e estima-se que quase 12% do total de indivíduos que usam drogas, o que representa mais de 29 milhões de pessoas, sofram com desordens no uso de substâncias.

A dependência à cocaína está associada a uma série de problemas físicos, incluindo sintomas cardiovasculares, aumento do risco de infecção por HIV, bem como sintomas psicológicos, como paranoia, depressão, ansiedade e aumento do risco de suicídio (Kim, Lawrence, 2014).

De acordo com o *II Levantamento Domiciliar sobre Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil - 2005* (que envolveu as 108 maiores cidades do país), 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 (Carlini et al., 2006). A situação encontrada foi ainda 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 a pesquisa, 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) (Noto et al., 2003).

1.1.3 Cocaína: Mecanismo de ação

A cocaína é um alcaloide derivado da planta da coca (*Erythroxylon coca*), tem ação psicoestimulante e produz efeitos de euforia intensos, que contribuem para o seu abuso. Sua ação primária se dá por inibição do transportador de dopamina neuronal (DAT) e consequente bloqueio da recaptação do neurotransmissor, resultando em aumento da sua concentração extracelular. A maioria dos efeitos de recompensa da droga decorrem desse aumento da disponibilidade de dopamina e subsequente ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (Ron, Jurd, 2005).

A dopamina exerce seus efeitos por meio de duas famílias de receptores: receptores do tipo D1 (D1 e D5) e do tipo D2 (D2, D3 e D4) (Haile et al., 2012), os quais apresentam diferenças na função celular. Os receptores do tipo D1 aumentam a atividade da adenilil ciclase, enquanto o D2 tem ação oposta, diminuindo sua atividade (Levey et al., 1993). A disponibilidade desses receptores no cérebro pode variar com o uso repetido de cocaína. Volkow et al., (1990) mostraram que usuários de cocaína recém-detoxificados apresentaram menores níveis de receptor D2 no estriado em comparação aos indivíduos controle. Estudos subsequentes mostraram que os usuários de cocaína exibiram menores níveis de receptor D2 em regiões frontais e estriatais em comparação aos indivíduos saudáveis, mesmo após uma abstinência de quatro meses (Volkow et al., 1993, 1997). Em contraste, os níveis do receptor D1 ou do seu mRNA precursor parecem não diminuir após o abuso de cocaína (Martinez et al., 2009; Meador-Woodruff et al., 1993).

Além das suas ações nos neurônios dopaminérgicos, a cocaína liga-se ao transportador de norepinefrina (NET) e ao transportador de serotonina (SERT) cerebrais, causando inibição da recaptação pré-sináptica desses neurotransmissores e aumentando sua disponibilidade na fenda sináptica. Os efeitos do aumento da norepinefrina são especialmente importantes na overdose, já que essa monoamina tem ação vasoconstritora tanto central quanto periférica, o que

aumenta o risco de acidente vascular cerebral e hemorragia intracraniana (Kim, Lawrence, 2014).

Outro ponto importante que contribui para o potencial abusivo da cocaína decorre de sua ação rápida. As propriedades farmacocinéticas das drogas influenciam a velocidade com que elas atingem o cérebro e a duração de sua ação e, quanto mais rápido uma droga alcança o cérebro, maior o seu potencial para o desenvolvimento da dependência. Essas propriedades determinam as doses, rotas de administração e a frequência de uso da droga. Por exemplo, embora a cocaína e a metanfetamina atinjam o cérebro rapidamente (ainda que a cocaína seja um pouco mais rápida), os efeitos da cocaína no cérebro terminam muito mais rapidamente que os da metanfetamina. Essa diferença ajuda a explicar porque a cocaína é consumida a cada 30 a 60 min em um episódio de farra, enquanto a metanfetamina é consumida em um intervalo de poucas horas (Fowler et al., 2008). Essas propriedades também ajudam a explicar porque a maioria das drogas é injetada, fumada ou inalada, já que essas rotas permitem que a substância atinja o cérebro muito mais rapidamente do que pela via oral (Volkow et al., 2000).

1.1.4 Cocaína: Tratamentos atuais e suas limitações

Apesar de todo o esforço que vem sendo feito por clínicos e pesquisadores, não existe, até o momento, uma farmacoterapia aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da dependência à cocaína. A escolha permanece a terapia comportamental em conjunto com medicamentos específicos para tratar as desordens coexistentes, como depressão e ansiedade (Álvarez, 2013). No entanto, as terapias comportamentais atuais apresentam um prognóstico ruim, com cerca de 60% de reincidentes no primeiro ano após o tratamento (McLellan et al., 2000).

Uma revisão sistemática avaliou a eficácia da farmacoterapia atual para o tratamento da dependência à cocaína e mostrou que a maioria das drogas estudadas nos ensaios clínicos foram antidepressivos, agonistas dopaminérgicos e a carbamazepina (Lima et al., 2002). A farmacoterapia com antidepressivos baseia-se no aumento dos níveis de monoaminas, que podem aliviar a sintomatologia da abstinência de cocaína e aliviar a disforia e a fissura pela ação antidepressiva geral (Margolin et al., 1995); já o uso dos agonistas dopaminérgicos poderia restaurar os

déficits de DA no estriado na ausência da droga, aliviando os sintomas associados a esse estado hipodopaminérgico; enquanto a carbamazepina, um anticonvulsivante usado para uma variedade de transtornos neurológicos e psiquiátricos, poderia estar associado a uma redução da fissura pela cocaína (Halikas et al., 1997). No entanto, considerando os desfechos de interesse: permanência no tratamento e o número de pessoas que relataram eventos adversos, a eficácia medida por amostras de urina positivas para metabólitos da cocaína, fissura auto-reportada, gravidade da dependência, quantidade de cocaína consumida e medidas de qualidade de vida; os autores concluíram que não há evidência, até o momento, que suporte o uso clínico desses fármacos para tratamento da dependência (Lima et al., 2002).

Outra linha de terapia baseia-se no uso de antipsicóticos atípicos, os quais poderiam auxiliar na modulação da depressão e fissura associadas à abstinência por meio do bloqueio de receptores serotoninérgicos (5-HT_{2A}) e dopaminérgicos (D₂) (Filip et al., 2010; McMahon, Cunningham, 2001). No entanto, Álvarez et al., (2013) realizaram uma metanálise para avaliar o uso de antipsicótico no tratamento da dependência à cocaína e também não encontraram evidências suficientes para justificar seu uso clínico.

Sendo assim, a busca de um entendimento mais aprofundado dos mecanismos envolvidos na ação da cocaína continua sendo um tema atual, de reconhecida relevância.

1.2 Neurobiologia da dependência e sensibilização psicomotora

1.2.1 Circuito motivacional

Estudos com ratos sugerem a existência de um circuito motivacional primário que envolve o córtex pré-frontal e o estriado ventral, e possui acesso direto às estruturas de saída motora (Kalivas et al., 1999). Esse sistema anterior é regulado por outro secundário, posteriormente localizado e mais amplamente distribuído, que fornece múltiplas modalidades de informação sensorial por meio de projeções axonais (Jentsch et al., 2000; Pennartz et al., 1994). Por exemplo, o hipocampo e a amígdala enviam informação de memória contextual e afetiva relevantes para o estímulo motivacional (Bechara, 2001; Panksepp, 1998; Pennartz et al., 1994).

O circuito motivacional primário possui populações de neurônios capazes de gerar padrões de disparo que podem codificar múltiplos aspectos da resposta motivacional ou respostas alternativas (Woodward et al., 1999). 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 (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 NAc está associada ao estímulo motivacional, recompensa subjetiva, cognição pré-motora e aprendizado de um novo comportamento (Ito et al., 2002; Masterman, Cummings, 1997; Panksepp, 1998) e pode ser aumentada por diversos estímulos, como drogas, recompensas naturais (por ex.: comida e sexo) e estímulos aversivos ou estressantes (Panksepp, 1998; Self, Nestler, 1998; Volkow, Fowler, 2000). Alguns trabalhos mostram que esse aumento dopaminérgico pode gerar padrões de disparo neuronal extremos no NAc, aumentando a amplitude dos picos locais responsáveis pela ativação de eventos comportamentais nos sistemas motores (Finch, 1996; Ito, 2002; Kalivas, 1993b; O'Donnell et al., 1999) (Figura 1B).

Figura 1 – Circuito motivacional. **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.

1.2.2 Sensibilização da atribuição de saliência ao incentivo e sensibilização psicomotora

O circuito relacionado ao NAc, descrito anteriormente, é crítico para recompensas naturais adquirirem e exercerem controle motivacional sobre o comportamento (Kelley, Berridge, 2002). No entanto, as drogas envolvem esses circuitos de recompensa frequentemente de forma mais potente que as recompensas naturais e os transformam. Neuroadaptações persistentes no circuito motivacional, induzidas por essas substâncias, têm sido encontradas nos níveis molecular, celular e dos sistemas neurais (Hyman, Malenka, 2001; Nestler et al., 1993; Robinson, Berridge, 1993, 2000; Vanderschuren, Kalivas, 2000). Essas neuroadaptações têm sido apontadas como críticas para a transição do uso controlado de drogas 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 (Fischman, Foltin, 1992; Lamb et al., 1991). Esse processo é de fundamental importância na compulsão e na recaída.

O termo sensibilização refere-se ao aumento de uma resposta após a ocorrência repetida do estímulo que a promoveu. Nas pesquisas sobre drogas, a sensibilização tem sido estudada principalmente com relação à atividade locomotora. A habilidade de uma droga estimular a locomoção após uma dose aguda é progressivamente aumentada após exposição repetida à mesma. Esse fenômeno, denominado sensibilização psicomotora, é observado em diversas espécies (Sanchis-Segura, Spanagel, 2006).

A sensibilização psicomotora foi primeiramente descrita para drogas psicoestimulantes como anfetaminas (Segal, Mandell, 1974; Shuster et al., 1982) e cocaína (Shuster et al., 1977), tornando-se um teste de interesse no estudo das neuroadaptações provocadas por essas e outras substâncias de potencial abusivo, caracterizadas pelo aumento progressivo dos efeitos estimulantes motores induzidos pela administração repetida da droga, e permitindo que se explorem as diferenças entre os animais “sensibilizados” e os “não-sensibilizados” (Sanchis-Segura, Spanagel, 2006).

As alterações biológicas promovidas pela 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 psicomotora esteja relacionada principalmente a neuroadaptações caracterizadas pela sensibilização da via dopaminérgica mesolímbica (Wise, Bozarth, 1987), em que se observa o aumento da liberação de dopamina proveniente da Área Ventral Tegmental (AVT) no NAc (Robinson, Berridge, 2000). Além disso, receptores dopaminérgicos do tipo D1 tornam-se hipersensíveis após a

sensibilização, provavelmente potencializando o sinal dopaminérgico mesolímbico (White, Kalivas, 1998). As neuroadaptações associadas à sensibilização psicomotora à cocaína ocorrem principalmente em estruturas mesolímbicas, particularmente na AVT (McFarland, Kalivas, 2001; Vezina, Stewart, 1989), NAc (Nestler, 2001; Robinson, Kolb, 1999) e córtex pré-frontal medial (Sorg et al., 1997). Dessa forma, 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, Berridge, 2008).

1.2.3 Estágios da dependência

Nem todas as pessoas que passam por experiências com drogas de potencial abusivo tornam-se dependentes. Estima-se que somente 15 a 16% dos usuários tornam-se dependentes dentro de dez anos do primeiro uso, mesmo para drogas de alto poder de dependência, como a cocaína (Wagner, Anthony, 2002). Esse 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).

A dependência é um processo complexo, determinado tanto pela impulsividade quanto pela compulsividade. Desordens do controle impulsivo são caracterizadas por um aumento da sensação de tensão ou excitação antes de se cometer um ato impulsivo e pelo prazer, gratificação ou alívio no momento em que se comete o ato. Desordens desse tipo são associadas a mecanismos de reforço positivo (*American Psychiatric Association*, 1994). Por outro lado, desordens compulsivas são caracterizadas por estresse e ansiedade antes de um comportamento compulsivo repetitivo e pelo alívio do estresse com a realização do comportamento. Desordens compulsivas são associadas a mecanismos de reforço negativo e automaticidade (Koob, Volkow, 2016).

Nesse ponto, é importante conceituar o termo reforço e a sua relevância nos comportamentos motivados pelas drogas. O termo reforço é muitas vezes confundido, erroneamente, com o conceito de recompensa. O termo recompensa pode ser usado para descrever um estímulo com consequências desejáveis ou um

estado interno de hedonia decorrente do seu uso, do seu consumo ou aquisição. No entanto, reforço é um conceito mais amplo, que se refere à habilidade de um estímulo (reforço) aumentar a probabilidade de um repertório comportamental específico em contingências de aprendizado diferentes (reforço positivo vs negativo) e ocorre tanto por meio de processos relacionados à recompensa, quanto por mecanismos independentes desta, isto é, o reforço inclui a recompensa, mas não se limita a ela (Sanchis-Segura, Spanagel, 2006). Dessa forma, a sensibilização psicomotora representa um teste capaz de acessar o reforço induzido pela droga, sem a necessidade de envolvimento do componente hedônico ou recompensa.

O reforço positivo e o negativo levam ao mesmo resultado: aumentam a probabilidade de uma resposta particular. A distinção entre ambos se dá pelo fato de que no reforço positivo a emissão da resposta leva a uma consequência que satisfaz uma necessidade do organismo (é desejável); enquanto no reforço negativo, o aumento da probabilidade da resposta decorre de sua habilidade em suprimir um evento indesejado. Sendo assim, as drogas podem promover os dois tipos de reforço, e os comportamentos de autoadministração podem ser eliciados e mantidos tanto para obter a droga, quanto para suprimir os efeitos da abstinência (Sanchis-Segura, Spanagel, 2006).

O controle executivo no circuito motivacional é essencial para manter o comportamento direcionado ao objetivo e a flexibilidade das associações estímulo-resposta, equilibrando o comportamento guiado pelo reforço. A dependência é resultante de uma desregulação dramática desse circuito, causada por uma combinação exagerada de saliência do incentivo e formação de hábito, déficits de recompensa e estresse excessivo, e comprometimento da função executiva, em três estágios (definidos abaixo), os quais pioram com o tempo e envolvem alterações neuroplásticas nos circuitos cerebrais da dependência, estresse e função executiva (Koob, Volkow, 2016):

- 1) consumo/ Intoxicação: durante o consumo da droga, os efeitos compensatórios, o desenvolvimento da saliência do incentivo e a formação do hábito de busca da droga envolvem alterações dopaminérgicas e dos peptídeos opioides nos núcleos da base. Nesta etapa, os efeitos reforçadores das drogas podem engajar neurotransmissores envolvidos na recompensa e no circuito motivacional, ativando respostas de hábitos dirigidas ao estímulo;

- 2) negativo/ abstinência: na abstinência, há aumento do estado emocional negativo e das respostas tipo estresse e disforia, que envolvem uma diminuição na função do componente dopaminérgico do sistema de recompensa e o recrutamento de neurotransmissores envolvidos no estresse, como o fator de liberação de corticotrofina (CRF) e dinorfina, no neurocircuito da amígdala estendida (composta por diversas estruturas, incluindo os núcleos da estria terminal, núcleo central da amígdala e possivelmente a zona de transição na porção média do NAc), cujas principais projeções são enviadas para o hipotálamo e tronco encefálico;
- 3) preocupação/ antecipação: a fissura e os déficits da função executiva neste estágio envolvem a desregulação de projeções-chave aferentes do CPF e ínsula para os núcleos da base e amígdala estendida, bem como o processamento da informação contextual pelo hipocampo. Esse estágio tem sido postulado como elemento decisivo na recaída em humanos.

Os estágios do ciclo de dependência decorrem de neuroadaptações em cinco circuitos principais, incluindo: 1) o sistema mesolímbico dopaminérgico; 2) estriado ventral; 3) estriado ventral, estriado dorsal, tálamo; 4) córtex frontal dorsolateral, córtex frontal inferior, hipocampo; 5) amígdala estendida. A identificação dos mecanismos moleculares e neuroquímicos envolvidos nesses circuitos pode fornecer informações essenciais sobre a vulnerabilidade, tratamento e recuperação da dependência. Sendo assim, a sensibilização psicomotora é um importante meio de explorar os efeitos da administração repetida de drogas nessa neuroplasticidade, já que diversos estudos tem demonstrado, por exemplo, sua associação com as neuroadaptações do sistema mesolímbico dopaminérgico e estriado ventral (Koob, Volkow, 2010).

1.3 Adolescência como grupo de risco para a dependência

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 maconha e cocaína (Spear, 2000).

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 experimentaram sintomas de alcoolismo entre 15 e 19 anos, e 80% dos casos de alcoolismo tiveram início antes dos 30 anos de idade (Helzer et al., 1991). Além disso, 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).

Os adolescentes também 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 apresentam períodos mais curtos entre o primeiro uso e a dependência quando comparados a indivíduos que iniciam o uso de álcool e maconha quando adultos (Clark et al., 1998). Um estudo mostrou que apesar de fumarem menos cigarros do que os adultos, os adolescentes exibiram 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 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 (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, Crews, 2002).

O hipocampo e o córtex pré-frontal atingem a maturidade mais tardiamente do que as áreas cerebrais primárias sensório-motoras, e as mudanças no desenvolvimento cognitivo coincidem com as mudanças no cérebro (Durstun, Casey, 2006; White, Swartzwelder, 2004). Por exemplo, os gânglios da base recebem e enviam diversas projeções para o córtex pré-frontal, e ambas as regiões amadurecem relativamente tardiamente (Sowell et al., 1999). Como este circuito está envolvido em ações dirigidas a metas, seu desenvolvimento tem sido relacionado ao amadurecimento das ações guiadas pela cognição durante a infância e adolescência. Reiss et al., (1996) mostraram que, de fato, o maior aumento no volume pré-frontal ocorre durante este período do desenvolvimento, corroborando essa afirmação. Vários estudos começaram a correlacionar as alterações do desenvolvimento da anatomia cerebral com o comportamento (Olesen et al., 2003; Sowell et al., 2004). Por exemplo, Casey et al., (1997) mostraram correlações entre o desempenho em medidas de controle de impulso e medidas volumétricas do córtex pré-frontal e gânglios basais em crianças saudáveis em comparação a crianças com Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade. Essas análises sugerem uma relação causal entre o cérebro e o comportamento.

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 (Breiter et al., 2001; Chang et al., 2000; Groenewegen et al., 1999; Masterman, Cummings, 1997; Woodward et al., 1999), 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. Durante a adolescência, o CPF ainda está em desenvolvimento, o que limita a capacidade de inibição motivacional. Esse fato aliado a uma robusta atividade dopaminérgica disparada pela novidade,

característica dos adolescentes, pode potencializar a ativação do circuito motivacional pelas drogas de abuso (figura 1B), produzindo consequências motivacionais de longo prazo mais profundas e predispondo-os ao aumento de ações impulsivas e comportamentos de risco, incluindo a experimentação e uso abusivo de drogas (Chambers et al., 2003). Dessa forma, distúrbios no desenvolvimento cerebral induzidos por drogas podem levar a consequências adversas de longo prazo (Adriani, Laviola, 2004). De fato, 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).

1.4 CREB e neuroplasticidade

O CREB é um fator de transcrição envolvido em diversos processos biológicos. 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 vários processos celulares.

Apesar de sua ampla atuação, o CREB tem sido extensivamente estudado nos mecanismos de neuroplasticidade, nos quais apresenta papel de destaque, especialmente naqueles relacionados à formação e manutenção da memória. Na década de 90, estudos com *Drosophila* e *Aplysia* mostraram o envolvimento direto desse fator de transcrição na formação e plasticidade sináptica da memória (Bartsch et al., 1995; Yin et al., 1994). Esses estudos foram seguidos por diversos outros que mostraram sua ativação na memória. Por exemplo, em roedores, o CREB está envolvido na memória de condicionamento ao medo, no condicionamento ao sabor aversivo, na memória olfativa, na memória de reconhecimento e memória espacial (Benito, Barco, 2010).

Diante de sua importância na neuroplasticidade, o CREB tem sido cada vez mais estudado nos processos da dependência, nos quais tem participação fundamental. Em regiões do sistema nervoso central envolvidas na dependência, a

fosforilação do 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 ativação do CREB em regiões do circuito motivacional (Walters et al., 2003; Yamamoto et al., 1988). Alterações na atividade das vias do CREB nessas regiões têm sido relatadas em resposta à administração de diversas drogas (Berke, Hyman, 2000; Carlezon et al., 1998; Cole et al., 1995; Nestler, 2001; Walters et al., 2003). Acredita-se que a ativação de CREB induzida por drogas nesses centros de motivação seja responsável por algumas características comuns encontradas na adição.

1.5 Vias de ativação do CREB em resposta às drogas

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 desse neurotransmissor na fenda sináptica, o qual atua principalmente por ligação ao receptor dopaminérgico do tipo D1, acoplado à proteína G estimulatória (Gs), no neurônio pós-sináptico. Essa 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) (Ron, 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 transcrricional que levam à síntese de RNA. Dentro do KID está a serina 133

(Ser133), que quando fosforilada 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 (Bonnie et al., 2002).

Figura 2 – Fosforilação do CREB. 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.

As histonas acetiltransferases acetilam histonas, promovendo a transcrição gênica; enquanto as histonas desacetilases removem o grupo acetil, levando ao silenciamento gênico (Kouzarides, 2007). Dessa forma, a CBP está envolvida na coativação de vários fatores de transcrição por meio da acetilação de histonas e outras proteínas regulatórias, além de interagir diretamente com a maquinaria de transcrição basal, facilitando o início da transcrição gênica (Bonnie et al., 2002). A CBP também regula a transcrição durante a memória e a plasticidade sináptica (Barrett, Wood, 2008) e tem importante papel no desenvolvimento de comportamentos relacionados à dependência. Um estudo mostrou que a exposição perinatal ao etanol diminuiu a expressão e função da CBP no cerebelo em desenvolvimento de ratos (Guo et al., 2011).

O CREB pode ser fosforilado pela via da PKA por meio da ligação de moléculas sinalizadoras às GPCRs. No entanto, sua fosforilação por essa via não está restrita à proteína G, já que alguns subtipos de adenilil ciclase são ativados por cálcio (Poser, Storm, 2001). O influxo desse íon para o meio intracelular pode ocorrer, por exemplo, por meio da despolarização de canais de cálcio dependentes de voltagem (VSCC) ou pela ativação de receptores ionotrópicos, como o receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA). Dentro da célula, o cálcio pode ligar-se à proteína calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina (CaCaM) que pode ativar algumas cálcio-calmodulina quinases (CaMK) capazes de fosforilar o CREB, especialmente as CaMII e CaMKIV (Anderson, Means, 2002; Curtis, Finkbeiner, 1999).

Outra via capaz de fosforilar o CREB é a 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, que podem ser ativadas por proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), como a ERK, e têm a capacidade de fosforilar CREB em resposta a fatores de crescimento (Arthur, Cohen, 2000; De Cesare et al., 1998). Muitos desses fatores sinalizam por meio de receptores tirosina quinase (TrKs) que podem ativar outra via de sinalização, a do fosfatidilinositol-3-quinase/Akt (PI3/Akt) (Cantley, 2002). A fosforilação do CREB também é induzida por estímulos estressores como hipóxia e radiação ultravioleta (UV), e o mecanismo parece envolver a p38-MAPK (Deak et al., 1998). Por outro lado, as fosfatases PP1 e PP2A podem levar à desfosforilação do CREB, controlando a cinética e duração de sua ativação (Bonnie et al., 2002).

Figura 3 - Vias de regulação da ativação do CREB. Neurotransmissores excitatórios, ligantes de GPCRs, fatores de crescimento neuronais e estresse estão entre os estímulos que ativam as vias de sinalização que levam à fosforilação do CREB. A dinorfina é um dos genes-alvo do CREB.

Fonte: adaptada de Bonnie et al., 2002; Muschamp, Carlezon, 2013.

Um dos genes-alvo do CREB é a dinorfina, um peptídeo opioide originado do precursor prodinorfina, que é o ligante endógeno do receptor k-opioide (Chavkin et al., 1982; Cole et al., 1995; Muschamp, Carlezon, 2013). Estudos mostraram que a cocaína aumentou a expressão de dinorfina (Daunais et al., 1994), e animais com depleção do receptor k-opioide não exibiram sensibilização comportamental após administração da droga, além de mostrarem uma menor resposta dopaminérgica aguda (Chefer et al., 2005, 2006). Diversos estudos também apontam para o envolvimento da dinorfina no estresse, por exemplo, o antagonismo de receptores k-opioide bloqueia a potencialização da preferência condicionada de lugar (CPP) de cocaína induzida pelo estresse (McLaughlin et al., 2003).

O repressor indutível por AMPc (Icer) pertence à família dos genes CREB/ modulador CRE (CREM)/ fator de transcrição de ativação 1 (ATF-1) e é um repressor endógeno da transcrição gênica mediada por CRE. Estudos têm mostrado sua participação na regulação da plasticidade sináptica relacionada à memória e aprendizado (Borlikova, Endo, 2009), enquanto outros mostram seu envolvimento nos processos da adição. Por exemplo, Han et al., (2011) mostraram que camundongos com superexpressão de Icer apresentaram diminuição da

sensibilização locomotora induzida por metanfetamina; por outro lado, Green et al., (2006) mostraram que a superexpressão de Icer no NAc levou a um robusto efeito ansiogênico.

Por fim, as alterações moleculares em resposta às drogas são essenciais para a compreensão dos processos envolvidos na dependência. Dessa forma, as pesquisas neurobiológicas nessa área buscam, cada vez mais, entender as mudanças que ocorrem no nível molecular, celular e nos neurocircuitos, as quais medeiam a transição do uso controlado e ocasional de substâncias para a perda de controle do consumo da droga e dependência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar as respostas comportamentais e biomoleculares exibidas por adolescentes e adultos após a administração de cocaína (aguda e repetida), bem como na abstinência da droga.

2.2 Objetivos específicos

1) Avaliar a sensibilização psicomotora induzida pela administração de cocaína em animais adultos e adolescentes, comparando as diferenças entre as idades e as correlações com as respostas biomoleculares, uma vez que esse teste reflete as alterações neuroplásticas decorrentes da administração repetida da droga.

2) Avaliar o comportamento tipo-ansiedade induzido pela administração e abstinência de cocaína em animais adultos e adolescentes, comparando as diferenças entre as idades. A ansiedade é uma das manifestações mais comuns em processos que permeiam a dependência, sendo apontada tanto como causa quanto como consequência desta.

3) Analisar a atividade das principais vias moleculares envolvidas na modulação do CREB (PKA, ERK, CaMKII e CaMKIV) em resposta à cocaína, no CPF e hipocampo dos animais adolescentes e adultos, comparando as diferenças entre as idades em três momentos diferentes: na administração aguda, repetida e abstinência. O interesse por essas vias específicas surgiu pelas evidências do seu envolvimento na dependência, apontadas por diversos autores (Anderson, Means, 2002; Arthur, Cohen, 2000; Bonnie et al., 2002; Ron, Jurd, 2005), bem como por trabalho anterior deste laboratório (Valzachi et al., 2013), o qual mostrou que adolescentes e adultos apresentam níveis diferentes de CREB em resposta à droga.

4) Analisar os efeitos da cocaína sobre os níveis da prodinorfina, um dos genes-alvo do CREB; da Icer, o seu repressor endógeno; e da CBP, envolvida em sua transcrição, no CPF e hipocampo dos animais adolescentes e adultos, comparando as diferenças entre as idades em três momentos diferentes: na administração aguda, repetida e abstinência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram usados oitenta e quatro (84) camundongos *Swiss* machos, adolescentes (28-30 dias) e oitenta e dois (82) adultos (58-60 dias), provenientes de colônia estabelecida no Biotério de camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Após o desmame, os animais foram transferidos e mantidos no biotério do Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental do ICB-USP, alojados em gaiolas de polipropileno (27,5 cm x 16,5 cm x 13,0 cm), em grupos de cinco, sob temperatura constante (22 ± 1 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h), com água e comida *ad libitum*. Antes do início dos testes, os animais permaneceram, pelo menos, 72 h sob estas condições para evitar que as diferenças de ambiente e alojamento entre os biotérios interferissem nos experimentos. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB-USP, certificado pelo protocolo nº 032 na folha 126 do livro 02.

3.2 Drogas

A cocaína foi cedida pelo Núcleo de Exames de Entorpecentes do Instituto de Criminalística de São Paulo, para fins de pesquisa, purificada (98,5% de pureza) pelo Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, seguindo protocolo descrito em Garcia et al., (2012), e armazenada no Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental do ICB-USP, sob os cuidados da Profa. Dra. Rosana Camarini. A solução de cocaína foi preparada no início de cada um dos experimentos e conservada sob refrigeração média de 4 °C, por um período máximo de 30 dias. A droga 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. Essa dose foi escolhida com base em trabalhos anteriores, que mostraram sua adequação para o estudo da sensibilização locomotora tanto em camundongos adultos quanto em adolescentes (Camarini et al., 2008; Valzachi et al., 2013).

3.3 Delineamento experimental

A representação gráfica do delineamento experimental está ilustrada na Figura 4, na forma de linha do tempo. Antes do início do tratamento com a droga e avaliação comportamental no campo-aberto (CA), os animais foram submetidos a dois dias de exposição ao aparato (H1 e H2), nos quais receberam uma injeção de salina e foram expostos ao CA, com o objetivo de minimizar a interferência do efeito da novidade sobre a atividade locomotora. O tratamento teve início no dia seguinte a H2, e os animais 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 período de abstinência, do nono ao décimo nono dia (D9 a D19), os animais não receberam qualquer tipo de injeção nem foram expostos ao CA e, no dia dezoito (D18), foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação do comportamento tipo-ansiedade.

No último dia do protocolo (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 com salina, de D1 a D8, e desafiado com salina, em D20), Agudo (tratado com salina e desafiado com cocaína), Repetido (tratado e desafiado com cocaína) e Abstinência (tratado com cocaína e desafiado com salina). Por fim, os animais foram eutanasiados por deslocamento tronco-cervical, 1 h após terem recebido a injeção desafio, e tiveram seus encéfalos retirados, lavados em solução salina e rapidamente congelados em gelo-seco à temperatura de -20 °C e armazenadas à -80 °C. As estruturas encefálicas (CPF e hipocampo) foram dissecadas manualmente, com auxílio de um bisturi e outros instrumentos cirúrgicos, e com base no atlas de Franklin e Paxinos (2001). Todo o procedimento foi realizado com material previamente autoclavado e esterilizado com álcool 70% por 30 min. O mesmo delineamento experimental foi realizado para os animais adolescentes e adultos, com base nos procedimentos descritos em Camarini et al., (2008) e Valzachi et al., (2013).

Figura 4 - Delineamento experimental - H1 e H2: exposição prévia ao aparato (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-D19: os animais não receberam tratamentos, e em D18 foram testados no LCE. D20: os animais receberam uma injeção desafio de salina ou cocaína e foram sacrificados 1 h após. As linhas vermelhas representam os dias em que os animais receberam cocaína. Os dias representados na figura são aqueles em que os animais foram submetidos ao CA (H1, H2, D1, D8 e D20) e LCE (D18).

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* (Figura 5).

Figura 5 - Campo-aberto. Registro da atividade locomotora dos animais.

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 Mediacruise (Canopus Co, Ltd., USA) por meio de uma câmera de vídeo, durante um período de 15 min. Após serem retirados do aparato, os animais foram colocados temporariamente em uma gaiola

separada daqueles que ainda não tinham sido submetidos ao teste, evitando interferências comportamentais, e somente retornaram à sua gaiola original após todos terem sido expostos ao CA. Os grupos de animais alojados em uma determinada gaiola permaneceram os mesmos durante todo o experimento.

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 9 h e 12 h. As atividades locomotoras total e central foram analisadas por meio do programa de monitoramento de imagens de vídeo Etho Vision (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA). A atividade locomotora total foi usada para avaliar a sensibilização locomotora dos animais, enquanto a atividade locomotora central foi usada para avaliar o comportamento tipo ansiedade.

3.5 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE consiste em um aparato de madeira (50 cm de altura), com 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 e arranjados de forma que os dois braços de cada tipo ficam 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 por meio de uma câmera de vídeo e quantificados em momento posterior, com o auxílio de um cronômetro e de contadores manuais (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 serem retirados do aparato, os animais foram colocados temporariamente em uma gaiola separada daqueles que ainda não tinham sido submetidos ao teste, evitando interferências comportamentais, e somente retornaram à sua gaiola original após todos terem sido expostos ao LCE. Os grupos de animais alojados em uma determinada gaiola permaneceram os mesmos durante todo o experimento.

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 Atividade das quinases e níveis proteicos por Western blotting

Os níveis proteicos foram quantificados por *Western blotting* (WB). A atividade da CaMKII foi medida pela fosforilação da Thr286, que é auto-fosforilada quando a enzima está ativa; a atividade da CaMKIV foi medida pela fosforilação da Thr196, que é fosforilada pela CaMK para ativar a enzima; e a atividade da PKA foi medida pela fosforilação da subunidade GluR1 (Ser845) do receptor ácido-amino- 3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA).

A subunidade GluR1 do receptor AMPA é fosforilada em múltiplos sítios localizados na região c-terminal da proteína, mas segundo Roche et al., (1996), a PKA fosforila especificamente a Ser845. Os autores mostraram que a fosforilação dessa serina pela PKA resultou em uma potenciação de 40% do pico da corrente nos canais GluR1 em neurônios de cultura, sugerindo que esse seja o mecanismo de potenciação dos receptores AMPA neuronais induzido pela PKA.

Chao et al., (2002) demonstraram a especificidade da PKA na fosforilação da Ser845 (GluR1), uma vez que esta não ocorre quando a quinase é inibida. O uso do agonista do receptor dopaminérgico D1 SKF 81297 em células do NAc de ratos levou ao aumento de pGluR1 (Ser845) de modo dependente da sua concentração. No entanto, o inibidor da PKA H89 inibiu a fosforilação da Ser845 tanto na presença do agonista D1 quanto na ausência deste (estimulação basal), sugerindo que a fosforilação da GluR1 (Ser845) é mediada pela PKA após estimulação de receptores

D1 em neurônios do NAc (Chao et al., 2002). Dessa forma, o nível de fosforilação de GluR1 (Ser845) tem sido usado como um indicador da atividade da PKA por diversos autores (Edwards et al., 2007; Mattson et al., 2005; Sun et al., 2013).

3.6.1 *Extração de proteínas*

As estruturas encefálicas (CPF e hipocampo) foram descongeladas, pesadas e maceradas individualmente com tampão de lise (Tris-HCl 50 mM; SDS 1%; glicerol 20%; NaCl 150 mM; DTT 0,5 mM; β -glicerofosfato de sódio 10 mM; NaF 50 mM; inibidor de protease (Sigma) 1:100; água Milli-Q), na proporção de 20 μ l de tampão de lise para cada 1 mg de tecido. Em seguida, foram incubadas em gelo por 20 min e centrifugadas (13.000 g, 20 min, 4 °C). O sobrenadante foi recolhido e armazenado 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 °C por 5 min. A seguir, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS em mini cubas verticais (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Em cada um dos géis, o primeiro poço era sempre destinado ao marcador de peso molecular PageRuler (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, Maryland, USA), e havia sempre duas amostras do grupo Controle, cuja média dos resultados era usada como parâmetro para comparação com os demais grupos. 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 12% (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). A eletroforese foi conduzida em tampão de corrida (tris-base 250 mM; SDS 10%; glicina 960 mM).

As proteínas 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. 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 Imunodeteção

As membranas foram incubadas 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 por 1 h, para bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos. Então, as membranas foram incubadas com um dos anticorpos primários policlonais (*rabbit*): anti-GluR1 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA, ab313232), anti-pGluR1 S845 (Abcam, ab3901), anti-CaMK II (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc9035), anti-CaMK IV (Abcam, ab3557), anti-pCaMK II Thr286 (Santa Cruz, sc12886-R), anti-pCaMK IV Thr196 (Santa Cruz, sc28443-R), anti-CBP (Santa Cruz, sc369), anti-PDYN (Abcam, ab102568) e o anticorpo (*mouse*) anti- α -tubulina (Sigma, t6199), diluídos em solução TTBS com leite desnatado Molico (Nestlé) 3%, *overnight* à 4 °C; com exceção da alfa-tubulina, cuja incubação foi realizada durante 1 h, em temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram lavadas duas vezes em TTBS e incubadas com anticorpo secundário *rabbit* peroxidase-conjugado (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 (Sigma, a0168) 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 foram lavadas em solução de ácido acético 5% e em TTBS para remoção dos anticorpos, e incubadas novamente com um novo anticorpo primário, de modo que a α -tubulina e o par de proteínas fosforilada e não-fosforilada foram quantificados na mesma membrana. Em seguida foram submetidas aos mesmos procedimentos detalhados anteriormente.

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. Com o objetivo de minimizar os erros inerentes a essa etapa, a densidade de todas as bandas foi quantificada em duplicata, e o resultado considerado foi a média das duas medidas.

3.7 Ensaio da atividade enzimática da ERK

Para a determinação da atividade da ERK foi utilizado o kit não radioativo p44/42 MAP Kinase Assay (Cell Signaling, #9800). O teste baseia-se na imunoprecipitação da MAPK p44/42 (ERK1/2) ativa, presente no extrato celular, por meio de anticorpo anti-MAPK p44/42 (Thr202/Tyr204) imobilizado em sepharose (agarose), seguida por um ensaio enzimático *in vitro*, utilizando-se a proteína contendo domínio ETS (ELK1) como substrato (Kortenjann, 1994). Por fim, mede-se o nível de fosforilação da ELK1 Ser383 por WB. Todas as amostras foram analisadas duas vezes (em duplicata) para minimizar os possíveis erros inerentes à técnica.

3.7.1 Extração de proteínas

As amostras foram diluídas e maceradas no tampão de lise (1x), usando-se 400 µl para CPF e 600 µl para hipocampo. Em seguida, foram centrifugadas (20.000 g, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi recolhido e armazenado à -20 °C até o momento do uso. A determinação da concentração proteica foi feita em duplicata pelo método de Bradford (1976), empregando-se albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich chemie, Steinhein, DEU) para a construção da curva padrão.

3.7.2 Imunoprecipitação

Foram coletados 800 µg de proteína de cada uma das amostras, e o volume foi ajustado para 200 µl com tampão de lise (1 x). Foram adicionados 20 µl do anticorpo anti-MAPK p44/42 imobilizado por tubo, e as amostras foram incubadas *overnight*, sob agitação leve e temperatura de 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (14.000 g, 1 min, 4 °C), e o sobrenadante foi descartado.

3.7.3 Ensaio enzimático

Os precipitados (mantidos em gelo) foram lavados com 500 µl de tampão quinase (1x) e ressuspensos em 50 µl do tampão. Em seguida, foi adicionado 1 µl de ATP e 1 µl de ELK-1 (substrato), e os tubos foram incubados por 30 min, à temperatura de 30 °C. A reação foi interrompida com a adição de 25 µl de tampão SDS, seguida de agitação no vórtex e microcentrifugação. As amostras foram então submetidas à eletroforese, transferência e imunodeteção, seguindo o protocolo detalhado nos itens 3.6.2 e 3.6.3. Para a imunodeteção, foi utilizado o anticorpo primário monoclonal (mouse) anti-pELK1 Ser383 (Cell Signaling, 2B1), e o anticorpo secundário *mouse* peroxidase-conjugado (Sigma, a0168).

3.8 Análise da expressão gênica

3.8.1 Extração de RNA

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 13.000 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 12.000 g, 4 °C. Os *pellets* foram lavados com etanol 75% e as amostras centrifugadas por 15 min à 12.000 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 60 µl (CPF) ou 80 µl (hipocampo) de água-DEPC (Invitrogen). Estes volumes foram escolhidos após padronização, para obter concentrações adequadas de RNA nas amostras.

Os extratos de RNA foram quantificados em duplicata por meio do fotômetro Eon Take3 Gen5Version (Biotek, Winooski, VT, USA), sob comprimento de onda 260 nm, seguindo as instruções do fabricante. A pureza do RNA foi confirmada pela razão 260/280 nm, a qual deve estar entre 1,8 e 2,0, pois valores abaixo de 1,8 podem indicar contaminação por proteínas (Fraga et al., 2014). As amostras apresentaram razão de intensidade 260/280 nm média de 1,9, confirmando a pureza do RNA extraído.

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 da integridade do material extraído. Após a eletroforese, o gel foi banhado em solução de brometo de etídeo 0,5%, e as bandas de RNA ribossômico (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.

3.8.2 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.

3.8.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

Os oligonucleotídeos iniciadores foram confeccionados pela empresa Qiagen (Qiagen Sciences, Inc., Germantown, MD, USA) a partir da sequência das principais variantes dos genes depositadas no banco público do NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>), contemplando: *Mus musculus* (Mm)_CREB binding protein (Cbp – Gene ID 12914 – variante principal, X 1-2); Mm_prodynorphin (Pdyn – Gene ID 18610 – variantes 1 e 2); Mm_cAMP responsive element modulator (Icer – Gene ID 12916 – variantes 1-6, 12-15, X 1-23); Mm_glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh – Gene ID 14433 – variantes 1 e 2); Mm_hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt – Gene ID 15452); Mm_peptidylprolyl isomerase A (Ppia – Gene ID 268373).

Os genes de referência (Gapdh, Hprt e Ppia) exibiram as menores variações entre quatro genes iniciais escolhidos, conforme análise gerada pelo programa Bestkeeper© - versão 1 (Pfaffl, 2004), e foram selecionados como os mais estáveis e adequados para este estudo.

Para verificar a eficiência dos *primers* e validar as condições das corridas, foi feita uma curva de diluição com 5 concentrações (1- 3 - 9 - 27 - 81), em triplicata, para cada gene analisado. A eficiência dos *primers* variaram de 89 a 110%, e os coeficientes de correlação não foram menores do que 0,99, conforme descrito na figura 9.

Primer	Eficiência	R ²
Cbp	108%	0,99
Pdyn	101%	1,00
Icer	99%	0,99
Gapdh	110%	0,99
Hprt	90%	1,00
Ppia	89%	1,00

Figura 9 – Eficiência dos primers e coeficiente de correlação (R²) da curva de diluição das corridas.

A qPCR foi realizada no equipamento Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Concord, Austrália). As reações continham 1 µl de 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). Esse sistema possui um marcador que aumenta sua fluorescência em cerca de 100-200 vezes ao se ligar à dupla fita de DNA, dessa maneira, conforme ocorre a amplificação, há um aumento correspondente na fluorescência medida pelo detector.

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. Todas as amostras referentes aos grupos controle e experimental para cada gene foram processadas na mesma corrida.

3.8.4 Quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$

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 C_t (Ciclo do *threshold*) da amostra. Seguindo o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$,

descrito em Livak e Schmittgen (2001), o valor do Ct de cada amostra foi normalizado com a média geométrica dos Cts dos genes de referência, pela fórmula:

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

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.

3.9 Análise estatística

Para responder aos objetivos deste estudo, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas [dias (análise da atividade locomotora em H1 e H2, D1 e D8)] e ANOVA fatorial (análise da atividade locomotora em D20; do comportamento tipo-ansiedade, e das medidas biomoleculares), sempre seguidas das comparações múltiplas de Tukey quando identificado efeito estatisticamente significativo do fator. O teste-t foi utilizado somente nos casos em que a comparação entre dois grupos mostrou-se necessária, com base nos indícios apontados pela análise de variância. As correlações entre as medidas de atividade locomotora e as respostas biomoleculares foram avaliadas pelo teste de Pearson, bicaudal. Todos os testes de hipóteses desenvolvidos neste trabalho consideraram uma significância de 5%, ou seja, a hipótese nula foi rejeitada quando p-valor foi menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade locomotora no campo-aberto

4.1.1 Atividade locomotora total

Antes do início do tratamento com a droga e avaliação comportamental no campo-aberto, os animais foram submetidos a dois dias de exposição ao aparato. Foi observada significância dos fatores dias [$F_{(1,164)} = 37,37$] e idade [$F_{(1,164)} = 4,09$]; porém sem significância da interação, sendo que a média de locomoção foi maior em H1 do que em H2 ($p < 0,01$) e os adultos apresentaram maior média do que os adolescentes ($p < 0,05$).

Posteriormente, foi feita a avaliação dos dias D1 e D8 para locomoção total, em que foram observados efeito dos fatores dia [$F_{(1,162)} = 77,89$] e pré-tratamento [$F_{(1,162)} = 239,53$], da interação dia vs pré-tratamento [$F_{(1,162)} = 43,49$] e idade vs pré-tratamento [$F_{(1,162)} = 6,05$], sendo que D8 apresentou maior média do que D1 ($p < 0,01$), e o grupo Cocaína apresentou maior média do que o Salina ($p < 0,01$).

Na interação dia vs pré-tratamento, observou-se aumento da atividade locomotora em D8 em comparação ao D1 nos grupos que receberam cocaína ($p < 0,01$), indicando desenvolvimento de sensibilização locomotora em ambas as idades. Também foi observada maior atividade locomotora nos animais que receberam cocaína em D1 em comparação aos que receberam salina tanto em D1 quanto em D8 ($p < 0,01$), indicando, novamente, o efeito estimulante da droga.

Na interação idade vs pré-tratamento, observou-se que tanto o grupo Cocaína adolescente quanto o grupo Cocaína adulto apresentaram maior atividade locomotora do que os respectivos grupos Salina ($p < 0,01$), demonstrando o desenvolvimento da sensibilização em ambas as idades. No entanto, a atividade locomotora observada no grupo Cocaína adolescente foi maior que a do grupo Cocaína adulto ($p < 0,05$). A média de locomoção do grupo Salina adolescente não apresentou diferença em relação ao grupo Salina adulto ($p = 0,89$).

Em seguida, foi feita a análise somente para o último dia de tratamento (D20), em que foi observada significância dos fatores idade [$F_{(1,158)} = 15,42$; $p < 0,01$], pré-tratamento [$F_{(1,158)} = 22,63$; $p < 0,01$] e desafio [$F_{(1,158)} = 189,95$; $p < 0,01$]. Os adolescentes apresentaram maior atividade locomotora do que os adultos, e os

animais pré-tratados ou desafiados com cocaína apresentaram maior atividade locomotora do que os que receberam salina.

Quanto às interações, foi observada significância estatística para idade vs pré-tratamento [$F_{(1,158)} = 4,62$; $p < 0,05$] e idade vs pré-tratamento vs desafio [$F_{(1,158)} = 5,24$; $p < 0,05$]. Pela análise *post hoc*, foi possível observar que embora os animais de ambas as idades desafiados com cocaína tenham apresentado maior atividade locomotora do que os desafiados com salina, os adolescentes pré-tratados com cocaína apresentaram maior atividade locomotora do que os mesmos grupos adultos. Por fim, o grupo Repetido adolescente apresentou maior locomoção do que o grupo Agudo adolescente, evidenciando expressão da sensibilização locomotora, efeito não observado nos animais adultos.

Figura 10 – Atividade locomotora total. **A)** Efeito da habituação e da administração repetida de salina ou cocaína na atividade locomotora total. Houve diminuição de atividade locomotora em H2 em ambas as idades (& $p < 0,01$ vs H1), e os adultos exibiram maior atividade locomotora (• $p < 0,05$ vs adolescentes). Os animais que receberam cocaína apresentaram maior atividade locomotora (* $p < 0,01$ vs Salina), sendo que o aumento em D8 foi maior do que em D1 (& $p < 0,01$ vs D1), e os adolescentes que receberam a droga apresentaram maior atividade locomotora (• $p < 0,05$ vs adultos). **B)** Efeito do desafio com salina ou cocaína sobre a atividade locomotora total em D20. Os animais desafiados com cocaína apresentaram maior atividade locomotora (* $p < 0,01$ vs Salina). Os adolescentes pré-tratados com cocaína apresentaram maior atividade locomotora (• $p < 0,05$ vs adultos pré-tratados com cocaína). A atividade locomotora do grupo Repetido adolescente foi maior que a do grupo Agudo adolescente (# $p < 0,05$ vs Agudo adolescente). Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio. Em H1 e H2, $n = 82-84$ /grupo. Em D1 e D8, $n = 41-42$ /grupo. Em D20, $n = 19-23$ /grupo.

4.1.2 Atividade locomotora central

Os animais apresentaram menor atividade locomotora central em H2, quando comparado a H1 [$F_{(1,164)} = 84,38$; $p < 0,01$].

A avaliação do efeito pré-tratamento [$F_{(1,161)} = 13,60$; $p < 0,01$], nos dias D1 e D8, revelou que os animais pré-tratados com cocaína apresentaram menor atividade locomotora central do que os pré-tratados com salina, demonstrando o efeito ansiogênico da droga. Também foi observado efeito do fator dias [$F_{(1,161)} = 11,52$; $p < 0,01$], com aumento da atividade locomotora central em D8 em comparação a D1.

Na análise do D20, foi observado efeito do fator desafio [$F_{(1,158)} = 4,17$; $p < 0,05$], com menor atividade locomotora central nos animais desafiados com cocaína em comparação aos desafiados com salina. A interação idade vs desafio [$F_{(1,158)} = 5,89$; $p < 0,05$] mostrou que os adolescentes desafiados com cocaína apresentaram diminuição de atividade locomotora central em comparação aos desafiados com salina, efeito não observado nos animais adultos.

Figura 11 – Atividade locomotora central. **A)** Efeito da administração repetida de salina ou cocaína na atividade locomotora central. Em D1 e D8, os animais que receberam cocaína apresentaram menor atividade locomotora na região central (* $p < 0,01$ vs Salina). Os animais apresentaram aumento da atividade locomotora central em D8 (& $p < 0,01$ vs D1). **B)** Efeito do desafio sobre a atividade locomotora central em D20. Os adolescentes desafiados com cocaína apresentaram diminuição de atividade locomotora central (* $p < 0,05$ vs adolescentes desafiados com cocaína). Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio. Em H1 e H2, $n=82-84$ /grupo. Em D1 e D8, $n=41-42$ /grupo. Em D20, $n=19-23$ /grupo.

4.2 Comportamento ansioso no labirinto em cruz elevado

Durante o período de abstinência, no décimo oitavo dia de tratamento, os animais foram avaliados no LCE. O tempo gasto nos braços abertos foi calculado como porcentagem do tempo total despendido em ambos os braços (Figura 12A).

A análise dos resultados obtidos no LCE mostrou efeito do fator idade para todas as variáveis: tempo nos braços abertos [$F_{(1,161)} = 4,91$; $p < 0,05$], número de entradas nos braços abertos [$F_{(1,162)} = 7,68$; $p < 0,01$] e nos fechados [$F_{(1,162)} = 4,55$; $p < 0,05$], e latência de entrada no braço aberto [$F_{(1,160)} = 5,67$; $p < 0,05$], sendo que os adultos apresentaram maior média de latência de entrada no braço aberto, enquanto os adolescentes apresentaram maior média de tempo nos braços abertos e de entradas nos braços abertos e nos fechados.

Também foi observado que os animais pré-tratados com cocaína gastaram menos tempo [$F_{(1,161)} = 5,09$; $p < 0,05$] e apresentaram menos entradas [$F_{(1,162)} = 15,37$; $p < 0,01$] nos braços abertos em comparação aos pré-tratados com salina. Em relação à latência de entrada no braço aberto [$F_{(1,160)} = 8,97$; $p < 0,01$], foi observado efeito oposto, isto é, aumento nos animais pré-tratados com cocaína abertos em comparação aos pré-tratados com salina. Além disso, a interação idade vs pré-tratamento [$F_{(1,160)} = 5,41$; $p < 0,05$] mostrou que os adultos pré-tratados com cocaína apresentaram maior latência de entrada no braço aberto do que os demais grupos.

Figura 12 – Labirinto em cruz elevado. **A)** Tempo despendido nos braços abertos do LCE. Os animais pré-tratados com cocaína gastaram menos tempo nos braços abertos (* $p < 0,05$ vs Salina). Os adolescentes despenderam mais tempo nos braços abertos (• $p < 0,05$ vs adultos). **B)** Latência de entrada no braço aberto do LCE. Os animais pré-tratados com cocaína apresentaram maior latência de entrada no braço aberto (* $p < 0,01$ vs Salina). Os adultos pré-tratados com cocaína apresentaram maior latência de entrada (• $p < 0,05$ vs Salina adulto, Salina e Cocaína adolescentes). **C)** Número de entradas nos braços abertos do LCE. Os animais pré-tratados com cocaína apresentaram menor número de entradas nos braços abertos (* $p < 0,01$ vs Salina). Os adolescentes apresentaram maior número de entradas nos braços abertos (• $p < 0,01$ vs adultos). **D)** Número de entradas nos braços fechados do LCE. Os adolescentes apresentaram maior número de entradas nos braços fechados (• $p < 0,05$ vs Adultos). Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio. $N=28-30$ /grupo.

4.3 Avaliação dos níveis proteicos por Western blotting e Ensaio de Atividade Enzimática

4.3.1 Fosforilação e níveis de GluR1 no córtex pré-frontal e hipocampo

A figura 13 mostra as bandas representativas do WB e a relação proteica pGluR1/GluR1 no CPF (A) e hipocampo (B) dos adultos e adolescentes. No CPF, foi observado efeito dos fatores idade [$F_{(1,49)} = 22,86$; $p < 0,01$] e pré-tratamento [$F_{(1,49)} = 8,56$; $p < 0,01$], e interação entre ambos [$F_{(1,49)} = 9,94$; $p < 0,01$], sendo que a média foi maior nos animais pré-tratados com cocaína em comparação ao pré-tratados com salina, bem como nos adolescentes em comparação aos adultos. Os adolescentes pré-tratados com cocaína apresentaram maior média do que todos os outros grupos. No hipocampo, observou-se efeito do pré-tratamento [$F_{(1,49)} = 8,50$; $p < 0,01$], sendo que os animais pré-tratados com cocaína apresentaram maior média do que os pré-tratados com salina.

A figura também mostra os níveis proteicos da subunidade GluR1 do receptor AMPA no CPF (C) e no hipocampo (D) dos adolescentes e adultos. Não foram encontradas diferenças significativas no CPF ($p > 0,05$). No hipocampo, observou-se efeito dos fatores idade [$F_{(1,49)} = 10,12$; $p < 0,01$], pré-tratamento [$F_{(1,49)} = 4,18$; $p < 0,05$] e interação entre ambos [$F_{(1,49)} = 14,29$; $p < 0,01$], sendo que os adultos pré-tratados com cocaína apresentaram menor média do que todos os outros grupos.

Figura 13 – Atividade da PKA. **A)** Atividade da PKA no córtex pré-frontal. Os adolescentes pré-tratados com cocaína apresentaram aumento de fosforilação de GluR1 ($p < 0,01$ vs pré-tratados com salina e vs adultos). **B)** Atividade da PKA no hipocampo. Os animais pré-tratados com cocaína apresentaram aumento de fosforilação de GluR1 ($p < 0,01$ vs pré-tratados com salina). **C)** Nível de GluR1 no córtex pré-frontal. **D)** Nível de GluR1 no hipocampo. Os adultos pré-tratados com cocaína apresentaram diminuição de GluR1 ($\#p < 0,01$ vs pré-tratados com salina e vs adolescentes). $N = 7-8$ animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.3.2 Correlações entre a atividade da PKA e a atividade locomotora

O teste de *Pearson* revelou uma correlação positiva entre a atividade locomotora do grupo Repetido em D20 e a fosforilação de GluR1 no CPF dos animais ($r=0,61$, $p=0,02$; fig. A), bem como uma correlação positiva entre a atividade locomotora do grupo Abstinência em D20 e a fosforilação de GluR1 no CPF dos animais ($r= 0,59$, $p= 0,03$; fig. B). Não foram encontradas correlações entre a atividade locomotora e a fosforilação de GluR1 no hipocampo dos animais dos grupos Repetido ($r= 0,45$, $p= 0,10$) e Abstinência ($r= 0,36$, $p= 0,18$).

Figura 14 – Correlação atividade PKA e atividade locomotora. **A)** Fosforilação de GluR1 no córtex pré-frontal e atividade locomotora do grupo Repetido em D20. Foi observada uma correlação positiva entre ambas ($p<0,05$). **B)** Fosforilação de GluR1 no córtex pré-frontal e atividade locomotora do grupo Abstinência em D20. Foi observada uma correlação positiva entre ambas ($p<0,05$). $N= 13-14$ animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.3.3 Fosforilação e níveis de CaMKII no córtex pré-frontal e hipocampo

A figura 15 mostra uma foto representativa do WB e a relação proteica pCaMKII/CaMKII no CPF (A) e hipocampo (B) dos camundongos adultos e adolescentes, e os níveis de CaMKII no CPF (C) e hipocampo (D) dos camundongos adultos e adolescentes. Não foram encontradas diferenças significativas no CPF ($p>0,05$). No hipocampo, observou-se efeito do fator idade [$F_{(1,49)} = 7,68$; $p<0,01$] e interação idade vs desafio [$F_{(1,49)} = 6,11$; $p<0,05$], sendo que os adultos desafiados com cocaína apresentaram aumento da fosforilação da CaMKII em comparação aos adolescentes desafiados com a droga.

Figura 15 – Fosforilação da CaMKII. **A)** Fosforilação de CaMKII no córtex pré-frontal. **B)** Fosforilação de CaMKII no hipocampo. Os adultos desafiados com cocaína apresentaram diminuição de fosforilação ($\bullet$ $p < 0,05$ vs adolescentes desafiados com cocaína). **C)** Nível de CaMKII no córtex pré-frontal. **D)** Nível de CaMKII no hipocampo. $N = 7-8$ animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.3.4 Fosforilação e níveis de CaMKIV no córtex pré-frontal e hipocampo

A figura 16 mostra uma foto representativa do WB e a relação proteica pCaMKIV/CaMKIV no CPF (A) e hipocampo (B) de camundongos adultos e adolescentes. No CPF, não foram observadas diferenças estatísticas ($p>0,05$) no nível de fosforilação da CaMKIV. No hipocampo, foi observada interação entre os fatores idade e desafio [$F_{(1,49)} = 6,24$; $p<0,05$], sendo que os adultos desafiados com cocaína apresentaram diminuição de fosforilação em comparação aos adolescentes desafiados com a droga.

A figura 16 também apresenta uma foto representativa do WB e o nível proteico de CaMKIV no CPF (C) e hipocampo (D) dos animais. Foi observado efeito do fator idade [$F_{(1,49)} = 8,58$; $p<0,01$] e interação idade x pré-tratamento [$F_{(1,49)} = 4,56$; $p<0,05$] no CPF dos animais, revelando que os animais adultos exibiram aumento de CaMKIV em comparação aos adolescentes, enquanto a análise da interação revelou que os adultos pré-tratados com cocaína apresentaram aumento de CaMKIV em comparação aos adolescentes pré-tratados com a droga. No hipocampo, a análise não mostrou diferenças significativas ($p>0,05$).

Figura 16 – Fosforilação da CaMKIV. **A)** Fosforilação da CaMKIV no córtex pré-frontal. **B)** Fosforilação da CaMKIV no hipocampo. Os adultos desafiados com cocaína apresentaram diminuição de fosforilação ($\bullet$ $p < 0,05$ vs adolescentes desafiados com cocaína). **C)** Nível de CaMKIV no córtex pré-frontal. Os adultos pré-tratados com cocaína apresentaram aumento de CaMKIV ($\bullet$ $p < 0,05$ vs adolescentes pré-tratados com cocaína). **D)** Nível de CaMKIV no hipocampo. $N = 7-8$ animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.3.5 Correlações entre os níveis de pCaMKIV e atividade locomotora

O teste de *Pearson* revelou uma correlação positiva entre a atividade locomotora do grupo Repetido em D20 e a fosforilação de CaMKIV no hipocampo dos animais ($r = 0,58$, $p = 0,03$). Não foram encontradas correlações entre a atividade locomotora e a fosforilação de CaMKIV no CPF dos animais do grupo Repetido ($r = -0,27$, $p = 0,35$), nem no CPF ($r = 0,03$, $p = 0,92$) e hipocampo ($r = 0,12$, $p = 0,67$) dos animais abstinentes.

Figura 17 – Correlação fosforilação CaMKIV e atividade locomotora. Fosforilação de CaMKIV no hipocampo e atividade locomotora do grupo Repetido em D20. Foi encontrada uma correlação positiva entre a atividade locomotora do grupo Repetido e a fosforilação de CaMKIV no hipocampo ($p < 0,05$). $N = 14$ animais. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.3.6 Níveis de CBP no córtex pré-frontal e hipocampo

A figura 18 mostra as bandas representativas do WB e os níveis de CBP no CPF (A) e hipocampo (B) dos camundongos adultos e adolescentes. No CPF, não houve alteração significativa entre os grupos ($p < 0,05$). No hipocampo, foi observado efeito do fator idade [$F_{(1,48)} = 19,96$; $p < 0,01$], apontando para maiores níveis de CBP no hipocampo dos adolescentes em comparação ao dos adultos, e interação entre idade vs pré-tratamento vs desafio [$F_{(1,48)} = 4,56$; $p < 0,05$], a qual mostrou que os adolescentes do grupo Agudo e do grupo Abstinência apresentaram maiores níveis de CBP em comparação aos adultos desses mesmos grupos. Levando-se em consideração o efeito do fator idade obtido, as médias dos animais do grupo

Repetido foram testadas por meio do teste-t, e o resultado mostrou que os adolescentes do grupo Repetido apresentaram aumento de CBP em comparação ao mesmo grupo adulto ($t=2,38$; $p=0,034$).

Figura 18 – Níveis proteicos de CBP. **A)** Níveis de CBP no córtex pré-frontal. **B)** Níveis de CBP no hipocampo. Os adolescentes dos grupos Agudo, Repetido e Abstinência apresentaram aumento de CBP (• $p<0,05$ vs adultos Agudo, Repetido e Abstinência, respectivamente). $N=7$ animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.3.7 Níveis proteicos de PDYN no córtex pré-frontal e hipocampo

A figura 19 mostra as bandas representativas do WB e os níveis de PDYN no CPF (A) e hipocampo (B) dos camundongos adultos e adolescentes. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no CPF e no hipocampo ($p>0,05$).

Figura 19 – Níveis proteicos de PDYN. **A)** Níveis de PDYN no córtex pré-frontal. Não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). **B)** Níveis de PDYN no hipocampo. Não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). $N = 7-8$ animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.3.8 Atividade da ERK no córtex pré-frontal e hipocampo

A figura 20 mostra as bandas representativas do WB e a atividade da ERK (fosforilação de pELK1) no CPF (A) e hipocampo (B) dos camundongos adultos e adolescentes. No CPF, foi observado efeito dos fatores idade [$F_{(1,49)} = 20,75$; $p < 0,01$] e pré-tratamento [$F_{(1,49)} = 6,85$; $p < 0,05$], e interação entre pré-tratamento e desafio [$F_{(1,49)} = 4,51$; $p < 0,05$]. A análise do fator idade revelou menor atividade da ERK nos adultos em comparação aos adolescentes, o fator pré-tratamento mostrou diminuição de atividade nos animais pré-tratados com cocaína, e a interação mostrou diminuição da atividade da ERK nos grupos Agudo, Repetido e Abstinência em comparação ao Controle. No hipocampo, houve efeito do fator idade [$F_{(1,49)} = 13,51$; $p < 0,01$], com diminuição da atividade da ERK nos adolescentes em comparação aos adultos; efeito do fator pré-tratamento [$F_{(1,49)} = 5,05$; $p < 0,05$], com diminuição nos animais pré-tratados com cocaína em comparação aos pré-tratados com salina; e a interação pré-tratamento vs desafio [$F_{(1,49)} = 14,30$; $p < 0,01$] mostrou que os adolescentes pré-tratados com cocaína apresentaram diminuição de atividade da ERK em comparação a todos os outros grupos.

Figura 20 – Atividade da ERK. **A)** Atividade da ERK no córtex pré-frontal. Os grupos Agudo, Repetido e Abstinência apresentaram diminuição de atividade da ERK (* $p < 0,05$ vs Controle); os adultos apresentaram diminuição de atividade da ERK (• $p < 0,01$ vs adolescentes). **B)** Atividade da ERK no hipocampo. Os adolescentes pré-tratados com cocaína apresentaram diminuição de atividade da ERK (& $p < 0,01$ vs todos os grupos). N= 7-8 animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.3.9 Correlações entre a atividade da ERK e a atividade locomotora

O teste de *Pearson* revelou uma correlação negativa entre a atividade locomotora do grupo Abstinência, em D20, e a fosforilação de ELK1 no hipocampo dos animais ($r = -0,58$, $p = 0,03$). Não foram encontradas correlações entre a atividade locomotora e a fosforilação de ELK1 no CPF dos animais do grupo Repetido ($r = -0,34$, $p = 0,23$) e Abstinência ($r = 0,05$, $p = 0,87$), nem no hipocampo dos animais abstinentes ($r = 0,04$, $p = 0,89$).

Figura 21 – Correlação atividade ERK e atividade locomotora. Atividade da ERK no hipocampo e atividade locomotora do grupo Abstinência em D20. Foi encontrada uma correlação negativa entre a atividade locomotora do grupo Abstinência e a atividade da ERK no hipocampo ($p < 0,05$). $N = 14$ animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.4 Avaliação da expressão de RNAm por qPCR

4.4.1 Expressão de Icer no córtex pré-frontal e hipocampo

A figura 22 mostra a expressão de Icer no CPF (A) e hipocampo (B) dos camundongos adultos e adolescentes. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no CPF e no hipocampo ($p > 0,05$). No entanto, as interações idade vs pré-tratamento no CPF e pré-tratamento vs desafio no hipocampo apresentaram indícios de significância estatística: [$F_{(1,48)} = 3,82$; $p = 0,056$] e [$F_{(1,48)} = 3,89$; $p = 0,054$], respectivamente; desta forma, foram realizados testes-t para avaliar a diferença entre os grupos em comparação ao Controle. No CPF, o resultado mostrou aumento da expressão de Icer no grupo Agudo adolescente em comparação ao Controle ($t = 2,32$; $p = 0,044$). No hipocampo, houve diminuição da expressão de Icer no grupo Abstinência adolescente ($t = 4,72$; $p = 0,0005$) e no grupo Agudo adulto ($t = 3,50$; $p = 0,004$) em comparação ao Controle.

Figura 22 – Expressão mRNA Icer. **A)** Expressão de Icer no córtex pré-frontal. O grupo Agudo adolescente apresentou aumento da expressão (* $p < 0,05$ vs Controle). **B)** Expressão de Icer no hipocampo. Houve diminuição da expressão no grupo Abstinência adolescente e no grupo Agudo adulto (* $p < 0,001$ vs Controle). $N = 7$ animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.4.2 Expressão de Cbp no córtex pré-frontal e hipocampo

A figura 23 mostra a expressão de Cbp no CPF (A) e hipocampo (B) de camundongos adultos e adolescentes. No CPF, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. No hipocampo, observou-se efeito do fator idade [$F_{(1,49)} = 10,68$; $p < 0,01$], no qual os adolescentes apresentaram aumento da expressão de Cbp em comparação aos adultos.

Figura 23 – Expressão mRNA Cbp. **A)** Expressão de Cbp no córtex pré-frontal. Não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). **B)** Expressão de Cbp no hipocampo. Os adolescentes

apresentaram aumento de Cbp em comparação aos adultos ($\bullet p < 0,01$ vs Adultos). N= 7-8 animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

4.4.3 Expressão de Pdyn no córtex pré-frontal e hipocampo

A figura 24 mostra a expressão de Pdyn no CPF (A) e hipocampo (B) dos camundongos adultos e adolescentes. No CPF, foi observado efeito do fator idade [$F_{(1,48)} = 9,00$; $p < 0,01$], com aumento da expressão de Pdyn nos adolescentes em comparação aos adultos, e interação entre idade e desafio [$F_{(1,48)} = 5,07$; $p < 0,05$], a qual mostrou que os grupos Agudo e Repetido adolescentes apresentaram aumento da expressão de Pdyn em comparação a todos os outros grupos. No hipocampo, foi observada a interação pré-tratamento vs desafio [$F_{(1,48)} = 4,93$; $p < 0,05$], a qual mostrou diminuição de Pdyn no grupo Repetido em comparação ao grupo Agudo.

Figura 24 – Expressão mRNA Pdyn. **A)** Expressão de Pdyn no córtex pré-frontal. Os adolescentes Agudo e Repetido apresentaram aumento de expressão de Pdyn (& $p < 0,05$ vs todos os grupos). **B)** Expressão de Pdyn no hipocampo. Diminuição de Pdyn no grupo Repetido adolescente e adulto (# $p < 0,05$ vs grupo Agudo). N= 7 animais/grupo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão médio.

5. DISCUSSÃO

5.1 Diferenças comportamentais entre os animais adolescentes e adultos em resposta à cocaína

5.1.1 Sensibilização psicomotora

A exposição a um ambiente novo e não familiar (novidade) pode gerar aumento de atividade exploratória e comportamento ansioso induzido por estresse nos animais, impactando nos resultados de atividade locomotora (Allan et al., 2007; Dunne et al., 2007). Por outro lado, uma única exposição breve ao ambiente de teste pode induzir uma inibição comportamental (Carey et al., 1998; Schiltein et al., 2002) e atenuar os efeitos locomotores induzidos pela novidade. De fato, uma dose da droga capaz de provocar estimulação locomotora em um ambiente de teste gera uma estimulação substancialmente menor quando administrada após familiarização dos animais com o mesmo (Carey et al., 2005; Kiyatkin, 1992). Por esse motivo, neste trabalho, os animais receberam uma injeção de salina e foram submetidos ao CA por dois dias, antes do início dos testes. Houve diminuição da atividade locomotora em H2 comparada a H1, sugerindo habituação ao aparato em ambas as idades, e minimizando as interferências induzidas pela novidade sobre os resultados de locomoção.

A exposição inicial a um psicoestimulante, como a cocaína, induz o aumento do efeito estimulante locomotor à administração subsequente da droga por meio de alterações plásticas moleculares, celulares e comportamentais duradouras que se assemelham a certas características relacionadas à dependência em humanos, fenômeno conhecido como sensibilização psicomotora (Robinson, Berridge, 2003; Steketee, Kalivas, 2011; Vanderschuren, Kalivas, 2000). O processo de sensibilização psicomotora inclui duas fases distintas: a iniciação e a expressão. A fase da iniciação refere-se ao período no qual se observa o aumento da resposta comportamental após a administração diária de cocaína, acompanhado do aumento da concentração extracelular de dopamina. No entanto, após cessar o consumo do psicoestimulante, a sensibilização psicomotora não é interrompida e tende a aumentar, levando à sensibilização de longo prazo, que caracteriza a fase da expressão. Nessa fase, há uma hiper-responsividade persistente à droga, decorrente de neuroadaptações duradouras (Kalivas, Duffy, 1990; Robinson,

Berridge, 1993; Steketee, Kalivas, 2011; Thomas et al., 2001; Vanderschuren, Kalivas, 2000).

Neste trabalho, embora os animais de ambas as idades tenham exibido sensibilização psicomotora na fase da iniciação (aumento da atividade locomotora em D8 comparada a D1), somente os adolescentes expressaram esse efeito quando desafiados com cocaína após o período de abstinência (D20). Esse resultado sugere que os adolescentes foram mais suscetíveis às neuroadaptações promovidas pela cocaína, quando comparados aos animais adultos. Alterações moleculares encontradas neste trabalho, como a diminuição de marcadores de neuroplasticidade observada no hipocampo dos animais adultos e o aumento da atividade da PKA no CPF dos adolescentes, parecem permear esse comportamento e serão discutidas mais adiante.

Os animais adolescentes também apresentaram uma atividade locomotora aumentada em resposta aos efeitos estimulantes da cocaína quando comparados aos adultos.

Diferenças comportamentais e neuroquímicas entre adultos e adolescentes em resposta à administração de psicoestimulantes têm sido relatadas por diversos autores (Collins, Izenwasser, 2002; Ehrlich et al., 2002; Frantz et al., 2007; Laviola et al., 1995; Philpot, Kirstein, 1999; Stansfield, Kirstein, 2005), no entanto, há divergências quanto aos efeitos observados. Por exemplo, enquanto alguns trabalhos mostram que roedores adolescentes e periadolescentes apresentam sensibilidade reduzida à ativação locomotora da cocaína e anfetamina (Bolanos et al., 1998; Laviola et al., 1995; Maldonado, Kirstein 2005; Mathews et al., 2009; Mathews, McCormick 2007), outros mostram uma maior estimulação nesse grupo em comparação aos adultos, especialmente na administração de cocaína (Badanich et al., 2008; Caster et al., 2007; Catlow, Kirstein 2005).

O mesmo ocorre com os estudos de sensibilização, por exemplo, alguns trabalhos mostram sensibilização aos efeitos locomotores de psicoestimulantes em roedores adolescentes e adultos (Kameda et al., 2011; Laviola et al., 1995), enquanto outros mostram ausência desse efeito em uma das idades (Camarini et al., 2008; Collins, Izenwasser, 2002; Guerriero et al., 2006). Essas divergências podem decorrer de variações na dose ou tempo de administração da droga, da espécie ou linhagem utilizadas, dentre outros fatores; mas, também demonstram a existência de diferenças comportamentais entre as idades.

Diferenças individuais de sensibilidade à experiência inicial com drogas psicoativas estão relacionadas ao risco de dependência (Davidson et al., 1993; Foltin, Fischman, 1991; Lambert et al., 2006). Apesar de alguns estudos sugerirem que uma baixa resposta locomotora inicial esteja associada ao aumento do comportamento relacionado à droga (por exemplo, aumento da sensibilização psicomotora e da preferência condicionada), ratos com alta resposta locomotora à cocaína obtiveram mais infusões durante a autoadministração do que os que apresentaram baixa resposta locomotora (Schramm-Sapyta et al., 2011).

As variações neuroquímicas que contribuem para as diferenças comportamentais entre adultos e adolescentes não são totalmente conhecidas, no entanto, alguns estudos propõem que elas sejam mediadas primariamente por um diferente grau de maturação nos sistemas dopaminérgicos cerebrais (Kalsbeek et al., 1988; Shalaby et al., 1981; Spear, Brake, 1983). 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 do neurotransmissor poderia refletir uma combinação do efeito da droga somado à expectativa induzida por ela (Philpot, Kirstein, 1999). Assim, o aumento da resposta locomotora exibida pelos adolescentes neste trabalho poderia estar relacionado a um maior nível de dopamina e ao aumento da expectativa pela droga.

A maior resposta locomotora dos adolescentes também pode estar relacionada a um maior condicionamento desse grupo. 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). Resultados anteriores deste laboratório mostraram que os animais adolescentes submetidos ao mesmo protocolo experimental deste trabalho apresentaram aumento de atividade locomotora após uma injeção de salina em D9, o que parece ser o resultado da associação entre o EC (exposição ao campo-aberto) com o ENC (cocaína) (Valzachi et al., 2013). Os animais previamente tratados com cocaína e expostos ao campo-aberto apresentaram um aumento da atividade locomotora quando reexpostos ao mesmo ambiente sob o efeito da salina. Esse resultado sugere uma maior capacidade de associação dos efeitos da droga ao ambiente por parte dos animais adolescentes, o que poderia estar relacionado ao aumento da sensibilização psicomotora nesse

grupo, já que diversos estudos têm demonstrado o envolvimento de um forte componente contexto-dependente na sensibilização comportamental (Kalivas e Alesdatter, 1993; 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).

5.1.2 Comportamento tipo-ansiedade

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 (Bouwknicht, Paylor, 2002; Griebel et al., 2000; Kopp et al., 1999; Tang et al., 2002; Yilmazer-Hanke et al., 2003). Outros estudos mostraram que os animais heterogênicos da linhagem *Swiss* apresentam diferentes níveis de estresse, ansiedade e comportamento defensivo quando comparados a linhagens isogênicas (Van Bogaert et al., 2006; Yang et al., 2004). No entanto, essas variações podem ser observadas dentro de uma mesma linhagem, dependendo de fatores como idade, gênero e estímulo usado (Bush, Vaccarino, 2007; Moore et al., 2011; Schramm-Sapota et al., 2011).

A organização espacial da locomoção dos animais é um parâmetro de grande importância no estudo dos efeitos de psicoestimulantes. De modo geral, os roedores apresentam maior locomoção periférica (próxima às paredes do CA) e evitam a área central (Eilam, 2003; Groenink et al., 2003; Paulus et al., 1999; Wang et al., 2003). A diminuição da atividade locomotora na região central do CA está associada à ansiogênese, enquanto o oposto (aumento) representa um efeito ansiolítico (Prut, Belzung, 2003). Neste trabalho, os animais que receberam cocaína em D1 e D8 apresentaram menor locomoção na região central do CA do que aqueles que receberam salina, demonstrando o efeito ansiogênico da droga. No entanto, em D20, somente os adolescentes desafiados com cocaína exibiram diminuição da locomoção central, sugerindo um maior comportamento ansioso por esse grupo em resposta à administração da droga.

O LCE tem sido usado como um teste simples para medir o comportamento ansioso de roedores e avaliar drogas ansiogênicas e ansiolíticas. Esse teste explora

a aversão gerada no animal pelo medo e ansiedade induzidos pela altura e por espaços abertos, quando colocado em um aparato elevado que possui braços abertos. Drogas ansiogênicas reduzem o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos, enquanto drogas ansiolíticas geram efeito oposto (Pellow et al., 1985). Os camundongos foram submetidos ao LCE durante o período final da abstinência, e foi observada diminuição do número de entradas e do tempo gasto nos braços abertos pelos animais pré-tratados com cocaína em comparação aos pré-tratados com salina, além de aumento da latência de entrada nesses braços, refletindo o efeito ansiogênico da droga.

Os adolescentes apresentaram menor latência de entrada no braço aberto em comparação aos adultos, o que parece refletir o maior comportamento exploratório daquele grupo. De fato, os adolescentes apresentaram aumento geral do tempo gasto nos braços abertos e do número de entradas nos braços abertos e fechados do LCE em comparação aos adultos. Esses resultados apontam para uma maior atividade exploratória dos animais adolescentes.

O aumento da atividade exploratória observado neste trabalho parece refletir as alterações comportamentais da adolescência. Em comparação a indivíduos de outras faixas etárias, os adolescentes exibem um aumento desproporcional do comportamento imprudente, procura por sensações e atividades de risco. Embora essas manifestações tenham um propósito biológico importante, preparando o indivíduo para a vida adulta, elas carregam um potencial para desfechos negativos, como o abuso de drogas. De fato, altos níveis de busca por novidades e sensações são preditores poderosos do uso de drogas (Spear, 2000).

A busca por novidades nos animais pode ser definida como a exploração específica de situações novas e objetos ou estímulos desconhecidos. Diversos estudos demonstraram a relação entre atividade locomotora e comportamento exploratório induzidos pela novidade, comportamentos de risco e consumo de drogas em animais, e verificaram que características desse fenótipo são homólogas a peculiaridades do comportamento de risco e impulsividade exibidos por humanos que apresentam maior vulnerabilidade ao abuso de drogas. Duas abordagens são usadas para modelar a busca por novidades nos animais: a atividade locomotora induzida pela novidade (aumento da atividade locomotora em um novo ambiente, onde o animal não pode escapar), e a preferência por novidade (alta propensão para explorar a novidade, em um paradigma de livre escolha) (Arenas et al., 2014).

De fato, um estudo mostrou que a atividade locomotora induzida pela novidade tem uma grande capacidade de identificar indivíduos vulneráveis às drogas. O trabalho mostrou que entre os camundongos jovens-adultos (PND 56), os sujeitos altamente responsivos à novidade (que apresentaram maior atividade locomotora nos primeiros 10 min do teste de responsividade à novidade) foram 3,9 vezes mais suscetíveis a desenvolverem CPP induzida por cocaína em comparação aos que exibiram baixa responsividade à novidade (Arenas et al., 2014).

Um dos principais desafios no estudo das drogas é identificar os fatores que predispõem os indivíduos à dependência, com o objetivo de desenvolver tratamentos mais específicos para essa desordem e estratégias de prevenção adequadas. Os resultados obtidos a partir do campo-aberto e do LCE demonstraram que tanto adultos quanto adolescentes exibem comportamento tipo-ansiedade em resposta à administração de cocaína, bem como durante a abstinência. No entanto, quando estão sob o efeito da droga (na administração aguda e repetida), os animais adolescentes parecem ser mais suscetíveis aos efeitos ansiogênicos desse psicoestimulante do que os adultos. Por fim, resumindo os resultados comportamentais, observamos que os adolescentes apresentaram maior atividade locomotora e sensibilização psicomotora em resposta à cocaína e maior atividade exploratória quando comparados aos adultos; os testes de ansiedade, por sua vez, confirmaram o efeito ansiogênico do psicoestimulante em ambas as idades e apontaram para uma maior suscetibilidade dos adolescentes aos efeitos ansiogênicos induzidos pela administração da droga.

5.2 Atividade das vias moleculares envolvidas na modulação do CREB em animais expostos à cocaína na fase adulta ou na adolescência

As manifestações comportamentais provocadas pela administração aguda e repetida da cocaína, bem como pela sua abstinência, são o reflexo das alterações moleculares induzidas pela droga. A exposição repetida a psicoestimulantes altera a expressão de vários fatores de transcrição, sendo o CREB um dos principais envolvidos nos processos da dependência. A administração de drogas promove a ativação dessa proteína, via fosforilação, em áreas do circuito motivacional (Walters et al., 2003; Yamamoto et al., 1988), levando a algumas características comuns encontradas na adição. 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.

Um dos principais objetivos da pesquisa neurobiológica é entender as alterações que ocorrem no nível molecular, celular e nos neurocircuitos que medeiam a transição do uso controlado, ocasional, de substâncias para a perda de controle do consumo e dependência (Koob, Volkow, 2010). Resultados anteriores deste laboratório mostraram que camundongos adultos e adolescentes exibiram diferentes níveis proteicos de CREB e pCREB no CPF e hipocampo em resposta à cocaína, quando submetidos ao mesmo protocolo adotado neste trabalho (Valzachi et al., 2013). O estudo revelou aumento de CREB e pCREB no CPF dos animais de ambas as idades após administração aguda da droga, mas somente os adolescentes apresentaram aumento de CREB no CPF e hipocampo durante a abstinência, bem como diminuição dessas proteínas no hipocampo após doses repetidas do psicoestimulante. Para investigar as origens dessas diferenças, o presente trabalho analisou as vias que levam à ativação desse fator de transcrição.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que adultos e adolescentes apresentaram respostas muito diferentes tanto na administração aguda e repetida da cocaína, quanto na abstinência da droga. Enquanto os adolescentes exibiram aumento da atividade da via da PKA e da expressão de Icer, CBP e Pdyn; os adultos apresentaram diminuição de CaMKs, GluR1 e Icer. Essas diferentes respostas neuroadaptativas podem ajudar na compreensão dos mecanismos que fazem com que a adolescência seja considerada um grupo de risco para a dependência.

Analisando-se os dados deste trabalho, conjuntamente com os resultados de CREB e pCREB obtidos em trabalho anterior (Valzachi et al., 2013), alguns pontos podem ser destacados. Enquanto os níveis de CREB e pCREB dos adolescentes parecem ser influenciados principalmente pela atividade da PKA, não parece haver correspondência entre a modulação do CREB e a atividade dessa quinase nos animais adultos, nos quais as vias da ERK e CaMK II e IV parecem predominar. Além disso, a expressão da Icer parece exercer importante influência sobre a modulação observada nos adolescentes, e a expressão de Pdyn fornece respostas sobre a atividade do CREB nesse grupo. As figuras 25A e 26A apresentam os principais resultados observados no CPF dos animais adolescentes e adultos, respectivamente, após administração aguda, repetida e abstinência de cocaína;

enquanto as figuras 25B e 26B apresentam os principais resultados observados no hipocampo desses animais.

Figura 25 – Modulação do CREB nos adolescentes. **A)** Principais resultados observados nas vias que modulam o CREB no CPF dos animais adolescentes após administração aguda, repetida e abstinência de cocaína, respectivamente. **B)** Principais resultados observados nas vias que modulam o CREB no hipocampo dos animais adolescentes após administração aguda, repetida e abstinência de cocaína, respectivamente. *Valzachi et al., 2013.

Figura 26 – Modulação do CREB nos adultos. **A)** Principais resultados observados nas vias que modulam o CREB no CPF dos animais adultos após administração aguda, repetida e abstinência de cocaína, respectivamente. **B)** Principais resultados observados nas vias que

modulam o CREB no hipocampo dos animais adultos após administração aguda, repetida e abstinência de cocaína, respectivamente. *Valzachi et al., 2013.

Em Valzachi et al., (2013), foi observado aumento de CREB e pCREB após administração aguda de cocaína no CPF dos adolescentes. No presente trabalho, vimos que essa ativação na administração aguda da droga foi acompanhada por aumento da expressão de Pdyn, a qual é fortemente dependente do CREB. Diversos elementos foram identificados na região promotora da Pdyn; no entanto, existem quatro sítios CRE que são considerados os mais importantes, talvez sendo responsáveis pela regulação da expressão da Pdyn dependente de excitação (Schwarzer, 2009). De fato, a superexpressão do CREB no NAc levou ao aumento da expressão de Dyn, enquanto a subexpressão levou a uma diminuição, sendo portanto, um forte indicador da atividade do CREB (Carlezon et al., 1998). Dessa forma, o aumento da expressão de Pdyn encontrado neste trabalho parece ser resultante da ativação do CREB. Também pudemos observar que o aumento da Pdyn persistiu após injeções repetidas de cocaína, mesmo na ausência de aumento do seu fator de transcrição. Esse resultado parece refletir uma modulação de longo prazo característica da Pdyn (Knoll et al., 2011).

A ativação do CREB também levou ao aumento da expressão do seu repressor endógeno, Icer, no CPF dos adolescentes. A transcrição desse gene tem início após a ligação do pCREB ao promotor P2 do CREM. Após atingir certa concentração, a ICER inicia a supressão da expressão gênica mediada por CRE, incluindo a sua própria expressão, pela formação de homodímeros de ICER ou heterodímeros ICER-CREB que se ligam aos sítios CRE, bloqueando a transcrição (Borlikova, Endo, 2009). Portanto, o aumento desse inibidor, encontrado neste trabalho, parece ser um mecanismo de retroalimentação negativa decorrente da ativação do CREB. De fato, após administrações repetidas da droga, o aumento da atividade do CREB deixa de ser observado, o que pode ser decorrente da inibição promovida pela Icer. Paralelamente, a ausência de aumento da expressão do inibidor nesse estágio poderia explicar a nova elevação dos níveis de CREB na abstinência (Figura 25A).

Com relação às vias que modulam o CREB, foi observada uma diminuição da atividade da ERK, acompanhada de um aumento da atividade da PKA no CPF dos adolescentes após administração repetida e na abstinência da droga. A ERK é amplamente expressa no cérebro, em especial no circuito mesocorticolímbico, e

resultados de CPP e sensibilização psicomotora apontam para a participação dessa quinase nas neuroadaptações induzidas por drogas (Zhai et al., 2008). Substâncias psicoativas levam ao aumento da fosforilação dessa proteína em diversas regiões cerebrais envolvidas na adição, inclusive no córtex pré-frontal (Valjent et al., 2004).

Observando-se as figuras 25A e 26A, vemos diminuição da atividade da ERK no CPF de todos os grupos estudados e aumento da atividade da PKA no CPF dos adolescentes após administrações sucessivas da droga e na abstinência. Esses resultados sugerem que as vias envolvidas na ativação do CREB respondem de forma diferente a uma dose aguda, a doses repetidas ou à abstinência da droga, além de apontarem para um possível efeito de temporalidade.

As cascatas de sinalização que participam dos processos de dependência podem sofrer alteração rapidamente. Mattson et al. (2005) observaram diferenças na atividade das vias do CREB em resposta a uma dose aguda de cocaína ao fazerem a análise em dois tempos diferentes: 10 e 20 min após a injeção. Foi observado, por exemplo, aumento de fosforilação da CaMKII e ERK no NAc 10 min após a administração, mas não após 20 min. Ou seja, em apenas 10 min houve diferenças significativas. Sendo assim, pode-se propor uma hipótese de transição da sinalização entre ERK e PKA, baseada na temporalidade, para explicar os resultados observados.

É possível que a ERK tenha sido ativada imediatamente após a dose aguda da droga, o que explicaria o aumento de pCREB exibido pelos animais; porém, uma hora após a administração (momento da observação do efeito agudo neste trabalho) essa ativação inicial teria deixado de ocorrer, dando lugar a uma diminuição de atividade. Como todos esses fatores foram avaliados após 1 hora da administração da droga, o que se observa são fenômenos neuroplásticos que estão ocorrendo naquele momento. Após doses repetidas do psicoestimulante, inferimos que a atividade da ERK não se sustenta, mas o aumento da PKA é um efeito prolongado, uma vez que foi observado mesmo após 12 dias de abstinência. Esse aumento da atividade da PKA também foi observado no córtex pré-frontal de ratos após tratamento crônico e agudo com cocaína (Edwards et al., 2007).

Edwards et al., (2007) analisaram os níveis proteicos de pERK em nove regiões cerebrais de ratos envolvidas na dependência, incluindo CPF e hipocampo, após administração crônica e aguda de cocaína. Foi observado aumento da fosforilação da ERK (em comparação ao controle) em todas as estruturas, exceto no

CPF, córtex pré-motor e na sub-região CA3 do hipocampo, sendo que nesta última ocorreu diminuição. E, embora muitas consequências de longo prazo da atividade da ERK sejam decorrentes da fosforilação do CREB, somente o NAc e os núcleos central e basolateral da amígdala exibiram aumento de pCREB em comparação ao controle; indicando, portanto, uma dissociação entre a atividade da quinase e a ativação do fator de transcrição. O autor sugere que esse efeito possa ser decorrente de uma rápida dessensibilização ou taquifilaxia durante a administração da droga, a qual foi realizada por via intravenosa, durante 4 h.

De fato, estudos apontam para uma diminuição da atividade da ERK no começo da abstinência (Miszkiel et al., 2014; Whitfield et al., 2011); além disso, um trabalho recente sugeriu haver uma transição na sinalização do CPF dorsomedial durante a abstinência de cocaína, que dependeria inicialmente da ERK, e posteriormente, da PKA (Sun et al., 2013).

Pela figura 25B, podemos observar que essa transição de sinalização ERK-PKA parece não ter ocorrido no hipocampo dos adolescentes, pois embora a atividade da PKA tenha aumentado após administrações repetidas de cocaína, a diminuição da atividade da ERK parece estar determinando a redução dos níveis de CREB e pCREB nos adolescentes. Essa diminuição da atividade do CREB, relatada por Valzachi et al., (2013), também foi acompanhada pela diminuição de Pdyn, reforçando o resultado observado. Na abstinência, observou-se também uma menor expressão de Icer no hipocampo dos adolescentes, a qual parece ter reduzido a inibição sobre o CREB, permitindo o aumento de sua expressão. Também foi observado um aumento persistente da expressão gênica e dos níveis proteicos de CBP no hipocampo dos adolescentes, tanto na administração aguda e repetida da droga, quanto na abstinência. Embora esse aumento não tenha acompanhado a atividade do CREB, ele pode estar relacionado a outros mecanismos envolvidos na dependência, como veremos adiante.

Com base nos resultados observados, a PKA, ERK e Icer parecem ser os principais determinantes da atividade do CREB no CPF e hipocampo dos adolescentes. Essas respostas são bem distintas das exibidas pelos adultos, os quais apresentaram diminuição da atividade da ERK mais pronunciada que os adolescentes no CPF, no entanto, sem o aumento da atividade da PKA, nem da expressão de Pdyn ou Icer. Após administrações repetidas da droga, os adultos exibiram aumento de CaMKIV no CPF e da atividade da PKA no hipocampo. Além

disso, este grupo apresentou diminuição da expressão de Icer e da atividade das vias da CaMKII e CaMKIV no hipocampo após administração aguda da droga. A diminuição de atividade dessas vias persistiu após doses repetidas da droga, e foi acompanhada pela diminuição da subunidade GluR1 do receptor AMPA.

Desta forma, as vias moleculares de adultos e adolescentes apresentaram diferenças marcantes em resposta à cocaína. As respostas exibidas por essas vias são importantes não somente por modularem a atividade do CREB, mas por participarem de diversos outros mecanismos envolvidos na dependência, como veremos a seguir.

5.3 Alterações moleculares em resposta à cocaína e sua relação com a plasticidade sináptica e comportamentos relacionados à droga

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 (Berke, Hyman, 2000; Hyman, Malenka, 2001; White, 1998). Embora essa teoria não seja capaz de explicar completamente a natureza compulsiva da adição (Robinson, 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, 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 exibiram excitação autonômica quando expostos a estímulos pareados à cocaína (Avants et al., 1995; Ehrman et al., 1992).

O sistema dopaminérgico tem importante atuação nos processos e funções do aprendizado e da memória, tais como a recompensa, atenção e medo (Beninger, Miller, 1998; Cole, Robbins, 1989; Granon et al., 2000; Nader, LeDoux, 1999). Psicoestimulantes, em geral, atuam no sentido de aumentar a consolidação da memória, facilitando até mesmo 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, McGaugh, 1969; Wyvell, Berridge, 2001). Alguns estudos

também mostraram que a atividade do receptor dopaminérgico D1 no CPF pode influenciar o armazenamento da memória de longo prazo (Floresco, Phillips, 2001; Runyan, Dash, 2004).

A plasticidade sináptica pode ser dividida em duas formas temporariamente distintas: uma forma curta, que dura minutos e depende de modificações covalentes de proteínas e do reforço de conexões preexistentes; e a de longo prazo, que pode durar dias ou semanas e requer síntese proteica e o estabelecimento de novas conexões sinápticas (Kandel, 2001). Muitos estudos mostraram que as drogas induzem potenciação de longo prazo (LTP) em regiões cerebrais envolvidas na adição, como AVT e NAc (Kauer, Malenka, 2007). Pelas figuras 25 e 26, é possível observar que adultos e adolescentes apresentam padrões distintos de respostas neuroplásticas.

A transmissão sináptica excitatória glutamatérgica é fundamental para as neuroadaptações induzidas pelas drogas no circuito mesolímbico dopaminérgico (ver Figura 1). Os receptores glutamatérgicos são divididos em dois grandes grupos: os ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs). Os mGluRs são acoplados a proteínas G e participam dos mecanismos de resposta intracelular através da ativação de segundos mensageiros. Por esse motivo, são responsáveis pela geração de respostas pós-sinápticas mais lentas. Os iGluRs, por sua vez, podem ser de três tipos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino- 3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionico (AMPA) e cainato (KA). Todos eles agregam, no mesmo complexo proteico transmembrana, sítios de recepção ao ligante e canal iônico. Assim, a neurotransmissão mediada pelos iGluRs é rápida, pois afeta diretamente o fluxo de íons (principalmente Na^+ e Ca^{2+}) e, conseqüentemente, o estado eletroquímico da membrana pós-sináptica. Existem vários subtipos de NMDA, AMPA e KA, classificados conforme as diferentes combinações das subunidades proteicas que os formam. De acordo com a combinação destas subunidades, os receptores possuem maior ou menor permeabilidade ao influxo de íons e, portanto, funcionalidades distintas (Ruggiero et al., 2011).

Os AMPARs são compostos por quatro subunidades proteicas (GluR1-R4) que podem se agrupar de formas diferentes. Em condições basais, os complexos são geralmente formados pela junção de GluR2 com GluR1 ou GluR3. No entanto, após a indução da LTP, ocorre uma inserção na membrana de AMPARs que não possuem GluR2 (isto é, receptores do tipo GluR1/GluR1 ou GluR1/GluR3). Estes

apresentam maior condutância, permeabilidade ao cálcio e podem, portanto, disparar as cascatas de sinalização intracelulares dependentes de cálcio e levar ao fortalecimento das sinapses, potencializando a resposta aos estímulos (Bowers et al., 2010).

A CaMKII, por sua vez, é responsável pela fosforilação de substratos envolvidos tanto na regulação homeostática da célula como em respostas comportamentais e funções cognitivas complexas, incluindo aprendizado e memória, pois existem fortes evidências apontando para a sua participação no estágio inicial da LTP. Como revisado em Lisman et al., (2012), esse processo tem início com a ativação da CaMKII e sua posterior ligação ao receptor NMDA, o que favorece a aproximação e subsequente fosforilação do sítio GluR1 do receptor AMPA pela quinase. Como resultado, há aumento da condutância dos receptores AMPA e recrutamento de mais receptores para a sinapse. Dessa forma, a transmissão sináptica é ampliada por meio de um processo enzimático, pois embora a duração dessa ação possa ser de apenas alguns minutos, as consequências da atividade enzimática da CaMKII podem perdurar por longo período, já que a desfosforilação dos substratos requer tempo.

Além disso, a CaMKII apresenta peculiaridades que lhe atribuem a denominação de quinase cognitiva. A enzima tem diferentes formas de autofosforilação em diversos sítios, e cada uma de suas subunidades apresenta um domínio catalítico, um autorregulatório e um de associação. A autofosforilação da thr286 é estimulada pela ligação do cálcio à calmodulina, a qual traz consequências importantes, como a geração de atividade independente dessa estimulação (uma vez que o domínio autoinibitório da quinase é desabilitado, fazendo com que a enzima torne-se autônoma em relação ao seu estímulo normal) e o aumento de sua afinidade pela CaCaM em cerca de mil vezes, o que confere um tipo de memória molecular à enzima (Hudmon, Schulman 2002).

Dessa forma, a diminuição da subunidade GluR1 do receptor AMPA, bem como a diminuição de pCaMKII observadas no hipocampo dos adultos poderiam estar relacionadas a uma menor indução de LTP, um componente essencial no aprendizado aberrante e no condicionamento da droga ao ambiente, por exemplo.

De fato, Liu et al., (2014) mostraram que a administração do inibidor da CaMKII, tatCN21, na área ventral tegmental de roedores, levou ao bloqueio da aquisição da preferência condicionada de lugar somente quando as microinjeções

foram antes das sessões de condicionamento com cocaína, sem efeito significativo quando as administrações foram feitas antes das sessões de condicionamento com salina, sugerindo que o inibidor bloqueou a CPP por meio do rompimento seletivo do aprendizado associativo entre a droga e os sinais/ambiente, durante a janela do condicionamento com cocaína.

Neste trabalho, os animais do grupo Abstinência foram desafiados com uma injeção de salina e submetidos ao CA em D20, e observou-se uma correlação positiva entre os níveis de GluR1 e a atividade locomotora durante a abstinência, isto é, quanto maior o nível de GluR1, maior a atividade locomotora no CA, e vice-versa. O aumento da atividade locomotora durante a abstinência pode estar relacionado a um efeito de associação da droga ao ambiente, isto é, ao serem reexpostos ao ambiente em que receberam a droga, os animais apresentam aumento de atividade locomotora, mesmo na ausência do psicoestimulante. Dessa forma, o aumento de GluR1 estaria relacionado a um maior efeito de associação da droga ao ambiente, presumivelmente pelo seu envolvimento nos mecanismos da LTP.

O aumento da atividade da via da PKA no CPF dos adolescentes também pode estar contribuindo para a associação dos efeitos da droga ao ambiente, já que a ativação dessa quinase ocorre principalmente por meio de receptores dopaminérgicos D1 (Ron, Jurd, 2005) e parece estar envolvida na reconsolidação da memória contextual relacionada a psicoestimulantes.

Ratos treinados para a autoadministração de cocaína em um determinado contexto foram submetidos a um processo de extinção em um ambiente diferente. Em seguida, foram reexpostos brevemente ao primeiro contexto (pareado com a droga), para reativar as memórias e iniciar a reconsolidação; ou com o ambiente não pareado, para obter uma experiência similar sem a reativação da memória explícita. Imediatamente após essas sessões, os animais receberam inibidor da PKA na amígdala basolateral, e como resultado houve prejuízo do comportamento de busca da droga, mostrando o envolvimento da quinase na memória de reconsolidação nessa região (quando o animal é reexposto ao ambiente pareado com a droga, na ausência desta) (Arguello et al., 2014).

O presente trabalho também mostrou uma correlação negativa entre a atividade da ERK no hipocampo e a atividade locomotora dos animais durante a abstinência. De modo geral, a preferência condicionada à cocaína tem sido

relacionada à ativação da ERK em áreas como AVT e NAc (Miller, Marshall, 2005; Yu et al., 2013). Diversos estudos têm mostrado que o uso de inibidores da via da ERK nessas regiões leva ao bloqueio da expressão de CPP de cocaína e anfetamina, embora não seja possível afirmar se esses resultados dependem da diminuição dos efeitos de recompensa condicionados aos sinais associados à droga ou da interferência nos processos de recuperação da memória (Lu et al., 2006).

Por outro lado, poucos trabalhos observaram as alterações no hipocampo e córtex pré-frontal. Um estudo mostrou que camundongos submetidos à CPP de cocaína apresentaram aumento de pERK no hipocampo dorsal (Tropea et al., 2008); no entanto, no protocolo adotado, os animais foram submetidos a apenas três dias de condicionamento e não passaram por abstinência prolongada como neste trabalho. Além disso, outro estudo mostrou que o treino da CPP induzida por cocaína (15mg/kg, 4 pareamentos) levou ao aumento da fosforilação da ERK1/2 na AVT, enquanto a infusão de um inibidor da quinase nessa região, embora tenha diminuído a fosforilação da proteína e a aquisição da CPP, não impediu sua expressão (Pan et al., 2011). Estudos com morfina, por sua vez, mostraram que a CPP induzida pela administração crônica dessa droga levou à diminuição da expressão de ERK1/2 no hipocampo, mesmo após 10 dias de extinção (Ma et al., 2014), e essa diminuição da atividade da ERK2 também foi observada no córtex frontal de associação (Li et al., 2008).

A CBP também está envolvida na regulação da expressão gênica necessária para a plasticidade sináptica de longo prazo e memória, e um estudo mostrou que a sua completa deleção em neurônios do NAc de camundongos provocou prejuízos significativos na sensibilidade dos animais à cocaína e na memória de associação do contexto à droga (Malvaez et al., 2011).

A importância da CBP na dependência também foi demonstrada no hipocampo. O giro denteado do hipocampo é crítico para a memória espacial e está relacionado com a formação de memória associativa das drogas. Estudos comportamentais em roedores mostraram que a exposição prévia à nicotina produz um aumento da autoadministração, sensibilização comportamental e preferência condicionada de cocaína em comparação à administração da droga sozinha (Levine et al. 2011; Mello, Newman 2011).

Um estudo mostrou que o uso de um inibidor da desacetilação de histonas produz um efeito similar ao da exposição prévia à nicotina no giro denteado do

hipocampo de camundongos. Os autores mostraram que uma única injeção de cocaína não alterou a LTP nessa estrutura, no entanto, o pré-tratamento com nicotina seguido por uma injeção de cocaína produziu um aumento substancial da LTP. Em seguida, os autores mostraram que o uso de um inibidor da desacetilação de histonas simulou esse efeito da pré-exposição à nicotina. Em contraste, esse aumento foi bloqueado em camundongos geneticamente modificados que são haploinsuficientes para a CBP e, portanto, exibem uma redução da acetilação de histonas. Uma explicação para essas observações é a de que a associação entre a nicotina e a cocaína nos animais com baixos níveis de CBP não é capaz de alcançar o aumento de acetilação de histonas necessário para o fortalecimento da LTP. Como resultado, a nicotina e a cocaína nesses animais parecem ser incapazes de aumentar a amplitude da LTP (Huang et al., 2014). Esses resultados são consistentes com estudo anterior que mostrou que esses animais apresentam déficits na produção de LTP forte e estável na região CA1 do hipocampo (Alarcon et al. 2004). Neste trabalho, os adolescentes apresentaram um aumento consistente da CBP, reforçando a hipótese de maior capacidade de LTP.

O sistema opioide endógeno (SOE) tem papel fundamental nos processos envolvidos na dependência. Alterações moleculares nesse sistema ocorrem de maneira específica nos diferentes estágios e neurocircuitos da dependência e podem contribuir para a iniciação e manutenção da adição. Além da regulação da neurotransmissão nos circuitos da recompensa, o SOE também atua em processos cognitivos específicos, relevantes para o controle dos comportamentos associados à dependência, incluindo a fissura, a tomada de decisões e impulsividade (Bencherif et al. 2004; Boettiger et al. 2009; Koob, Volkow 2010). Diversas desordens do controle impulsivo, incluindo o descontrole patológico em jogos de azar e alimentação, bem como o uso de álcool, podem ser aliviadas pela naltrexona (antagonista opioide), sugerindo um papel do SOE na impulsividade (Boettiger et al., 2009).

Bazov et al., (2011) mostraram que os níveis de RNAm de Pdyn e dinorfina no córtex pré-frontal dorso lateral (CPFdl) e os níveis de dinorfina no hipocampo apresentam-se aumentados em indivíduos alcoólatras. Essas alterações foram observadas em regiões cerebrais envolvidas no controle cognitivo do comportamento associado à dependência e podem representar adaptações moleculares desenvolvidas após muitos anos de exposição ao álcool e abstinência.

A dinorfina pode ter um papel na aquisição de memória e aprendizado, no entanto, uma elevação nos seus níveis pode prejudicar os processos cognitivos (Jiang et al., 1989; Nguyen et al., 2005; Sandin et al., 1998). Ratos e camundongos idosos apresentaram piores resultados em testes de aprendizado e memória e exibiram maior expressão de Pdyn e dinorfina do que os animais jovens (Jiang et al., 1989). Consistentemente, estudos *post-mortem* em humanos mostraram elevados níveis de dinorfina no CPFdl em pacientes com mal de Alzheimer, além de uma correlação entre esses níveis e a pontuação neuropatológica (Yakovleva et al., 2007). Três mutações gênicas na dinorfina A, que resultam na produção excessiva desse peptídeo, levaram ao aumento de sua neurotoxicidade intrínseca, causando uma desordem neurodegenerativa espinocerebelar, associada a problemas cognitivos. Alterações neuropatológicas generalizadas, incluindo atrofia cerebral cortical e subcortical e agenesia do corpo caloso em pacientes carregando essa mutação, enfatizam o papel fundamental da dinorfina no controle e preservação das funções neuronais. Com base nessas evidências, é possível especular que a dinorfina pode levar à disfunção neuronal e até mesmo à neurodegeneração, dependendo da extensão do aumento de sua expressão, o que pode contribuir para déficits cognitivos relacionados ao prejuízo do controle impulsivo (Bazov et al., 2011).

Dessa forma, o aumento persistente da expressão de Pdyn no CPF dos adolescentes, em contraste com a ausência de alteração observada nos adultos, pode estar associado a déficits cognitivos relacionados a uma menor capacidade de controle impulsivo naquele grupo. Sendo assim, a terapia baseada no controle do sistema opioide em usuários de cocaína parece ser um importante alvo farmacológico a ser explorado ontogenicamente.

5.4 Alterações moleculares em resposta à cocaína e sua relação com a sensibilização psicomotora e o comportamento tipo-ansiedade

A sensibilização psicomotora é um meio de estudar as neuroadaptações decorrentes da sensibilização do circuito motivacional induzida pelas drogas, a qual está relacionada ao estado motivacional descrito como desejo, compulsão ou fissura. Neste trabalho, o aumento da atividade da PKA no CPF dos adolescentes após exposição repetida à droga mostrou-se um efeito prolongado, uma vez que foi

observado mesmo após 12 dias de abstinência, e essa parece ser a principal via relacionada à expressão da sensibilização locomotora, embora mais estudos sejam necessários para confirmar esta hipótese.

A ativação da PKA no NAc contribui para o aumento do consumo de cocaína e do risco de recaída (Self, 2004), e resultados similares também são observados em outras estruturas cerebrais. Ratos submetidos a dez dias de autoadministração de cocaína, seguidos por sete dias de abstinência apresentaram elevação de pGluR1 (Ser845) no córtex pré-frontal dorsomedial (CPFdm) e aumento do comportamento de busca da droga em condições de extinção; porém, a administração de um inibidor da PKA no CPFdm desses animais reverteu a fosforilação e o comportamento de busca, sugerindo diminuição do efeito de recaída (Sun et al., 2013).

O papel da PKA na sensibilização psicomotora foi avaliado por Miserendino e Nestler (1995). Os autores mostraram que a infusão de um inibidor da PKA no NAc de ratos levou a uma diminuição da atividade locomotora desses animais em resposta a uma dose desafio de cocaína em comparação aos que receberam uma substância ativadora da PKA.

O envolvimento do CPF na sensibilização tem recebido maior atenção devido à sua importância no sistema mesocorticolímbico. Um trabalho recente mostrou que a injeção de um inibidor da adenilil ciclase no CPF medial de ratos levou a uma diminuição da resposta estimulante locomotora aguda da cocaína, bem como o início e a expressão da sensibilização psicomotora (Liu, Steketee, 2016). Neste trabalho, os animais adultos, que não expressaram sensibilização psicomotora, também não apresentaram aumento de atividade da PKA no CPF. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre a fosforilação de GluR1 no CPF dos animais do grupo Repetido e a atividade locomotora desse grupo no dia do desafio (D20), indicando uma forte relação entre a atividade da PKA e a sensibilização psicomotora.

Por outro lado, enquanto alterações na fosforilação da subunidade GluR1 decorrentes da ativação da PKA apresentam papel-chave na sensibilização psicomotora, mudanças nos níveis de GluR1, por si só, não parecem essenciais para esse fenômeno, embora sejam observadas após a administração de drogas como a cocaína e a morfina. Grignaschi et al., (2004) mostraram que uma única administração de 20 mg/kg (i.p.) de cocaína levou à sensibilização psicomotora em

resposta a uma segunda dose de 10 mg/kg. Essa sensibilização foi acompanhada de aumento da expressão de RNAm de GluR1 no NAc e AVT, mas não no córtex frontal e giro denteado do hipocampo. A análise proteica, por sua vez, confirmou a ausência de alteração de GluR1 no córtex frontal, mas revelou diminuição dessa proteína tanto no hipocampo dos adultos pré-tratados com cocaína que estavam em abstinência, quanto nos desafiados com cocaína. Com opióides, a exposição repetida à morfina durante 12 dias aumentou GluR1 na fração sináptica das células hipocampais; no entanto, a abstinência levou à diminuição geral da proteína (Zhong et al., 2006). Ratos adolescentes que receberam duas doses diárias de cocaína apresentaram sensibilização psicomotora após três ou trinta dias de abstinência, e essa sensibilização foi acompanhada de aumento de GluR1 apenas no córtex pré-frontal dos animais submetidos a três dias de abstinência, demonstrando que o aumento da proteína não foi necessário para a expressão do comportamento (Marin et al., 2008). Dessa forma, a diminuição de GluR1 observada no hipocampo dos animais adultos, neste trabalho, pode estar contribuindo para a menor sensibilização exibida por esse grupo, embora sua presença não seja essencial para a expressão desse fenômeno.

Também foi observada correlação entre a ativação da CaMKIV no hipocampo dos animais de ambas as idades e o aumento da sensibilização psicomotora neste trabalho, resultado que foi reforçado pela diminuição de pCamKIV no hipocampo dos adultos, os quais não expressaram sensibilização psicomotora. Estudos têm mostrado que a diminuição dos níveis de CaMKIV no prosencéfalo prejudicam a LTP e a memória, enquanto a superexpressão dessa molécula tem efeito oposto (Wayman et al., 2008).

Existem poucos estudos mostrando a participação dessa quinase na dependência à cocaína, e os resultados divergem. Por exemplo, Mattson et al., (2005) mostraram aumento de fosforilação da CaMKIV no NAc de ratos, acompanhado de sensibilização psicomotora à cocaína; enquanto Bilbao et al., (2008) mostraram que camundongos transgênicos com deleção do gene *Camk4* (proteína CaMKIV) em neurônios dopaminérgicos apresentaram aumento dos comportamentos relacionados à droga, como sensibilização psicomotora, condicionamento e restabelecimento após extinção. Sendo assim, embora a diminuição geral da CaMKIV em neurônios dopaminérgicos leve ao aumento desses comportamentos, é possível que sua expressão tenha ações diferentes de acordo

com as regiões cerebrais em que ocorre. Neste trabalho, os animais adultos apresentaram aumento de CaMKIV no CPF e diminuição de pCaMKIV no hipocampo, e um menor comportamento relacionado à cocaína em comparação aos adolescentes.

A diminuição de pCaMKII e pCaMKIV no hipocampo dos adultos pode estar relacionada a uma diferente disponibilidade de cálcio na célula. Os animais desse grupo apresentaram uma redução de receptores AMPA (subunidade GluR1) no hipocampo, o que poderia estar dificultando a entrada do cálcio e a consequente ativação das CaMKII e IV. Essa modulação pode estar contribuindo para a menor sensibilização psicomotora desse grupo, uma vez que Licata et al., (2004) mostraram que camundongos CaMKII *knockout* desenvolveram sensibilização psicomotora induzida por cocaína, porém em uma magnitude significativamente menor do que os animais controle.

A remodelagem da cromatina, incluindo a modificação de histonas, também desempenha papel crítico na dependência e nos comportamentos relacionados às drogas (Levine et al., 2005, 2011; Renthal, Nestler 2008). A inibição farmacológica ou genética de histonas desacetilases aumenta a sensibilização psicomotora e os efeitos de recompensa da cocaína (Kumar et al., 2005; Renthal et al., 2007). Por outro lado, a superexpressão da histona desacetilase no estriado ou ablação gênica de histonas acetiltransferases, incluindo a Cbp, atenuam a resposta à cocaína (Kumar et al., 2005; Levine et al., 2005). Um estudo mostrou que camundongos pré-tratados com o agonista do receptor D1 (SKF82958) em conjunto com um inibidor de histona desacetilase apresentaram aumento significativo da atividade locomotora induzida por cocaína, bem como da preferência condicionada em comparação à administração separada de cada uma das drogas (Schroeder et al., 2008). Dessa forma, o aumento gênico e proteico, consistente, da CBP exibido pelos adolescentes também parece contribuir para o aumento da atividade locomotora e sensibilização psicomotora apresentada por esse grupo.

A dependência é o resultado não somente dos efeitos hedônicos da droga e da compulsão, mas também decorrente de um estágio disfórico, onde o comportamento é guiado pela tentativa de reverter os efeitos negativos gerados pela ausência da droga. Nessa etapa, sistemas cerebrais “anti-recompensa”, como os que envolvem CRF, norepinefrina e dinorfina, são recrutados na amígdala extendida (que abrange o núcleo central da amígdala, núcleo do leito da *estria terminalis*, uma

área de transição na parte medial do NAc, e uma projeção maciça para o hipotálamo lateral), produzindo sintomas de ansiedade e irritabilidade. A dinorfina, proteína codificada pelo gene *Pdyn*, bloqueia os receptores kappa opioides, resultando em uma diminuição da liberação de dopamina. Esse mecanismo parece contribuir para os efeitos emocionais e motivacionais da abstinência, estimulando o indivíduo a consumir a droga para diminuir esse estado disfórico (Koob, 2013). Sendo assim, o aumento de *Pdyn* observado nos adolescentes, mas não no dos adultos, também pode estar contribuindo para o aumento do comportamento tipo-ansiedade exibido por aquele grupo, sugerindo uma maior suscetibilidade aos efeitos disfóricos da cocaína, o que pode contribuir para o aumento do risco de recaída.

5.5 Caracterização das respostas dos animais adolescentes à cocaína e o risco de dependência

Com base nos resultados deste trabalho, tanto comportamentais, quanto moleculares, fica evidente que os adolescentes exibem alterações mais proeminentes em resposta à cocaína do que os adultos, justificando a presença de um capítulo à parte para discutir em maiores detalhes os resultados apresentados por esse grupo.

5.5.1 Transição: Homeostasia vs Alostasia

Observamos que a resposta inicial dos adolescentes a uma dose aguda de cocaína foi substancialmente diferente da resposta após exposições repetidas à droga, e essas diferenças parecem ter sido influenciadas por uma transição dos mecanismos compensatórios do organismo.

Como revisado por de Sousa et al., (2015), o conceito de homeostase foi desenvolvido por Walter Cannon em 1929. De acordo com o pesquisador, a função final de todos os mecanismos fisiológicos é a preservação da homeostase, que deve ser compreendida como “a manutenção da estabilidade do meio interno” (Cannon, 1929). Os sistemas de regulação homeostática visam restabelecer o equilíbrio do indivíduo (McEwen, Wingfield, 2003; Troisi, 2001) durante as condições normais de regulação para a manutenção do organismo em harmonia com situações que se alteram transitoriamente como, por exemplo, após a ingestão alimentar, durante o sono, durante a resposta sexual e reprodutiva. Todavia, quando ocorrem desafios

impostos pelo ambiente social, físico, ou ambos, de maneira inesperada ou contínua, ultrapassando limites de intensidade, previsibilidade e duração, são ativados os sistemas regulatórios que passam a regular a homeostase em níveis mais elevados de demandas, o que McEwen (2000) a partir do conceito de Peter Sterling (Sterling, Eyer, 1988) chamou de alostasia, e os respectivos mecanismos alostáticos.

O conceito de alostase amplia e adequa o conceito de homeostase aos conhecimentos recentes da fisiologia, levando a uma nova visão também sobre a resposta ao estresse (de Sousa et al., 2015). Dessa forma, a diferença entre a resposta à administração aguda e repetida de cocaína observada neste trabalho parece decorrer da transição entre um estado homeostático inicial para um estado de alostase final, no qual a exposição repetida à droga faz com que o cérebro do usuário encontre um novo estado de equilíbrio, ao invés de retornar ao seu estado inicial.

Esses conceitos são importantes para a compreensão dos fenômenos da tolerância e da abstinência, que 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).

5.5.2 Respostas moleculares e comportamentais dos animais adolescentes nos diferentes estágios do consumo da cocaína

Traçando-se um paralelo entre os grupos estudados neste trabalho e os diferentes momentos que permeiam o uso de drogas, verificamos que os adolescentes exibem manifestações moleculares e comportamentais específicas em cada um dos diferentes estágios do consumo da cocaína, como ilustrado na figura 27.

Figura 27 – Principais respostas moleculares e comportamentais dos animais adolescentes, nas diferentes fases da administração de cocaína. Na administração aguda, ocorre um aumento da CBP e ativação de mecanismos homeostáticos que controlam os efeitos da droga sobre o CREB. Na abstinência, as respostas homeostáticas de controle do CREB parecem estar diminuídas, a CBP permanece aumentada e ocorre ativação da PKA. A interrupção da abstinência com uma dose da droga parece ativar mecanismos homeostáticos que se contrapõem aos efeitos da abstinência. Observa-se também o aumento sustentado da PKA e CBP. CPF (azul) e hipocampo (rosa).

Na exposição inicial à cocaína (grupo Agudo), observamos a ativação do CREB no CPF dos adolescentes e aumento do seu inibidor endógeno, Icer, sugerindo um mecanismo de tolerância aguda. A ativação do CREB também levou à transcrição do seu gene-alvo, Pdyn, o qual codifica o peptídeo dinorfina. Como discutido anteriormente, a dinorfina está envolvida em mecanismos de disforia e déficits cognitivos relacionados a prejuízos do controle impulsivo. Portanto, sua indução decorrente da ativação do CREB parece representar um mecanismo de facilitação da dependência. O maior comportamento tipo-ansiedade exibido por esses animais pode estar relacionado ao aumento de Pdyn no CPF. No hipocampo, observamos maior expressão de CBP e maiores níveis da proteína, a qual participa da acetilação de histonas, além de estar envolvida em outros mecanismos neuroplásticos, podendo, dessa forma, estar relacionada à ativação locomotora exibida pelos animais.

Após doses repetidas do psicoestimulante, durante a abstinência (grupo Abstinência), o aumento do CREB se sustenta; no entanto, parece haver uma diminuição dos mecanismos homeostáticos do organismo, pois se observa ausência de ativação da Icer no CPF e diminuição de sua expressão no hipocampo, apesar da presença de altos níveis de CREB em ambas as estruturas. Nesta fase, observa-se também o aumento da PKA, que parece ser a principal via envolvida na sensibilização psicomotora, e o aumento persistente da CBP.

A fissura é um elemento de grande importância na dependência, contribuindo para o aumento do risco de recaída nos indivíduos abstinentes e levando, conseqüentemente, à perpetuação do ciclo de consumo da droga. 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, 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 estresse, por estímulos condicionados e pelas drogas é mediada por atividade do CPF, e estudos farmacológicos mostraram que a inativação dessa estrutura bloqueia a reinstalação da dependência em modelos animais (McFarland, Kalivas, 2001; McLaughlin, See, 2003).

Evidências de estudos em ratos sugerem que o restabelecimento induzido pela droga é mediado pelo circuito que liga o CPF ao estriado ventral, e que aumentos na atividade do sistema glutamatérgico pré-frontal podem gerar uma forte resposta glutamatérgica que medeia o comportamento tipo fissura nesse estágio. Em humanos, a fissura induzida por pistas relacionadas à droga parece envolver a ativação de circuitos similares, com ativação do CPF, incluindo córtex pré-frontal dorsolateral, giro cingulado anterior e córtex órbito frontal medial. Estudos de imagens também mostraram que pistas associadas à cocaína aumentaram a liberação de dopamina no estriado, amígdala e CPF (cingulado anterior e órbito frontal medial) e de peptídeos opioides no cingulado anterior e córtex frontal. O hipocampo, além de facilitar o aprendizado aberrante por meio das alterações neuroplásticas, também participa do estágio de fissura, já que está envolvido no processamento da informação contextual (Koob, Volkow, 2016). Dessa forma, as alterações moleculares apresentadas pelos adolescentes, nessas duas estruturas cerebrais, sugerem um aumento do risco de recaída nesse grupo.

Por fim, quando a abstinência foi interrompida por uma dose da droga (grupo Repetido), observamos que as regiões cerebrais estudadas apresentaram uma resposta bastante diferente da exibida pelos animais submetidos à administração inicial aguda. Nessa etapa, parece ocorrer uma contraposição da modulação do CREB observada na abstinência, de modo que não há mais aumento dessa proteína no CPF e observa-se sua diminuição no hipocampo, acompanhada de diminuição da Pdyn, sugerindo uma tentativa do organismo de reverter a modulação induzida pela abstinência da droga. A diminuição do CREB nesta fase pode estar sendo regulada principalmente pela ERK, cuja atividade também se encontra reduzida, e a diminuição da Pdyn pode contribuir para o alívio da disforia promovida pela abstinência da droga, favorecendo o seu consumo.

Sendo assim, parece haver uma transição da atuação dos mecanismos compensatórios do organismo. Inicialmente, as respostas são direcionadas ao controle das alterações provocadas pela droga nos níveis do CREB. Na abstinência, a capacidade do organismo de controlar essas alterações encontra-se diminuída e, após a interrupção desse estágio com uma dose do psicoestimulante, a regulação homeostática parece direcionar-se à contraposição das alterações induzidas pela abstinência. Dessa forma, a ativação do CREB observada no CPF dos animais adolescentes após administração aguda de cocaína, mas não após tratamento repetido, pode ser o reflexo de um efeito de tolerância mediado, ao menos em parte, pelo aumento da Icer, induzido pela dose inicial da droga. No entanto, o organismo parece não conseguir reverter a ativação da PKA e o aumento da CBP. Sendo estas, duas importantes alterações neuroplásticas duradouras observadas nos adolescentes.

Essas alterações observadas no CPF e hipocampo dos adolescentes são compatíveis com um perfil de alta susceptibilidade à dependência, característico da adolescência.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho ampliam o conhecimento atual sobre as alterações neuromoleculares e comportamentais que permeiam as diferenças entre adultos e adolescentes no consumo de cocaína.

Na análise das respostas comportamentais, observamos que os adolescentes apresentaram maior atividade locomotora e sensibilização psicomotora em resposta à cocaína e maior atividade exploratória quando comparados aos adultos; os testes de ansiedade, por sua vez, confirmaram o efeito ansiogênico do psicoestimulante em ambas as idades e apontaram para uma maior susceptibilidade dos adolescentes aos efeitos ansiogênicos induzidos pela administração da droga.

As respostas neuromoleculares sugerem que a modulação do CREB pela cocaína seja resultante da combinação da atividade das vias nos diferentes estágios da administração da droga (agudo, repetido ou abstinência). Enquanto os adolescentes exibiram aumento da atividade da via da PKA e da expressão de Icer, CBP e Pdyn; os adultos apresentaram diminuição de CaMKs, GluR1 e Icer. Essas diferentes respostas neuroadaptativas podem ajudar na compreensão dos mecanismos ontogênicos envolvidos na dependência.

Os adolescentes apresentaram alterações no CPF e hipocampo compatíveis com um perfil de alta susceptibilidade à dependência. Observamos que a resposta inicial a uma dose aguda de cocaína foi substancialmente diferente da resposta após exposições repetidas à droga, e essas diferenças parecem ter sido influenciadas por uma transição dos mecanismos compensatórios do organismo. Inicialmente, as respostas foram direcionadas ao controle das alterações provocadas pela droga nos níveis do CREB. Na abstinência, a capacidade do organismo de controlar essas alterações parece ter diminuído e, após a interrupção desse estágio com uma dose do psicoestimulante, a regulação homeostática parece ter se direcionado à contraposição das alterações induzidas pela abstinência.

Dessa forma, a ativação do CREB observada no CPF dos animais adolescentes após administração aguda de cocaína, mas não após tratamento repetido, pode ser o reflexo de um efeito de tolerância mediado, ao menos em parte, pelo aumento da Icer, induzido pela dose inicial da droga. No entanto, o organismo parece não conseguir reverter a ativação da PKA e o aumento da CBP. Sendo estas, duas importantes alterações neuroplásticas duradouras observadas nos

adolescentes. Também foi observado um aumento da expressão de Pdyn no CPF desse grupo, o que pode estar relacionado aos efeitos disfóricos que ocorrem na ausência da droga e a déficits cognitivos que levam ao prejuízo do controle impulsivo.

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que apesar de os animais de ambas as idades terem sido afetados pela cocaína, os adolescentes mostraram-se mais suscetíveis tanto aos efeitos comportamentais quanto aos efeitos neuroplásticos da droga, sugerindo que a ação de substâncias psicoativas em um sistema nervoso ainda em desenvolvimento pode provocar alterações mais intensas do que em um sistema nervoso já formado e levar ao aumento dos comportamentos de busca, recaída e consumo relatados por diversos autores nesse grupo de idade (Brandon et al., 2001; Levin et al., 2003; Pascual et al., 2009). Esses resultados apontam para a necessidade de abordagens terapêuticas diferentes para o tratamento da dependência à cocaína para adultos e adolescentes.

REFERÊNCIAS*

Abdi H, Williams LJ. Newman-Keuls Test and Tukey Test. In Neil Salkind (Ed.), *Encyclopedia of Research Design*. Thousand Oaks, CA: Sage; 2010. p. 1-9.

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.

Alarcon JM, Malleret G, Touzani K, Vronskays S, Ishil S, Kandel ER, Barco A. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/-mice: A model for the cognitive deficit in Rubinstein– Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*. 2004;42:947-58.

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.

Álvarez Y, Pérez-Mañá C, Marta Torrens M, Farré M. Antipsychotic drugs in cocaine dependence: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Substance Abuse Treatment*. 2013;45:1–10.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4. ed. Washington D. C.: American Psychiatric Press; 1994. 943 p.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5. ed. Washington D. C.: American Psychiatric Publishing; 2013. 991 p.

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.

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.

Arenas MC, Daza-Losada M, Vidal-Infer A, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M. Capacity of novelty-induced locomotor activity and the hole-board test to predict sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Physiology & Behavior*. 2014;133:152–60.

Arguello AA, Hodges MA, Wells AM, Lara H 3rd, Xie X, Fuchs RA. Involvement of amygdalar protein kinase A, but not calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, in the reconsolidation of cocaine-related contextual memories in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231(1):55-65.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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.

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.

Barrett RM, Wood MA. Beyond transcription factors: the role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn Mem.* 2008;15:460–7.

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.

Bazov I, Kononenko O, Watanabe H, Kuntic V, Sarkisyan D, Taqi MM, Hussain MZ, Nyberg F, Yakovleva T, Bakalkin G. The endogenous opioid system in human alcoholics: molecular adaptations in brain areas involved in cognitive control of addiction. *Addiction Biology.* 2011;18(1):161-9.

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 cholecystokinin (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.

Bencherif B, Wand GS, McCaul ME, Kim YK, Ilgin N, Dannals RF, Frost JJ. Mu-opioid receptor binding measured by [11C]carfentanil positron emission tomography is related to craving and mood in alcohol dependence. *Biol Psychiatry.* 2004;55:255–62.

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.

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

Bilbao A et al. Loss of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV in dopaminergic neurons enhances behavioral effects of cocaine. *PNAS.* 2008;105(45):17549-54.

Boettiger CA, Kelley EA, Mitchell JM, D'Esposito M, Fields HL. Now or later? An fMRI study of the effects of endogenous opioid blockade on a decision-making network. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;93:291–9.

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.

Borlikova G, Endo S. Inducible cAMP Early Repressor (ICER) and Brain Functions. *Mol Neurobiol.* 2009; 40:73–86.

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

Bowers MS, Chen BT, Bonci A. AMPA Receptor Synaptic Plasticity Induced by Psychostimulants: The Past, Present, and Therapeutic Future. *Neuron.* 2010;67:11–24.

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.

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 phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002;296:1655–1657.

Cannon WB. Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews.* 1929;9(3):399–403.

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.

Carlini EA, et al. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005 - São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2006. 472 p.

Casey BJ, Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WL, Hamburger SD, Schubert AB, et al. Implication of right frontostriatal circuitry in response inhibition and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997;36(3):374–83.

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 SZ, Lu W, Lee HK, Haganir RL, Wolf ME. D(1) dopamine receptor stimulation increases GluR1 phosphorylation in postnatal nucleus accumbens cultures. *J. Neurochem*. 2002;81:984–92.

Chavkin C, James IF, Goldstein A. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science*. 1982;215:413-5.

Chefer VI, Czyzyk T, Bolan EA, Moron J, Pintar JE, Shippenberg TS. Endogenous Opioid Receptor Systems Regulate Mesoaccumbal Dopamine Dynamics and Vulnerability to Cocaine. *The Journal of Neuroscience*. 2005;25(20):5029–37.

Chefer VI, Shippenberg TS. Paradoxical effects of prodynorphin gene deletion on basal and cocaine-evoked dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*. 2006;23(1):229-38.

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 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.

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.

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.

Curtis J, Finkbeiner S. Sending Signals From the Synapse to the Nucleus: Possible Roles for CaMK, Ras/ERK, and SAPK Pathways in the Regulation of Synaptic Plasticity and Neuronal Growth. *Journal of Neuroscience Research*. 1999;58:88–95.

Daunais JB, McGinty JF. Acute and chronic cocaine administration differentially alters striatal opioid and nuclear transcription factor mRNAs. *Synapse*. 1994;18:35–46.

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

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.

De Sousa MBC, Silva HPA, Galvão-Coelho NL. Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase. *Estudos de Psicologia*. 2015;20(1):2-11.

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.

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.

Durston 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 Δ FosB up regulation in response to cocaine and amphetamine. *J Neurosci*. 2002;22:9155–9.

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.

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

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

Filip M, Alenina N, Bader M, Przegalinski E. Behavioral evidence for the significance of serotonergic (5-HT) receptors in cocaine addiction. *Addiction Biology*. 2010;15:227–49.

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. 1992;166:165–80.

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.

Fowler JS, Volkow ND, Logan J, Alexoff D, Telang F, Wang GJ et al. Fast uptake and long-lasting binding of methamphetamine in the human brain: comparison with cocaine. *Neuroimage*. 2008;43:756–63.

Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2014;10.3(8):1-40.

Franklin KB, Paxinos G, 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.

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

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.

Green TA, Alibhai IN, Hommel JD, DiLeone RJ, Kumar A, Theobald DE, Neve RL, Nestler EJ. Induction of inducible cAMP early repressor expression in nucleus accumbens by stress or amphetamine increases behavioral responses to emotional stimuli. *J Neurosci*. 2006;26:8235–42.

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;148:164–70.

Grignaschi G, Burbassi S, Zennaro E, Bendotti C, Cervo L. A single high dose of cocaine induces behavioural sensitization and modifies mRNA encoding GluR1 and GAP-43 in rats. *Eur J Neurosci*. 2004;20(10):2833-7.

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.

Guo W, Crossey EL, Zhang L, Zucca S, George OL, et al. Alcohol Exposure Decreases CREB Binding Protein Expression and Histone Acetylation in the Developing Cerebellum. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e19351.

Haile CN, Mahoney JJ III, Newton TF, De La Garza R. Pharmacotherapeutics directed at deficiencies associated with cocaine dependence: focus on dopamine, norepinephrine and glutamate. *Pharmacol Ther* 2012;134:260-77.

Halikas JA, Crosby RD, Pearson VL e Graves NM. A randomised double-blind study of carbamazepine in the treatment of cocaine abuse. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 1997;62:89–105.

Han W, Takamatsu Y, Yamamoto H, Kasai S, Endo S, Shirao T, Kojima N, Ikeda. Inhibitory Role of Inducible cAMP Early Repressor (ICER) in Methamphetamine-Induced Locomotor Sensitization. *PLoS ONE*. 2011;6(6):e21637.

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(1):59–75.

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.

Huang YY, Levine A, Kandel DB, Yin D, Colnaghi L, Drisaldi B, Kandel ER. D1/D5 receptors and histone deacetylation mediate the Gateway Effect of LTP in hippocampal dentate gyrus. *Learning & Memory*. 2014;21:153-60.

Hudmon A, Schulman H. Neuronal Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II: The role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:473-510.

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

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.

Jiang HK, Owyang VV, Hong JS, Gallagher M. Elevated dynorphin in the hippocampal formation of aged rats: relation to cognitive impairment on a spatial learning task. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:2948–51.

Kalivas PW, Duffy P. Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse*. 1990;5:48–58.

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*. 1993;267:486–95.

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

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

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, Fukushima 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.

Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(11):844–58.

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.

Kim JE, Lawrence AJ. Drugs currently in Phase II clinical trials for cocaine addiction. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2014;23(8):1105–22.

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

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

Knoll AT, Muschamp JW, Sullivan SE, Ferguson D, Dietz DM, Meloni EG, Carroll FI, Nestler EJ, Konradi C, Carlezon WA Jr. 2011. Opioid receptor signaling in the basolateral amygdala regulates conditioned fear and anxiety in rats. *Biol Psychiatry* 70: 425–33.

Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry*. 2016;3:760–73.

Koob GF. Negative reinforcement in drug addiction: the darkness within. *Current Opinion in Neurobiology*. 2013;23:559–63.

Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology REVIEWS*. 2010;35:217–38.

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

Kortenjann M, Thomae O, Shaw PE. Inhibition of v-raf-dependent c-fos expression and transformation by a kinase-defective mutant of the mitogen-activated protein kinase Erk2. *Mol Cell Biol*. 1994;14(7):4815–24.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.

Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ. Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron*. 2005;48:303–14.

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.

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.

Levey AI, Hersch SM, Rye DB, et al. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:8861-5.

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.

Levine AA, Guan Z, Barco A, Xu S, Kandel ER, Schwartz JH. CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:19186–91.

Levine A, Huang YY, Drisaldi B, Griffin EA Jr, Pollak DD, Xu S, Yin D, Schafran C, Kandel DB, Kandel ER. Molecular mechanism for a gateway drug: Epigenetic changes initiated by nicotine prime gene expression by cocaine. *Sci Transl Med*. 2011;3:107.

Li T et al. Cue-elicited drug craving represses ERK activation in mice prefrontal association cortex. *Neuroscience Letters*. 2008;448:99–104.

Licata SC, Schmidt HD, Pierce RC. Suppressing calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the ventral tegmental area enhances the acute behavioural response to cocaine but attenuates the initiation of cocaine-induced behavioural sensitization in rats. *Eur J Neurosci*. 2004;19(2):405–14.

Lima MS, Soares BGO, Reisser AAP, Farrell M. Pharmacological treatment of cocaine dependence: a systematic review. *Addiction*. 2002;97:931–49.

Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(3):169-82.

Liu X, Liu Y, Zhong P, Wilkinson B, Qi J, Olsen CM, Bayer KU, Liu Q. CaMKII Activity in the Ventral Tegmental Area Gates Cocaine-Induced Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39(4):989-99.

Liu K, Steketee JD. The role of adenylyl cyclase in the medial prefrontal cortex in cocaine-induced behavioral sensitization in rats. *Neuropharmacology*. 2016;111:70-7.

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 L, Koya E, Zhai H, Hope BT, Shaham Y. Role of ERK in cocaine addiction. *TRENDS in Neurosciences*. 2006;29(12):695-703.

Ma JY, Gu SZ, Meng M, Dang YH, Huang CY, Onaivi ES. Regional expression of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 mRNA in a morphine-induced conditioned place preference model. *Brain Research*. 2014;1543:191–9.

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.

Mack AH, Frances RJ. Treatment of alcohol use disorders in adolescents. *Journal of Psychiatric Practice*. 2003; 9:195–208.

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.

Malvaez M, Mhillaj E, Matheos DP, Palmery M, Wood MA. CBP in the Nucleus Accumbens Regulates Cocaine-Induced Histone Acetylation and Is Critical for Cocaine-Associated Behaviors. *The Journal of Neuroscience*. 2011;31(47):16941–8.

Margolin A, Avants SK, Kosten TR. Mazindol for relapse prevention to cocaine abuse in methadone-maintained patients. *American Journal of Drug Abuse*. 1995;21:469–81.

Marin MT, Cruz FC, Planeta CS. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008;91(1):109-14.

Martinez D, Slifstein M, Narendran R et al. Dopamine D1 receptors in cocaine dependence measured with PET and the choice to self-administer cocaine. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34:1774-82.

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.

Mattson BJ, Bossert JM, Simmons DE, Nozaki N, Nagarkar D, Kreuter JD, Hope BT. Cocaine-induced CREB phosphorylation in nucleus accumbens of cocaine-sensitized rats is enabled by enhanced activation of extracellular signal-related kinase, but not protein kinase A. *J Neurochem*. 2005;95(5):481-94.

McEwen BS. Allostasis and allostatic load: Implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22(2):108-24.

McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*. 2003;4(1):2-15.

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

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.

McLellan AT, Lewis DC, O'Brien CP, Kleber HD. Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *JAMA* 2000;284:1689-95.

McMahon LR, Cunningham KA. Antagonism of 5-hydroxytryptamine(2a) receptors attenuates the behavioral effects of cocaine in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;297:357–63.

Meador-Woodruff JH, Little KY, Damask SP, et al. Effects of cocaine on dopamine receptor gene expression: a study in the postmortem human brain. *Biol Psychiatry*. 1993;34:348-55.

Mello NK, Newman JL. Discriminative and reinforcing stimulus effects of nicotine, cocaine, and cocaine+nicotine combinations in rhesus monkeys. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2011;19:203-14.

Miller CA, Marshall JF. Molecular Substrates for Retrieval and Reconsolidation of Cocaine-Associated Contextual Memory. *Neuron*. 2005;47:873-84.

Miserendino MJ, Nestler EJ. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. *Brain Res*. 1995;674(2):299-306.

Miszkiel J, Detka J, Cholewa J, Frankowska M, Nowak E, Budziszewska B, Przegalinski E, Filip M. The effect of active and passive intravenous cocaine administration on the extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in the rat brain. *Pharmacological Reports*. 2014;66:630–37.

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.

Muschamp JW, Carlezon WA. Roles of Nucleus Accumbens CREB and Dynorphin in Dysregulation of Motivation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3:a012005.

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

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

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

Nguyen XV, Masse J, Kumar A, Vijitruth R, Kulik C, Liu M, Choi DY, Foster TC, Usynin I, Bakalkin G, Bing G. Prodynorphin knockout mice demonstrate diminished age-associated impairment in spatial water maze performance. *Behav Brain Res*. 2005;161:254–62.

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

Noto AR, Galduróz JCF, Nappo AS, Foseca AM, Carlini CMA, Moura YG, Carlini EA. Levantamento nacional sobre o uso de drogas entre crianças e adolescentes em situação de rua nas 27 capitais brasileiras. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas - CEBRID. São Paulo, 2003. 248 p.

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.

Olesen PJ, Nagy Z, Westerberg H, Klingberg T. Combined analysis of DTI and fMRI data reveals a joint maturation of white and grey matter in a fronto-parietal network. *Brain Research. Cognitive Brain Research.* 2003;18(1):48–57.

Pan B, Zhong P, Sun D, Liu QS. Extracellular signal-regulated kinase signaling in the ventral tegmental area mediates cocaine-induced synaptic plasticity and rewarding effects. *J Neurosci.* 2011;31: 11244–55.

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.

Pascual M, Boix J, Felipo 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.

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.

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.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Tanja P. Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters.* 2004;26:509–15.

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.

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.

Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE 3rd, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kippin TE, Kerstetter KA, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby R, Olson EN, Nestler EJ. Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron.* 2007;56:517–29.

Renthal W, Nestler EJ. Histone acetylation in drug addiction. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;20:339-87.

Reiss AL, Abrams MT, Singer HS, Ross JL, Denckla MB. Brain development, gender and IQ in children. A volumetric imaging study. *Brain.* 1996;119:1763–74.

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 Rev Psychol.* 2003;54:25-53.

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.

Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Huganir RL. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron.* 1996;16:1179–88.

Rogério 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.

Ruggiero RN, Bueno-Júnior LS, Ross JB de, Fachim HA, Padovan-Neto FE, Merlo S, et al. Neurotransmissão glutamatérgica e a plasticidade sináptica. *Medicina.* 2011;44(2):143-56.

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.

Sanchis-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology.* 2006;11: 2–38.

Sandin J, Nylander I, Georgieva J, Schott PA, Ogren SO, Terenius L. Hippocampal dynorphin B injections impair spatial learning in rats: a kappa-opioid receptor-mediated effect. *Neuroscience.* 1998;85:375–82.

Schildein 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-Sapota 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.

Schroeder FA, Penta KL, Matevosian A, Jones SR, Konradi C, Tapper AR, Akbarian S. Drug-induced activation of dopamine D1receptor signaling and inhibition of class I/II histone deacetylase induces chromatin remodeling in reward circuitry and modulates cocaine-related behaviors. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(12): 2981–92.

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

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.

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

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

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.

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

Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, Jernigan TL, Togan AW. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nature Neuroscience*. 1999;2(10):859–61.

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 Rev*. 2000;24:417–63.

Sterling P, Eyer J. Título do capítulo Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher S, Reason J (orgs.) *Handbook of life stress, cognition and health*. New York: John Wiley, 1998. p. 629–49.

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

Steketee JD, Kalivas PW. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev*. 2011;63:348–65.

Sun WL, Coleman NT, Zelek-Molik A, Barry SM, Whitfield Jr TW, McGinty JF. Relapse to cocaine-seeking after abstinence is regulated by cAMP-dependent protein kinase A in the prefrontal cortex. *Addiction Biology*. 2013;19:77–86.

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

Thomas MJ, Beurrier C, Bonci A, Malenka RC. Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat Neurosci*. 2001;4:1217–1223.

Troisi A. Gender differences in vulnerability to social stress: A Darwinian perspective. *Physiology & Behavior*. 2001;73(3):443–9.

Tropea TF, Kosofsky BE, Rajadhyaksha AM. Enhanced CREB and DARPP-32 phosphorylation in the nucleus accumbens and CREB, ERK, and GluR1 phosphorylation in the dorsal hippocampus is associated with cocaine-conditioned place preference behavior. *J Neurochem*. 2008;106(4):1780–90.

United Nations Office on Drugs and Crime. Vienna: World Drug Report. United Nations publication, Sales No. 16.XI.7, 2016. 107 p.

Valjent E, Pagès C, Hervé D, Girault JA, Caboche J. Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *European Journal of Neuroscience*. 2004;19:1826–36.

Valzachi MC, Teodorov E, Marcourakis T, Bailey A, Camarini R. Enhancement of Behavioral Sensitization, Anxiety-Like Behavior, and Hippocampal and Frontal Cortical CREB Levels Following Cocaine Abstinence in Mice Exposed to Cocaine during Adolescence. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e78317.

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.

Vezina, 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, Wolf AP, et al. Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *Am J Psychiatry.* 1990;147:719-24.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, et al. Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* 1993;14:169-77.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, et al. Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature.* 1997;386:830-3.

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, 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.

Wayman G, Lee S, Tokumitsu H, Silva A, Soderling TR. Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity. *Neuron.* 2008; 59(6): 914–31.

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.

Whitfield Jr TW, Shi X, Sun WL, McGinty JF. The Suppressive Effect of an Intra-Prefrontal Cortical Infusion of BDNF on Cocaine-Seeking Is Trk Receptor and Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Dependent. *The Journal of Neuroscience.* 2011;31(3):834–42.

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

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.

Yakovleva T, Marinova Z, Kuzmin A, Seidah NG, Haroutunian V, Terenius L, Bakalkin G. Dysregulation of dynorphins in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 2007;28:1700–8.

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.

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.

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.

Yu F et al. Metabotropic Glutamate Receptor I (mGluR1) Antagonism Impairs Cocaine-Induced Conditioned Place Preference via Inhibition of Protein Synthesis. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38:1308–21.

Zhai H, Li Y, Wang X, Lu L. Drug-induced Alterations in the Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Signalling Pathway: Implications for Reinforcement and Reinstatement. *Cell Mol Neurobiol.* 2008;28:157–72.

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.

Zhong W, Dong Z, Tian M, Cao J, Xu T, Xu L, Luo J. Opiate withdrawal induces dynamic expressions of AMPA receptors and its regulatory molecule CaMKIIalpha in hippocampal synapses. *Life Sci*. 2006;79(9):861-9.