JAQUELINE ROCHA BORGES DOS SANTOS

PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA nNOS NA SENSIBILIZAÇÃO CRUZADA ENTRE ESTRESSE E ETANOL EM CAMUNDONGOS SWISS

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

São Paulo
2013

JAQUELINE ROCHA BORGES DOS SANTOS

PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA nNOS NA SENSIBILIZAÇÃO CRUZADA ENTRE ESTRESSE E ETANOL EM CAMUNDONGOS SWISS

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Camarini

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Santos, Jaqueline Rocha Borges dos.
Participação da enzima nNOS na sensibilização cruzada entre estresse e etanol em camundongos Swiss / Jaqueline Rocha Borges dos Santos. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Rosana Camarini.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neurobiologia da dependência a drogas de abuso.

Versão do título para o inglês: Participation of nNOS enzyme in the cross-sensibilization between stress and ethanol in Swiss mice.

1. Psicofarmacologia 2. Comportamento 3. Etanol
4. Estresse 5. Óxido nítrico 6. Camundongos I. Camarini, Profa. Dra. Rosana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências III. Título.

ICB/SBIB053/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jaqueline Rocha Borges dos Santos.

Título da Tese: Participação da enzima nNOS na sensibilização cruzada entre estresse e etanol em camundongos Swiss.

Orientador(a): Profa. Dra. Rosana Camarini.

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

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

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **134** nas fls. **78** 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 **Avaliação da neurotransmissão glutamatérgica na sensibilização cruzada entre estresse e etanol em camundongos Swiss** do qual participou(aram) o(s) alunos **Jaqueline Rocha Borges dos Santos, Sabrina Lúcio Soares, Priscila Carrara, André Rueda, Daniel Pastrelo e o pesquisador Marcelo Nicolas Muscará,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **20.10.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 21 de outubro de 2009.

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

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

Profº Dr. Ariel M. Silber
Dpto. de Parasitologia
ICB - USP
asilber@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP
Telefone :(55) (011) 3091.7733 -e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA. 039/2012.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 134/09/CEUA, aprovado em 20.10.09 e por solicitação da Profa. Dra. **ROSANA CAMARINI**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de novo delineamento experimental ao Projeto de Pesquisa "*Avaliação da neurotransmissão glutamatérgica na sensibilização cruzada entre estresse e etanol em camundongos Swiss*" uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 27 de julho de 2012.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Vice-Coordenador da CEUA
ICB/USP

À minha família, em especial ao meu avô Romão (in memoriam), à minha mãe Regina e ao meu marido Juan Pablo, por serem eternos partícipes e motivadores incondicionais movidos pelo sentimento que nos une: o amor. A força de nossa união sempre impulsionou a perseverança na trajetória deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por viabilizar trabalhos que de alguma maneira beneficiam à humanidade, iluminando a mente de pessoas imbuídas com espírito construtivo materializado na ciência.

Aos animais utilizados em experimentação, que doam suas vidas ao benefício idealizado pelo homem. À luz da consciência, com ética e respeito, simplesmente agradeço.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, representado pelo Coordenador Prof. Dr. Cristóforo Scavone, por acreditar que um projeto de pesquisa proposto pudesse contribuir ao crescimento da ciência produzida neste curso e neste Instituto.

À Profª Rosana Camarini pela orientação e por confiar na materialização de ideais compartilhados para um só fim. Nestes anos de convivência, a orientação transpôs as barreiras que poderiam distanciar o professor do aluno, para dar lugar à amizade, à sabedoria, à alegria e com naturalidade às palavras, conversas e visões que nortearam à execução do trabalho. Jamais esquecerei os momentos vividos, que ficam registrados com muito carinho! Muito obrigada!

Ao Prof. Marcelo Muscará e à Simone Teixeira, por apoiarem este trabalho, concebido com troca de experiências e hipóteses. Em especial, Simone, pela dedicação e empenho, sem nunca hesitar em auxiliar. Ao contrário, a sua vontade em colaborar e o profissionalismo aliado ao conhecimento manifestado com humildade, fazem com que você seja uma pessoa especial.

À Profª Carolina Demarchi Munhoz de Souza pelas revisões e correções do trabalho em diversas etapas. A sua experiência e o conhecimento me ensinaram a crescer e a enxergar de maneira diferente o que muitas vezes parecia imodificável.

À Profª Karen Szumlinski da *University of California Santa Barbara* (UCSB), obrigada pela oportunidade de estada em seu Laboratório, pelos ensinamentos e por auxiliar na elucidação de novos conceitos!

Aos colegas do Laboratório, alguns que conheci há um tempo nesta jornada como: André (Andrews) e Priscila Carrara (Pri). Aos que já finalizaram este caminho e seguem novos horizontes: Rulian e Sabrina. Aos que ingressaram nesta trajetória e só enriqueceram este time: Maria Cristina (Cris) e Mariana (Mari). Aos mais novos do grupo: Karina, Marcos, Priscila Marianno, Gustavo e Rodolfo. Um carinho especial por dedicação e parceria: Pri, Andrews, Cris e Mari. Com vocês o coleguismo coexiste com amizade, respeito e troca de conhecimento. Sem dúvida, o fruto hoje colhido conta com a participação de todos vocês!

Ao técnico Mateus, pelo suporte nas horas fáceis e difíceis dos experimentos. Obrigada por sua postura solícita e sempre amigável!

Ao técnico do Biotério, Manoel, por seu empenho e observações rotineiras do comportamento dos animais. O seu trabalho foi muito importante para esta pesquisa!

Às secretárias da pós-graduação: Selma e Mônica. O suporte administrativo e a conduta esclarecedora facilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família que mesmo distante fisicamente sempre aproximou o carinho e a força para este trabalho!

Aos meus amigos: Milena, João Carlos, Luiz Fernando, Juliana, Emanuela, Patrícia Fogaça, Patrícia Calvente, Míriam, Joelmir que souberam entender a minha ausência e ao mesmo tempo compreendiam os meus desabafos.

À minha cachorrinha Frésia, por sua companhia incondicional em todos os momentos!

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro, viabilizando este trabalho.

“O homem que se entrega à ciência do materialismo utiliza as forças da natureza a fim de tornar melhor e mais confortável o ambiente do homem. O homem que se entrega à ciência do espírito utiliza o poder da mente para iluminar a alma.”

Paramahansa Yogananda

RESUMO

ROCHA, J. B. S. **Participação da enzima nNOS na sensibilização cruzada entre estresse e etanol em camundongos Swiss**. 2013. 93 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O consumo de drogas e a exposição ao estresse são duas condições interligadas. O estresse pode precipitar o início e recaídas ao consumo de drogas de abuso e já tem sido demonstrado sensibilização cruzada entre psicoestimulantes e estresse. Tanto a sensibilização comportamental a psicoestimulantes e depressores do sistema nervoso central (SNC) quanto fatores estressantes, alteram a atividade da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). No primeiro delineamento experimental (estudo I) o objetivo deste trabalho foi investigar alterações comportamentais produzidas por etanol (ET) e estresse crônico imprevisível (ECI) em camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD), investigando a participação da enzima nNOS em córtex frontal (CF) e hipocampo (HP). No segundo delineamento experimental (estudo II) estudamos em camundongos AD se o pré-tratamento com dizocilpina (DZP) preveniria a sensibilização comportamental diante do estresse por imobilização (EI) e o tratamento com ET, bem como o impacto desses tratamentos na atividade da nNOS. No estudo I, camundongos machos Swiss ADL (25-28 dias de idade; n= 12 animais/grupo) e AD (60 dias; n=12 animais/grupo) foram tratados durante 11 dias com injeções intraperitoneais (IP) de ET 1,8 g/kg, salina (SAL) ou foram submetidos ao ECI. Amostras de sangue basais, 15 min e 3 h após o desafio foram coletadas para dosagem de corticosterona (CORT). Outros três grupos receberam via IP 7-nitroindazol (7NI) 15 mg/kg 30 minutos antes das injeções de SAL ou ET. O grupo ECI recebeu 7NI IP uma vez ao dia ou em água de beber. No 12º. dia os animais de cada grupo foram desafiados com SAL ou ET 1,8 g/kg e 3 horas após foram submetidos à eutanásia para dissecação do encéfalo e a retirada de CF e HP, para análise da atividade da enzima nNOS. Os resultados comportamentais demonstraram haver sensibilização cruzada entre ECI e ET, tanto nos ADL quanto nos AD. O pré-tratamento com 7NI inibiu sensibilização cruzada entre ECI e ET em ADL e AD. O ET aumentou os níveis de CORT em ADL expostos ao ECI, enquanto nos AD, o aumento de CORT ocorreu após tratamento repetido com ET. Em relação à atividade da nNOS, houve aumento em HP e CF de AD submetidos ao ECI, com atividade atenuada por ET no desafio. Em CF de ADL a sensibilização cruzada aumentou a atividade da nNOS comparado com o tratamento repetido de ET. No estudo II, camundongos AD (n=10 cada) foram submetidos por 14 dias ao EI ou tratados com ET 1,8 g/kg ou SAL IP, 30 minutos após injeção de DZP 0,25 mg/kg. Os resultados demonstraram que DZP: apresentou sensibilização cruzada com ET, potencializou sensibilização cruzada entre EI e ET e diminuiu a atividade da nNOS em HP e CF de animais submetidos ao EI. Conclui-se que ECI e EI induzem sensibilização comportamental ao ET e nNOS participa na sensibilização cruzada entre ECI/EI e ET, bem como na sensibilização comportamental ao ET.

Palavras-chave: Sensibilização comportamental. Etanol. Estresse. Óxido nítrico sintase neuronal.

ABSTRACT

ROCHA, J. B. S. **Participation of nNOS enzyme in the cross-sensitization between stress and ethanol in Swiss mice.** 2013. 93 p. Ph. D. thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Drug consumption and the stress exposure are two interrelated conditions. The stress increases the propensity to drugs of abuse consumption and exist cross-sensitization between drugs and stress. Not only the behavioral sensitization to psychostimulants and depressants of the central nervous system (CNS), but stressing factors, alters the activity of the enzyme neuronal nitric oxide synthase (nNOS). On the first experimental design (study I), the objective of this work was to study behavioral alterations produced by ethanol (ET) and the chronic unpredictable stress (CUS) in adolescent (ADL) and adult (AD) mice, researching the nNOS participation in frontal cortex (FC) and hippocampus (HP). In the second experimental design (study II) we studied in AD mice if the dizocilpine (DZP) pre-treatment prevents behavioral sensitization against immobilization stress (IS) and the treatment with ET, so as the impact of these treatments on nNOS activity. In the study I, male Swiss ADL (25-28 days of age; n=12 animals/group) and AD mice (60 days of age; n=12 animals/group) were treated during 11 days with intraperitoneal injections (IP) of ET 1.8 g/kg, saline solution (SAL) or were submitted to the CUS. Basal, 15min and 3h after challenge blood samples were collected for corticosterone (CORT) dosage. Other three groups for behavioral analysis received IP 7-nitroindazole (7NI) 15 mg/kg 30min before SAL or ET injections. The CUS group received 7NI IP once *per* day or in the drinking water. On the 12th day the animals of each group were challenged with SAL or ET 1.8 g/kg and 3 hours later were euthanized for encephalic dissection for the FC and HP isolation for analyze nNOS activity. The behavioral results demonstrated the occurrence of cross-sensitization between CUS and ET, not only in the ADL, but in AD too. The 7NI pre-treatment inhibited cross-sensitization between CUS and ET in ADL and AD. The ET challenge after CUS increased CORT in ADL and the repeated ET treatment increased CORT in AD. In relation with the nNOS activity, occurred increase in AD HP and FC, with attenuated activity by ET challenge. In ADL FC, cross-sensitization increased nNOS activity compared with ET repeated treatment. In the study II AD mice (n=10) were submitted for 14 days to IS or treated, IP with ET 1.8 g/kg or SAL IP 30min after DZP 0.25 mg/kg injection. The results demonstrated that DZP: presented cross-sensitization with ET, potentiated cross-sensitization between IS and ET and reduced nNOS activity in HP and CF of the animals submitted to IS. In conclusion, CUS and IS induce behavioral sensitization to ET and nNOS participates in the cross-sensitization between CUS/IS and ET, as well as in behavioral sensitization to ET.

Keywords: Behavioral sensitization. Ethanol. Stress. Neuronal nitric oxide synthase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do circuito límbico.....24
Figura 2 - Sistema límbico e etanol atuando em hipocampo e córtex pré-frontal.....26
Figura 3 - Atividade locomotora de camundongos adolescentes (A) e adultos (B) no dia do desafio (12°dia), após injeção de salina ou etanol 1,8 g/kg.....51
Figura 4 - Dosagem de corticosterona por colorimetria de camundongos adolescentes (A) e adultos (B).....51
Figura 5 - Atividade de nNOS em hipocampo de camundongos adolescentes (A) e adultos (B).....53
Figura 6 - Atividade de nNOS em córtex frontal de camundongos adolescentes (A) e adultos (B).....54
Figura 7 - Atividade locomotora de camundongos adolescentes (A) e adultos (B) pré-tratados com 7NI no dia do desafio (12°dia).....56
Figura 8 - Atividade locomotora de camundongos Swiss machos adultos pré-tratados e não pré-tratados com DZP nos dias de habituação (H1 e H2), no primeiro dia de tratamento (D1) e no oitavo dia de tratamento (D8).....57
Figura 9 - Atividade locomotora de camundongos Swiss machos adultos no dia do desafio pré-tratados e não pré-tratados com DZP por 14 dias.....59
Figura 10 - Sensibilização cruzada entre estresse por imobilização e etanol em camundongos Swiss machos adultos.....60
Figura 11 - Atividade locomotora de camundongos Swiss machos adultos no dia do desafio pré-tratados e não pré-tratados com DZP antes de EI por 14 dias.....61
Figura 12 - Atividade locomotora em camundongos Swiss machos adultos expostos aos dias de habituação e pré-tratados com DZP 30 minutos antes do EI por 14 dias, desafiados com salina ou etanol.....62
Figura 13 - Atividade locomotora em camundongos Swiss machos adultos expostos aos dias de habituação e submetidos ao EI ou pré-tratados com DZP 30 minutos antes de EI por 14 dias, desafiados etanol.....63
Figura 14 - Atividade locomotora em D1 e D15 de camundongos Swiss machos adultos submetidos ao EI ou pré-tratados com DZP antes de EI.....64
Figura 15 - Atividade de nNOS em córtex frontal de camundongos Swiss machos adultos tratados com salina ou submetidos ao EI pré-tratados e não pré-tratados com DZP.....65

Figura 16 - Atividade de nNOS em hipocampo de camundongos Swiss machos adultos tratados com salina ou submetidos ao EI pré-tratados e não pré-tratados com DZP.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo de estresse crônico imprevisível com duração de 11 dias.....39

Tabela 2 - Grupos experimentais tratados e realizados no Experimento I, cujo objetivo foi observar o efeito agudo ou repetido de etanol, assim como o protocolo de estresse crônico imprevisível no período de 11 dias de tratamento. Os grupos foram separados de acordo com a idade e o tratamento ao qual foram submetidos. Os animais foram eutanasiados 3 horas após o teste (D12) em que receberam uma injeção de salina i.p. ou etanol 1,8 g/kg. AD (camundongos adultos); ADL (camundongos adolescentes). SAL/SAL (grupo controle); SAL/ET (tratamento agudo de etanol); ET/ET (tratamento crônico de etanol).....44

Tabela 3 - Nível de corticosterona no soro em três coletas em ambos: adolescentes (ADL) e adultos (AD). Dia 0: um dia antes de começar o tratamento com etanol ou injeções de salina, ou estresse crônico imprevisível; dia 12: 15 minutos após o desafio com salina ou etanol; dia 12: 180 minutos após o desafio com salina ou etanol.....52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
AD – adultos
ADL – adolescentes
ANOVA – análise de variância
AVTM – área ventral do tegmento mesencefálico
CREB – proteína de ligação ao elemento de resposta à adenosina monofosfato cíclico (AMPc)
CF – córtex frontal
CPF – córtex pré-frontal
CRF – hormônio regulador de corticotrofina
D1 – dia de tratamento 1
D8 – dia de tratamento 8
D12 – dia de tratamento 12 (dia do desafio)
D15 – dia de tratamento 15 (dia do desafio)
DA – dopamina
DMSO – dimetilsulfóxido
DSM-IV-TR – *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition text revised* (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 4ª edição texto revisado)
DTT - ditiotreitol
DZP – dizocilpina
ECI – estresse crônico imprevisível
EDTA – ácido etilenodiamino tetra acético
EGTA – ácido etilenoglicol tetra acético
EI – estresse por imobilização
ET – etanol
FAD – dinucleotídeo de flavina e adenina
FNM – mononucleotídeo de flavina
GABA – ácido gama-aminobutírico
GRs – receptores de glicocorticóides
H1 – dia de habituação 1
H2 – dia de habituação 2

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico

HP – hipocampo

HPA – hipotalâmico-pituitário adrenal

IP – intra-peritoneal

LTP – potenciação de longo prazo

MRs – receptores de mineralocorticóides

NAc – núcleo *accumbens*

NADPH – fostato de nucleotídeo de nicotinamida e adenina

7NI – 7-nitroindazol

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NMDA – N-metil-D-aspartato

OMS – Organização Mundial da Saúde

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

PEPS – potencial excitatório pós-sináptico

PIPS – potencial inibitório pós-sináptico

p-Npp - p-nitrofenil fosfato

PVN – núcleo paraventricular

S - estresse

SAL – salina

sIPSC - correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas

SLM - *stratum lacunosum moleculare*

SO - *stratum oriens*

SON – núcleo supraóptico

SNA – sistema nervoso autônomo

SNC – sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....20
2 RELAÇÃO ETANOL-ESTRESSE EM ESTUDOS DE ADIÇÃO.....22
2.1 Contextualização sobre o uso de etanol.....22
2.1.1 Etanol e circuito límbico.....23
2.2 Drogas de abuso e estresse.....26
2.2.1 Inter-relação entre estresse e sistema glutamatérgico/ óxido nítrico em estudos de adição ao etanol.....27
2.3 Hipótese da sensibilização comportamental.....30
2.3.1 Sensibilização comportamental ao etanol.....31
2.3.2 *Sensibilização comportamental ao etanol em camundongos adolescentes*.....32
2.3.3 Sensibilização cruzada: estresse e etanol.....34
3 OBJETIVOS.....36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....37
4.1 Animais.....37
4.2 Estudo I: Sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol em camundongos Swiss machos adolescentes e adultos.....37
4.2.1 Drogas/tratamento.....37
4.2.1.1 Etanol.....37
4.2.1.2 7-Nitroindazol.....37
4.2.2 Paradigma do estresse.....38
4.2.3 Procedimento comportamental: atividade dos animais em campo aberto.....40
4.2.4 Ensaios.....40
4.2.4.1 Dosagem da atividade da enzima nNOS.....40
4.2.4.2 Dosagem de corticosterona.....42
4.2.5 Análise dos resultados.....43
4.2.6 Delineamento experimental.....43
4.2.6.1 Experimento I - Estudo da sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol.....43
4.2.6.2 Experimento II - Envolvimento de nNOS em sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol.....45

4.3 Estudo II: Participação do sistema glutamatérgico/ óxido nítrico na sensibilização cruzada entre estresse por imobilização e etanol em camundongos Swiss machos adultos.....45
4.3.1 Drogas/tratamento.....45
4.3.1.1 Etanol.....45
4.3.1.2 Dizocilpina.....46
4.3.2 Paradigma do estresse.....46
4.3.3 Procedimento comportamental: atividade dos animais em campo aberto.....46
4.3.4 Ensaio.....47
4.3.4.1 Dosagem da atividade da enzima nNOS.....47
4.3.5 Análise dos resultados.....47
4.3.6 Delineamento experimental.....47
4.3.6.1 Experimento I - Efeitos do pré-tratamento com dizocilpina em estudo de sensibilização comportamental ao etanol.....47
4.3.6.2 Experimento II – Efeitos do estresse por imobilização em estudo de sensibilização comportamental ao etanol.....48
4.3.6.3 Experimento III - Efeitos do pré-tratamento com dizocilpina em sensibilização cruzada entre estresse e etanol.....48
4.3.6.4 Experimento IV - Atividade da nNOS em sensibilização cruzada entre estresse e etanol e diante do pré-tratamento com dizocilpina.....49
5 RESULTADOS.....50
5.1 Estudo I: Sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol em camundongos Swiss machos adolescentes e adultos.....50
5.1.1 Experimento I - Estudo da sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol.....50
5.1.1.1 O estresse crônico imprevisível induz sensibilização cruzada com etanol em camundongos adolescentes e adultos.....50
5.1.1.2 O tratamento crônico com etanol aumenta corticosterona em adultos, enquanto o etanol aumenta a corticosterona em adolescentes pré-expostos ao estresse.....51
5.1.2 Experimento II - Envolvimento de nNOS em sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol......53
5.1.2.1 Estresse aumenta a atividade de nNOS em hipocampo de adultos e o etanol atenua esse efeito.....53

5.1.2.2 Estresse aumenta a atividade de nNOS em córtex frontal de adultos, mas não de adolescentes, enquanto a sensibilização cruzada entre estresse e etanol induz um maior efeito sobre a nNOS em adolescentes.....54
5.1.2.3 7-nitroindazol inibe sensibilização cruzada entre estresse e etanol e a sensibilização ao etanol em adolescentes e adultos.....55
5.2 Estudo II: Participação do sistema glutamatérgico/ óxido nítrico na sensibilização cruzada entre estresse por imobilização e etanol em camundongos Swiss machos adultos.....56
5.2.1 Experimento I - Efeitos do pré-tratamento com dizocilpina em estudo de sensibilização comportamental ao etanol.....56
5.2.2 Experimento II – Efeitos do estresse por imobilização em estudo de sensibilização comportamental ao etanol.....59
5.2.2.1 Sensibilização cruzada entre estresse por imobilização e etanol.....59
5.2.3 Experimento III - Efeitos do pré-tratamento com dizocilpina em sensibilização cruzada entre estresse e etanol......60
5.2.3.1 Efeitos associados de dizocilpina e estresse são mantidos por desafio com etanol.....61
5.2.3.2 Dizocilpina potencializa sensibilização cruzada entre estresse e etanol.....62
5.2.4 Experimento IV - Atividade da nNOS em sensibilização cruzada entre estresse e etanol e diante do pré-tratamento com dizocilpina.....64
5.2.4.1 Dizocilpina atenua a atividade de nNOS induzida pelo desafio com etanol após estresse, em córtex frontal e hipocampo.....64
6 DISCUSSÃO.....67
6.1 Estudo I: Sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol em camundongos Swiss machos adolescentes e adultos.....67
6.2 Estudo II: Participação do sistema glutamatérgico/ óxido nítrico na sensibilização cruzada entre estresse por imobilização e etanol em camundongos Swiss machos adultos.....74
7 CONCLUSÕES.....79
REFERÊNCIAS.....80

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade, a íntima relação entre o consumo de drogas de abuso e estresse é justificada, em partes, pelo cotidiano da vida moderna. Notável é o crescente abuso de substâncias lícitas, como o etanol, para aliviar o cansaço, o excesso de trabalho e as preocupações do dia-a-dia. Um episódio social frequente que demonstra o uso de etanol, com propósito recreacional após um dia de trabalho é o *happy hour*. O consumo de etanol é reconhecido na sociedade atual como sinônimo de comemoração, diversão e relaxamento. Um exemplo disto são as propagandas que associam o consumo de etanol com festa, alegria, imbuída por um clima de diversão. A problemática do uso recreacional é observada quando o consumo de um indivíduo tem um aumento na frequência de uso. O reflexo desta problemática é vivenciado em ambientes familiares, com consequências no contexto 'família', conduzindo ao absenteísmo e à violência doméstica. Este consumo é agravado quando outras questões bio-psicossociais estão relacionadas, como exemplo: o desemprego. Tal situação é claramente uma representação do estresse que aflige lares, e as preocupações decorrentes deste fato conduzem ao aumento do consumo de álcool e de cigarro para aliviar a tensão.

A utilização precoce de etanol e outras drogas com potencial abusivo têm origem em adulto consumidor, como referência à criança e ao adolescente. De modo complementar, crianças que na infância vivenciaram situações de estresse, como o abuso sexual na família e outro tipo de agressão, são mais vulneráveis ao consumo de etanol e outras drogas na adolescência (MONCRIEFF et al., 1996; SARTOR et al., 2013; SCHÄFER et al., 2010; STEWART, BROWN, 1995; TAPERT et al., 1999). Com isto, podemos refletir sobre a associação estresse e etanol no crescente conflito de uso e abuso de drogas, discutida pela influência do estresse no aumento do consumo de drogas de abuso. Por outro lado, esta associação nos faz refletir se o etanol aumenta o estresse. Quando falamos de estresse, vale ressaltar que há um sistema endógeno conduzindo ao aumento de hormônios deste circuito. A explicação detalhada sobre este sistema será apresentada em seções posteriores.

Do ponto de vista neuroquímico, estudos que convergem à relação entre etanol e sua atuação na neurotransmissão glutamatérgica são considerados importantes na elucidação e novas perspectivas de intervenção farmacológica à dependência, uma

vez que o abuso de etanol é tido como um dos principais problemas de Saúde Pública no Brasil e no mundo. Outro fator do mundo moderno que também está relacionado com alterações neuroquímicas é o estresse.

Uma investigação dos fatores bioquímicos intracelulares envolvidos com a neurotransmissão glutamatérgica, constitui um caminho a ser percorrido para contribuir em estudos de dependência ao etanol e a relação existente com o estresse.

Dentre os fatores investigados, está a via do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA)/ óxido nítrico (NO) através de intervenções farmacológicas e ensaios bioquímicos específicos.

O papel dos receptores NMDA no modelo de sensibilização ao etanol merece ser elucidado, uma vez que o etanol aumenta a sensibilidade dos receptores pós-sinápticos em quadros de dependência e a ativação deste receptor aumenta a produção do NO. Há vários trabalhos demonstrando alterações na composição do receptor NMDA por etanol. Diante da administração crônica de etanol, há um aumento da expressão das subunidades NR1, NR2A e NR2B do receptor NMDA no córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HP) de ratos e camundongos (KALLURI et al., 1998; NAGY et al., 2002; TREVISAN et al., 1994).

Considerando a participação do NO na plasticidade neuronal em situações de estresse e diante da utilização de drogas de abuso, um dos objetivos desse estudo é avaliar a participação do NO na sensibilização comportamental ao etanol e na sensibilização cruzada entre estresse e etanol em adolescentes e adultos.

Este trabalho tem o propósito de discutir a relação estresse-etanol, por evidências de que ambos atuam nas mesmas vias cerebrais colaborando ao aumento de procura por uma droga e, logo, o aumento do consumo, neste caso, de etanol.

2 RELAÇÃO ETANOL-ESTRESSE EM ESTUDOS DE ADIÇÃO

2.1 Contextualização sobre o uso de etanol

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a dependência ao álcool e as suas consequências representam a terceira causa de mortes no mundo. No Brasil, de acordo com estimativa da Associação Brasileira de Estudo do Álcool e Outras Drogas (ABEAD), 10% da população (cerca de 19 milhões) é representada por dependentes de álcool. Em média, trinta e duas mil mortes por ano estão relacionadas às doenças causadas pelo alcoolismo. De acordo com o Ministério da Previdência Social, entre janeiro e setembro de 2011, 31,8 mil pessoas solicitaram licença médica por dependência química, caracterizando 23% a mais do que o mesmo período no ano anterior. Neste ínterim, o álcool representa 33,5% dos afastamentos e associado a outras drogas representa 48,7%. Estes dados recentes confirmam a necessidade de estudos sobre álcool, bem como programas de prevenção evitando a utilização precoce, por ser considerado um grave problema de Saúde Pública. Em 2011, o governo do estado de São Paulo, instituiu normativamente proibição de venda de bebidas alcoólicas para menores de dezoito anos.

Diante da utilização prolongada de etanol, acompanhando a dependência, ocorrem fenômenos como: neuroadaptação (tolerância e dependência) e neurodegeneração (FADDA; ROSSETTI, 1998b). Antes de prosseguir com os mecanismos neuroquímicos que buscam justificar as consequências da utilização de álcool, vale diferenciar os conceitos: abuso e dependência. De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 4ª edição texto revisado (DSM-IV-TR; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000), abuso é um padrão mal adaptado manifestado por consequências adversas recorrentes e significativas devidas ao uso repetido da substância. Já dependência, também de acordo com o DSM-IV-TR, é demonstrada por um conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que indicam que o indivíduo perdeu o controle do uso da droga e continua a usar a substância apesar das consequências adversas deste uso. Evidentemente, os conceitos se entrelaçam à medida que uma condição

abusiva facilmente é conduzida ao estado de dependência. Inseridos nos critérios do DSM-IV-TR para dependência de substâncias estão tolerância e abstinência.

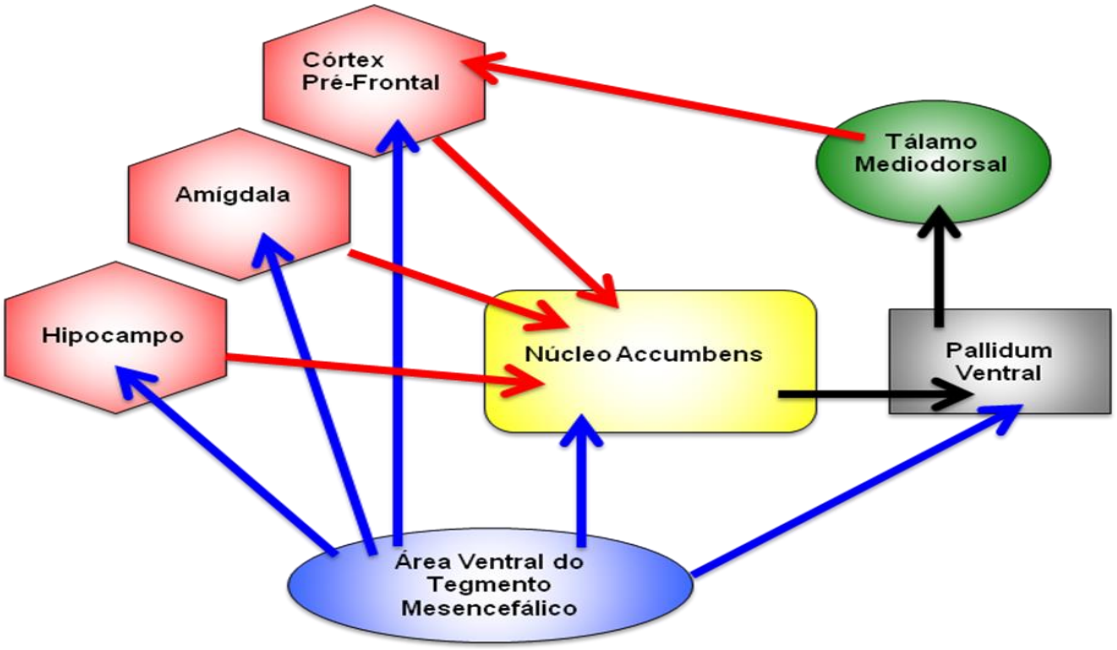
Compondo outra importante reflexão, está transição do uso para o abuso de uma substância com potencial em causar dependência. O limite entre ambos é difícil de determinar, mas, o registro conceitual de adição a uma droga é marcado por distúrbios impulsivos, bem como distúrbios compulsivos. Os distúrbios impulsivos são amplamente associados com mecanismos de reforço positivo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000). Ao contrário, distúrbios compulsivos são caracterizados por ansiedade e estresse antes de repetitivo comportamento compulsivo e alívio de estresse por comportamento compulsivo. Assim, desordens compulsivas são intensamente associadas com mecanismos de reforço negativo. Colapsos dos ciclos de impulsividade e compulsividade produzem um ciclo de adição composto por três estágios: (1) “binge” (consumo excessivo)/intoxicação, (2) retirada/afeto negativo, (3) preocupação/antecipação. A impulsividade frequentemente predomina nos estágios precoces e a impulsividade combinada com compulsividade predomina nos estágios tardios. A transferência da impulsividade para compulsividade implica em deslocamento do reforço positivo guiado por comportamento motivado para o reforço negativo guiado por comportamento motivado (KOOB, 2004; KOOB; LE MOAL, 1997; KOOB; VOLKOW, 2010). Estes três estágios são conceituados interagindo um com o outro, tornando-se mais intensos e finalmente levando ao estado patológico conhecido como adição (KOOB; LE MOAL, 1997; KOOB; VOLKOW, 2010). A transição do uso ocasional de etanol para o abuso envolve neuroplasticidade em todos estes elementos, podendo começar com uso inicial em indivíduos vulneráveis ou em períodos de desenvolvimento particularmente vulnerável, como na adolescência (KOOB et al., 2008).

2.1.1 Etanol e circuito límbico

Correlacionando os três estágios mencionados na seção anterior com o circuito límbico, pode-se estabelecer um raciocínio para entender neuroplasticidade e elaborar hipóteses para estudos com drogas de abuso e mecanismos que conduzem à dependência. O circuito ou sistema límbico é caracterizado por conexão de algumas regiões neuronais, com aferências e eferências de neurotransmissões e

neurotransmissores interconectados. Há projeções dopaminérgicas desde a área ventral do tegmento mesencefálico (AVTM) até hipocampo (HP), amígdala, córtex pré-frontal (CPF), núcleo *accumbens* (NAc) e *pallidum* ventral. Já HP, amígdala e CPF apresentam projeções glutamatérgicas até o NAc. O NAc por sua vez apresenta projeção gabaérgica até o *pallidum* ventral. O *pallidum* ventral tem projeção gabaérgica até o tálamo medial dorsal, e este apresenta projeção glutamatérgica até o CPF. Este é o circuito límbico, bem descrito por Pierce e Kumaresan (2006), conforme demonstra a figura 1. O etanol atua direta ou indiretamente neste circuito.

Figura 1 – Representação esquemática do circuito límbico.

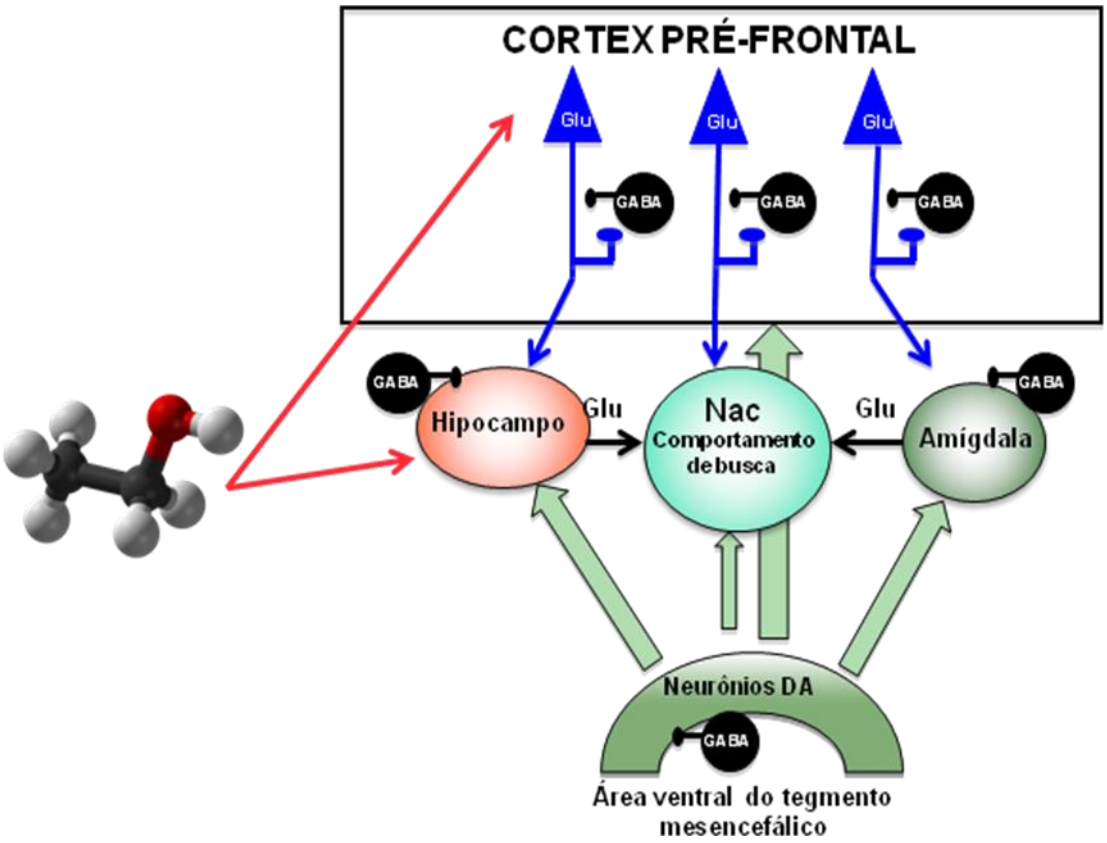


As projeções neuronais dopaminérgicas são representadas por setas azuis, as projeções glutamatérgicas por setas vermelhas e as projeções gabaérgicas por setas pretas.
Fonte: Adaptado de Pierce e Kumaresan, 2006.

Neste trabalho, elegemos CPF e HP para estudar os efeitos do etanol. Nestas regiões, conforme demonstra a figura 2, para o etanol, os fenômenos relacionados com adição fundamentam-se principalmente por alterações em neurotransmissões glutamatérgica, dopaminérgica e interneurônios gabaérgicos, com as neurotransmissões relacionadas ao potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) e os interneurônios com potencial inibitório pós-sináptico (PIPS). Nestas vias, o etanol

atua como um inibidor alostérico do receptor glutamatérgico NMDA (LOVINGER et al., 1989), aumenta liberação de dopamina (DA) e por consequência exacerba esta neurotransmissão, e atua como agonista de receptor gabaérgico (PALMER; HOFFER, 1990). O bloqueio repetido de receptor glutamatérgico pelo etanol resulta em resposta neuroadaptativa dos receptores e hiperexcitabilidade neuronal, confirmada com a retirada da administração crônica de etanol (FADDA; ROSSETTI, 1998a; RIPLEY; LITTLE, 1995). O reflexo desta situação é evidenciado, por exemplo, com projeções glutamatérgicas inibitórias sob os receptores pré-sinápticos dopaminérgicos no NAc. Na retirada diante de utilização crônica do etanol, há um aumento ou *up regulation* de receptores NMDA pós-sinápticos, resultando em diminuição de efeito glutamatérgico de projeção neuronal oriunda do CPF ao NAc. Com isto, observa-se um aumento da liberação de DA e as consequências desta neurotransmissão no NAc, relacionadas com o processo de adição ao etanol. De modo complementar, o CPF é uma importante região relacionada com o comportamento de busca de uma droga, denominado *craving* ou fissura, e ao enviar aferências glutamatérgicas para o NAc e também AVTM, correlaciona-se com a indução e expressão da sensibilização comportamental, respectivamente, pois estas regiões estão envolvidas com tais fenômenos. Portanto, vias glutamatérgicas do CPF modulam a atividade de células da dopamina na AVTM e no NAc (SUTO et al., 2003; VANDERSCHUREN; KALIVAS, 2000).

Figura 2 - Sistema límbico e etanol atuando em hipocampo e córtex pré-frontal



Fonte: Arco e Mora, 2009 e Revisões: Clay et al., 2008; Heinz et al., 2009; Koob et al., 1998; Koob, 2004; Popova, 1981.

Nestas regiões do sistema límbico escolhidas para estudo, a participação do receptor NMDA será destacada pela relação com o NO, estudado pela atividade da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), com explicação detalhada em seções posteriores.

2.2 Drogas de abuso e estresse

A relação entre drogas de abuso e estresse motiva a construção deste trabalho por congruência de fatores que norteiam a atuação de ambos em vias neuronais que conduzem ao consumo descontrolado, à busca pela droga e ao estado de dependência.

Em humanos, o consumo de uma droga com potencial abusivo começa com a utilização recreacional, e seguida de situações estressantes, passa a ser uma fuga para os problemas, passando à alternativa em mascarar um problema preexistente.

Desde a primeira definição de estresse por Selye (1936) fundamentada como a síndrome geral de adaptação, em que esforços repetitivos e persistentes são capazes de causar alterações no estado de homeostase, gerando uma resposta do organismo; compreende-se tal fenômeno como uma resposta necessária à manutenção da vida do organismo (SARDÁ et al., 2004). Transpondo este termo para aplicação em ciências médicas e biológicas, representa esforço de adaptação do organismo para enfrentar situações que considere ameaçadoras à vida e ao equilíbrio endógeno. A resposta ao estresse permite o enfrentamento de situações ameaçadoras com conexão de componentes neurovegetativos, endócrinos e comportamentais (CHARMANDARI et al., 2005; CHROUSOS; GOLD, 1992). Diante de situações de perigo à homeostase, ocorrem respostas adaptativas, físicas e mentais que se contrapõem aos efeitos de estímulos de estresse na tentativa de restabelecer o equilíbrio (CHROUSOS; GOLD, 1992; LÓPEZ et al., 1999).

Diante de estímulos estressores, como ocorre no estresse crônico imprevisível em animais e humanos, há situações de estresse físico e estresse psicológico. Enquanto este requer o sistema límbico ao armazenamento e ao processamento da informação, por antecipação de um problema gerado pelo medo (BAFFI et al., 1996; CHEN; HERBERT, 1995; CULLINAN et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 2002; SAPOLSKY et al., 1991); aquele, dependendo da intensidade do estímulo, aumenta diretamente a liberação de glicocorticóides e ativa o sistema nervoso autônomo (SNA) simpático (PALKOVITS et al., 1999). Assim, pode-se começar a relacionar os efeitos de resposta ao estresse com efeitos de drogas de abuso. Por um lado, porque o sistema límbico requerido em situações de estresse psicológico também é requerido para os efeitos de uma droga de abuso. Por outro lado, porque os glicocorticóides e neurotransmissores do SNA simpático atuam no circuito límbico, com uma resposta exagerada causada por estresse, especialmente sob neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica.

2.2.1 Inter-relação entre estresse e sistema glutamatérgico/ óxido nítrico em estudos de adição ao etanol

Há uma abundância de evidências sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica esteja envolvida em respostas adaptativas da patogênese de

dependência ao etanol (CHANDLER et al., 1993; FREED; MICHAELIS, 1978; IORIO et al., 1992), corroboradas pelo antagonismo do receptor NMDA. Nagy e László (2002) confirmaram tais evidências através de um modelo *in vitro* onde houve um aumento de sensibilidade dos receptores NMDA em culturas primárias de neurônios corticais após pré-tratamento com etanol.

Vale ressaltar a estrutura do receptor NMDA, bem como as subunidades deste receptor, para que seja estabelecido um raciocínio quanto ao efeito do etanol e a relação com o sistema de sinalização intracelular que envolve a atividade da enzima nNOS. Os receptores NMDA são caracterizados pelo bloqueio voltagem-dependente do íon Mg^{2+} e a alta permeabilidade ao Ca^{2+}. Estes receptores são compostos por duas subunidades: a subunidade fundamental NR1, que se complexa com uma das quatro subunidades NR2: NR2A, NR2B, NR2C e NR2D. A subunidade NR1 é distribuída de forma generalizada, enquanto que os subtipos de subunidade NR2 apresentam uma seletividade sobre determinadas regiões cerebrais (BEAL, 1995; OZAWA et al., 1998). A subunidade NR2A é considerada altamente expressa diante dos efeitos do etanol (RON; WANG, 2009).

Neste trabalho o foco é estudar alterações da via do receptor NMDA/ NO com a participação da enzima nNOS, uma vez que a dependência produzida por etanol está, em parte, associada às alterações neste sistema (NAGY et al., 2002).

Vários estudos mostram o papel do NO na plasticidade sináptica e na potenciação de longo prazo (LTP). O NO age como segundo mensageiro e regula a liberação de vários neurotransmissores, dentre eles, a dopamina e o glutamato (SCHULMAN, 1976). Para o glutamato ocorre via receptor NMDA. Como já mencionado, esses dois neurotransmissores estão envolvidos na sensibilização comportamental; e o NO tem um papel importante nesse fenômeno, uma vez que animais nocautes da nNOS – nNOS $^{(-/-)}$ não desenvolvem sensibilização comportamental à cocaína (ITZHAK et al., 1998) e ao etanol (ITZHAK et al., 2008).

A isoforma nNOS, com estado de fosforilação modulado por receptor NMDA (SNYDER; DAWSON, 1995), está localizada em discretas áreas cerebrais, incluindo HP, CPF, NAc e os núcleos: paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) do hipotálamo (BREDT et al., 1990; BREDT et al., 1992; GROSSMAN et al., 1994; YAMADA et al., 1995). Estes núcleos têm neurônios contendo hormônio regulador de corticotrofina (CRF). Em resposta ao estímulo pela liberação de CRF

(primariamente dos neurônios do PVN), a pituitária anterior secreta hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) dentro do sistema hipofisal portal. Durante a resposta ao estresse, ACTH atua sob o córtex adrenal para estimular a produção e secreção de glicocorticóides (NELSON et al., 1997). Na resposta ao estresse crônico, o aumento expressivo na produção de glicocorticóides demonstra desregulação e descontrole no funcionamento do eixo HPA. Weidenfeld et al. (1999) têm demonstrado que o NO está envolvido na modulação de respostas do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) a estímulos, e o sítio redox modulatório do receptor NMDA parece ser uma estrutura importante no controle do eixo HPA (RIEDEL, 2000).

Assim, sugere-se o envolvimento de NO na modulação de respostas do eixo HPA a estímulos neuronais não dependentes de fatores imunes. Portanto, a enzima nNOS participa mediando os efeitos do NO em inibição de secreção hipotalâmica.

Em estudos de adição ao etanol associados ao estresse, trabalhos têm demonstrado que receptores de CRF estão colocalizados com receptores NMDA em neurônios glutamatérgicos de HP (LEE et al., 1993; SHENG et al., 2008), além de outras regiões neuronais, como exemplo amígdala. As ações biológicas de CRF endógeno são mediadas por dois subtipos de receptores: CRF_1 e CRF_2, cada um com variações de ligantes, padrões de expressão e funções fisiológicas diferentes (DAUTZENBERG; HAUGER, 2002; REUL; HOBSBOER, 2002; ZORRILA; KOOB, 2005). CRF potencializa transmissão sináptica mediada por NMDA via ativação de receptor CRF_2 pós-sináptico (UNGLESS et al., 2003). Como consequência, sinalizações intracelulares são ativadas. Uma das sinalizações, que compõe a via escolhida para estudo neste trabalho, é a via do óxido nítrico, mediado pela enzima nNOS. Além disto, em resposta ao estresse ocorre um aumento na expressão de receptores de glicocorticóides (GRs) e mineralocorticóides (MRs) em regiões como HP e CPF. Os MRs têm aumento de expressão em condições basais de estresse, enquanto os GRs têm aumento de expressão em condições estressantes (VENDRUSCOLO et al., 2012). Por esta razão, a natureza, a intensidade e o tipo de estresse são fatores fundamentais que devem ser considerados em estudos de adição ao etanol, na compreensão de vias comuns envolvidas com o desenvolvimento da sensibilização comportamental.

2.3 Hipótese da sensibilização comportamental

A produção dos efeitos estimulantes do etanol é evidenciada com baixas doses consumidas. O limite para visualizar tais efeitos deve ser bem definido pela dose, aliada ao tempo de consumo. Na projeção destes efeitos, o modelo animal e a idade representam fatores importantes às características físicas estimulantes a serem observadas.

O desenvolvimento da dependência ao álcool está, em parte, associado à sensibilidade do indivíduo aos efeitos comportamentais e subjetivos do etanol. Trabalhos de Schuckit (1984, 1994) mostram que pessoas que apresentam maior predisposição ao alcoolismo são mais sensíveis aos efeitos estimulantes do etanol e menos sensíveis aos efeitos depressores. A sensibilidade aos efeitos do etanol, em modelos animais, pode ser medida pelos seus efeitos estimulantes, de ataxia e sedativos locomotores (BREESE et al., 1985; CRABBE, 1983).

Enfatizando os efeitos estimulantes em modelos animais, Masur e Boerngen (1980) confirmaram que o tratamento repetido com etanol aumenta a sensibilidade aos efeitos estimulantes locomotores do etanol, fenômeno conhecido como sensibilização comportamental.

A teoria da sensibilização comportamental enfatiza componentes de aprendizagem associativa, propondo que a dependência é o resultado da potência eliciadora de estímulos condicionados aos efeitos da droga. Alguns pesquisadores sugerem que a sensibilização esteja relacionada a seus efeitos reforçadores e estimulantes (BOWERS et al., 2004; KALIVAS et al., 1998; ROBINSON; BERRIDGE, 1993) e a neuroadaptações que tornam circuitos neurais hipersensíveis de forma a resultar em níveis patológicos da saliência do incentivo atribuída às drogas ou a pistas associadas a drogas. Deve-se enfatizar que tanto a estimulação quanto à sensibilização induzida pelo etanol ocorre devido à interação desta droga com vários sistemas de neurotransmissão, incluindo aqueles modulados por receptores NMDA (MEYER; PHILLIPS, 2003). Um trabalho do grupo demonstrou que o antagonista de receptor NMDA, MK-801, inibe a sensibilização ao etanol (CAMARINI et al., 2000) quando há pareamento da droga com campo aberto, sugerindo a participação deste sistema no componente condicionado da sensibilização.

2.3.1 Sensibilização comportamental ao etanol

A exposição repetida ao etanol, em doses baixas (1,8 – 2,0 g/kg), induz um aumento progressivo na atividade locomotora de camundongos. Esse aumento sinaliza a ocorrência de sensibilização locomotora, fenômeno o qual tem sido ligado a alterações moleculares correspondentes ao processo de dependência.

Alterações funcionais no sistema dopaminérgico *mesoaccumbens* têm sido muito estudadas para compreender o desenvolvimento da sensibilização, e incluem: aumento da concentração de DA extracelular no NAc, subsensibilidade de autorreceptores localizados nos corpos celulares dopaminérgicos da AVTM e supersensibilidade de receptores de DA do tipo 1 (D_1) no NAc (KALIVAS; STEWART, 1991). A sensibilização comportamental parece ser mediada principalmente pelo sistema dopaminérgico mesolímbico. Este fenômeno apresenta dois componentes: o desenvolvimento e a expressão. Define-se desenvolvimento como um termo operacional referente aos efeitos moleculares e/ou celulares imediatos que induzem a sensibilização. A expressão refere-se às consequências prolongadas desses efeitos.

Entretanto, não só o sistema dopaminérgico está implicado nesse processo. Estudos de nosso laboratório mostraram que a naloxona, um antagonista opióide (CAMARINI et al., 2000b) e o MK-801, um antagonista de receptor NMDA (CAMARINI et al., 2000a) foram capazes de bloquear o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol, evidenciando a participação desses dois sistemas na sensibilização ao etanol.

Um foco também muito importante nos estudos sobre sensibilização é a influência do aprendizado e condicionamento nesse fenômeno (STEWART; VEZINA, 1988). A sensibilização comportamental é parcialmente atribuída à aprendizagem de uma associação entre o efeito farmacológico produzido pela droga e o ambiente onde é experimentada, ou seja, pode envolver condicionamento Pavloviano (STEWART et al., 1984). Entretanto, o grau em que o condicionamento das pistas contextuais influencia na sensibilização comportamental ao etanol é controverso. Enquanto alguns trabalhos concordam que a sensibilização ao etanol seja preferencialmente dependente de condicionamento (CAMARINI et al., 2000a;

CUNNINGHAM; NOBLE, 1992), outros mostram que esse fator pode não ser essencial (PHILLIPS et al., 1995).

Considerando que antagonistas de NMDA interferem com alguns tipos de aprendizagem (MALENFANT et al., 1991), é questionável se o MK-801, também denominado dizocilpina (antagonista não-seletivo de receptor NMDA), interfere diretamente na sensibilização comportamental ao etanol, ou se age na aprendizagem determinante do condicionamento associado à sensibilização (CAMARINI et al., 2000a).

Nosso laboratório tem usado a sensibilização comportamental como principal ferramenta para o estudo das alterações neuroadaptativas que permeiam a dependência (CAMARINI et al., 1995, 2000a, b, 2001; CAMARINI; HODGE, 2004), por ser um fenômeno associado à perda de controle do beber (HUNT; LANDS, 1992).

Nossas pesquisas têm procurado esclarecer os mecanismos envolvidos nas diferenças comportamentais e neuroquímicas entre animais adolescentes e adultos em resposta ao etanol.

2.3.2 Sensibilização comportamental ao etanol em camundongos adolescentes

Dados preliminares mostraram que camundongos DBA/2J adolescentes não apresentam o fenômeno de sensibilização comportamental ao etanol (CAMARINI et al., 2000c). Isso foi curioso, já que camundongos DBA são classicamente usados em estudos de sensibilização ao etanol, devido à alta vulnerabilidade para o desenvolvimento de sensibilização comportamental ao etanol. Mais recentemente, mostramos diferenças comportamentais e neuroquímicas entre animais tratados com etanol durante a adolescência ou na vida adulta (CARRARA-NASCIMENTO et al., 2012; CARRARA-NASCIMENTO et al., 2013; FARIA et al., 2008). Nesse estudo, usamos camundongos Swiss. Essa linhagem tem sido amplamente usada por vários laboratórios de pesquisa no Brasil que estudam sensibilização comportamental ao etanol, a qual apresenta uma grande variabilidade na resposta ao tratamento com etanol (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000; MASUR et al., 1989; QUADROS et al., 2002). Em nosso estudo, camundongos adolescentes e adultos

receberam etanol em um regime pareado ou não a pistas ambientais (CAMARINI et al., 2000a; FARIA et al., 2008). O desenvolvimento da sensibilização é facilitado quando o animal recebe a droga pareada a estímulos ambientais (conhecido como sensibilização condicionada). A associação da droga ao ambiente é conseguida quando administramos a droga ao animal e, logo em seguida, o mesmo é exposto a um determinado ambiente. Dessa forma, ele passa a associar os efeitos da droga com as pistas presentes nesse ambiente. Esse pareamento ambiental pode disparar comportamentos de fissura pela droga, assim como desejo de procura pela mesma. Os resultados de nossa pesquisa, no entanto, mostraram que enquanto os adultos sensibilizaram aos efeitos estimulantes do etanol, os adolescentes apresentaram tolerância (FARIA et al., 2008). Os dados mostraram também que, de um modo geral, a exposição repetida ao etanol produziu dessensibilização na expressão de c-Fos no CPF e NAc nos adolescentes, mas não nos adultos. Entretanto, a exposição repetida ao etanol produziu uma dessensibilização da expressão de c-Fos no HP de animais adultos que apresentaram sensibilização condicionada. Isso não foi observado nos adolescentes tratados repetidamente com etanol (FARIA et al., 2008). A dessensibilização de fatores de transcrição (CREB, c-Fos) tem sido ligada a aspectos da dependência (MATTSON et al., 2005).

Relatos sobre as consequências neurodegenerativas do uso de etanol mostram que o cérebro de ratos adolescentes apresenta uma sensibilidade diferencial aos efeitos deletérios induzidos por essa droga (CREWS et al., 2000). A administração repetida de etanol em ratos adolescentes aumenta a susceptibilidade aos seus efeitos prejudiciais sobre a memória no período da adolescência (MARKWIESE et al., 1998) e na vida adulta (WHITE et al., 2000). Uma exposição prolongada ao etanol pode levar à neurotoxicidade no HP (HUNT, 1993), uma região cerebral intimamente envolvida em memória espacial (OLTON, 1983). O etanol bloqueia a ativação de receptores NMDA no HP (LOVINGER et al., 1990) e esse efeito é mais evidente durante a adolescência (SWARTZWELDER et al., 1995). Thomas et al. (1997) sugeriram que a neurotoxicidade devido à hiperexcitabilidade de receptores NMDA poderia explicar os déficits cognitivos produzidos pela exposição ao etanol. Uma vez que o etanol suprime a atividade mediada pelo NMDA, de forma mais efetiva, no HP de animais adolescentes comparado com adultos (SWARTZWELDER et al., 1995), é possível que os períodos de rebote da hiperexcitabilidade também

sejam mais graves em adolescentes do que em adultos. Dessa forma, resultaria em uma neurotoxicidade hipocampal maior. Esses danos poderiam tornar a função hipocampal dos animais adolescentes mais vulneráveis a quaisquer excessos, inclusive exposição ao etanol ou outra droga de abuso.

O NMDA participa de algumas formas de plasticidade neuronal, como a LTP, fenômeno considerado como modelo de aprendizagem, e a sensibilização comportamental, que está associada à perda de controle do consumo de álcool. O etanol inibe a indução da LTP hipocampal de forma mais potente em ratos adolescentes do que em adultos (PYAPALI et al., 1999).

Ainda, a síndrome de abstinência alcoólica é resultante de uma resposta adaptativa do SNC aos efeitos intoxicantes do etanol, que se expressa por uma hiperexcitabilidade generalizada. Dados bioquímicos mostram que a retirada do etanol, após tratamento prolongado, resulta em um aumento no número de receptores NMDA no HP de camundongos C57BL/6 (GRANT et al., 1990). Isso indica uma adaptação compensatória desse sistema em decorrência da inibição dos receptores NMDA pelo etanol e pode ter uma importância fundamental em alguns sintomas de abstinência, como a hiperexcitabilidade e convulsão. O sistema glutamatérgico, especialmente a complexa estrutura do receptor NMDA, tem um papel importante não só nos efeitos deletérios do etanol relacionados à memória, como também nos sintomas da síndrome de abstinência alcoólica (HUNT, 1993) e na sensibilização comportamental ao etanol, como mostram pesquisas de nosso laboratório (CAMARINI et al., 2000a) em camundongos adolescentes.

2.3.3 Sensibilização cruzada: estresse e etanol

Estudos de modelos comportamentais aplicados em animais compõem uma estratégia para desvendar mecanismos neuronais relacionados com o desenvolvimento de dependência ao etanol. Neste sentido, a sensibilização cruzada foi o modelo escolhido para estudar os efeitos do etanol sobre outro estímulo relacionado à dependência, como o estresse.

Dois modelos animais muito usados para estudar efeitos reforçadores ou neuroadaptações induzidas por drogas de abuso são a auto-administração e a sensibilização comportamental. Vários trabalhos têm demonstrado que o estresse

aumenta a propensão à auto-administração de drogas de abuso e que existe sensibilização cruzada entre drogas e estresse (RICHARDSON et al., 2008). Os fenômenos comportamentais de sensibilização cruzada são consistentes com a existência de comuns adaptações moleculares subjacentes a este fenômeno, como *upregulation* de receptores NMDA e interação com glicocorticóides por meio do receptor CRF (PRENDERGAST; MULHOLLAND, 2012).

Além dos sistemas mencionados, o eixo HPA tem papel importante na sensibilização. O CRF é liberado pelo hipotálamo e amígdala em resposta ao estresse. O CRF regula a liberação de glicocorticóides na corrente sanguínea, a partir da glândula pituitária e córtex da adrenal. A exposição a uma variedade de estressores pode promover sensibilização ao efeito das drogas, com implicação no sistema hipotálamo-pituitária-adrenal, mediado pelo CRF. Por exemplo, hormônios de estresse liberados pelo córtex da adrenal (corticosteróides) têm sido implicados no aumento da resposta locomotora observada em camundongos após a administração de baixas doses de etanol (ROBERTS et al., 1995).

Assim como o etanol, a exposição a estímulos estressores também aumenta a liberação de DA no NAc (KOOB, 2008). Portanto, há uma confluência desses estímulos sobre o sistema dopaminérgico. Dessa forma, a sensibilização cruzada poderia ser explicada por esse efeito comum do etanol e estresse sobre o sistema dopaminérgico. Entretanto, como já mencionado anteriormente, não só o sistema dopaminérgico parece estar envolvido nesse fenômeno, uma vez que tanto o etanol quanto o estresse alteram a transmissão glutamatérgica (KOOB et al., 1998). Tem sido amplamente estudado o papel do sistema glutamatérgico nos processos neuroadaptativos que permeiam a dependência (FELTENSTEIN; SEE, 2008).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo principal estudar a participação do sistema glutamatérgico/ óxido nítrico na sensibilização cruzada entre estresse e etanol.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é investigar a sensibilização cruzada entre estresse e etanol em camundongos machos Swiss, avaliando a participação do sistema glutamatérgico através do receptor NMDA e a relação com o NO, mediado pela enzima nNOS.

Para tanto, o trabalho foi dividido em dois estudos:

a) sensibilização comportamental ao etanol e sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol em camundongos adolescentes e adultos: participação da enzima nNOS em córtex frontal (CF) e HP;
b) sensibilização comportamental ao etanol e sensibilização cruzada entre estresse por imobilização (EI) e etanol em camundongos adultos: participação do receptor NMDA e da enzima nNOS em CF e HP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss, adolescentes (entre 25 e 28 dias de idade) e adultos (com 60 dias de idade), fornecidos pelo Biotério do Departamento de Farmacologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
Os animais foram alojados em grupos de cinco animais, em caixas de policarbonato (30 x 20 x 12,5 cm), mantidos sob temperatura constante (22 $\pm$ 1^{o} C) e sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7h00).

4.2 Estudo I: Sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol em camundongos adolescentes e adultos

4.2.1 Drogas/ tratamento

4.2.1.1 Etanol

O etanol (ET, 95% vol/vol, Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil) foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) para produzir uma solução de etanol 12% v/v e foi administrada em uma dose de 1,8 g/kg. Os animais controles receberam volumes equivalentes de salina. Todas as injeções foram administradas por via intra-peritoneal (IP).

4.2.1.2 7-Nitroindazol

O 7-nitroindazol (7NI), um inibidor seletivo da enzima nNOS, foi preparado em uma solução com dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol e água na proporção 1:3:6, para solubilização. A administração foi intra-peritoneal na dose 15 mg/kg. O grupo submetido ao estresse crônico imprevisível (ECI) também recebeu 7NI em água de beber, diariamente preparada em uma solução de 50mL de água, com a dose 15mg/kg por animal, em caixas com quatro camundongos.

4.2.2 Paradigma do estresse

Durante o estresse crônico imprevisível os animais foram submetidos a um ou dois tipos diferentes de estresse a cada dia durante 11 dias, conforme mostra a tabela 1, adaptado de Ortiz et al. (1996). Esse modelo utiliza diferentes tipos de estresse, com intensidade e duração diferentes, incluindo estresse tanto com caráter físico (como frio e privação de água e comida) quanto psicológico (como imobilização e nadar forçado). Todos os animais foram submetidos à eutanásia 3 horas após o desafio com salina ou etanol, um dia após a última sessão de estresse. No procedimento de eutanásia por deslocamento cervical, o encéfalo foi dissecado para remoção de córtex frontal e hipocampo; que foram estocados a -80 graus Celsius para posterior dosagem bioquímica.

No ECI os animais foram submetidos a distintas situações de estresse a cada dia durante 11 dias consecutivos, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Protocolo de estresse crônico imprevisível com duração de 11 dias.

Dia	Estresse	Período/ Horário
1	SERRAGEM ÚMIDA (12 HORAS)	NOITE (18h00)
2	IMOBILIZAÇÃO (1 HORA)	MANHÃ (10h00)
3	ISOLAMENTO FRIO (1 HORA)	TARDE (15h00)
	LUZ ACESA	NOITE (18h00)
4	LUZ APAGADA (3 HORAS)	TARDE (12h00)
	NADAR FORÇADO (4 MIN)	TARDE (15h00)
5	SERRAGEM ÚMIDA (12 HORAS)	MANHÃ (8h00)
	PRIVAÇÃO DE ÁGUA E COMIDA (12 HORAS)	NOITE (8h00)
6	NADAR FORÇADO (4 MIN)	TARDE (14h00)
	ISOLAMENTO (12 HORAS)	NOITE (18h00)
7	ISOLAMENTO FRIO (15 MIN)	TARDE (14h00)
	LUZ APAGADA (2 HORAS)	TARDE (15h00)
8	SERRAGEM ÚMIDA (12 HORAS)	NOITE
	LUZ ACESA (12 HORAS) (juntos)	(18h00)
9	ISOLAMENTO	NOITE
	PRIVAÇÃO DE ÁGUA E COMIDA (12 HORAS) (juntos)	(18h00)
10	IMOBILIZAÇÃO (1 HORA)	TARDE (16h00)
	LUZ ACESA (12 HORAS)	NOITE (18h00)
11	NADAR FORÇADO (4 MIN)	MANHÃ (9h00)
	IMOBILIZAÇÃO (1 HORA)	MANHÃ (10h00)

Fonte: Adaptado de Ortiz et al., 1996.

4.2.3 Procedimento comportamental: atividade dos animais em campo aberto

A atividade geral dos animais em um campo aberto (uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, forrada com fórmica branca). O fundo da arena é dividido por meio de três círculos em três partes que, por sua vez, são subdivididas por segmentos de retas em 19 partes, aproximadamente iguais.
Cada animal foi colocado, individualmente, no centro da arena do campo aberto e foi observado por um período de 10 minutos. Do repertório comportamental de um camundongo em campo aberto, os parâmetros indicativos de atividade geral, registrados foram: frequência de locomoção total, central e periférica. Cada unidade de locomoção corresponde ao ato do animal penetrar com as quatro patas em um dos quadrantes centrais (não contíguos às paredes) ou periféricos (contíguos às paredes) do campo aberto.

A atividade locomotora foi quantificada manualmente, com o auxílio de contadores manuais, sendo: um destinado à atividade locomotora central e outro à atividade locomotora periférica a cada cinco minutos. Foi considerado o tempo da locomoção total (10 minutos).

4.2.4 Ensaios

4.2.4.1 Dosagem da atividade da enzima nNOS

O método usado baseia-se na estimativa da atividade da NOS pela conversão de L-Arginina em L-Citrulina (BREDT; SNYDER, 1990).
O tecido foi homogeneizado em 1 mL de tampão contendo: 20 mM HEPES pH 7,4; 0,32 M Sacarose; 0,1 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 1,0 mM PMSF; 10 µg/mL leupeptina; 2µg/mL aprotinina. O homogenato bruto foi utilizado para dosagem de nNOS. Após a determinação da concentração proteica da amostra pelo *kit* Bio-Rad (para Bradford), as amostras foram diluídas para a concentração de 1 µg/ µL. Há uma variação na quantidade de proteínas para camundongos (adultos e adolescentes), considerando as estruturas estudadas (hipocampo e córtex frontal) na ordem de: 6-12 mg/mL. Para tanto, foi feita uma curva de calibração para a quantificação de proteínas pelo método Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras foram incubadas por 30 minutos

a 37 °C em 200 µL de meio reacional contendo: 20 µM de arginina (0,5 µCi), 4 µM de FAD, 4 µM de FNM, 10 µM de BH_4, 10 µg/ mL de Calmodulina, 1 mM de NADPH e 100 µL de amostra. Para verificar a atividade da nNOS, foi feito um novo tudo de reação contendo 5 mM de EGTA no lugar da calmodulina, além do que já foi descrito acima. Para parar a reação, os tubos foram colocados no gelo, e 1 mL de HEPES 20 mM pH 5,5 foi adicionado. O volume total contido no tubo de reação foi transferido para uma coluna com 0,3 mL de resina DOWEX na forma sódica, recolhendo-se o eluato num recipiente para espectrofotometria de cintilação. Para lavar a resina, outros 1 mL de HEPES pH 5,5 e 1 mL de água destilada foram aplicados à coluna, recolhendo-se também o eluato no mesmo recipiente. Oito mL de líquido de cintilação (Ultima Gold^{TM}) foram adicionados ao recipiente e a atividade presente na amostra foi determinada com o auxílio de um contador de radiação β. As contagens em c.p.m. (contagem por minuto) foram convertidas para d.p.m. (decaimento por minuto) e a atividade específica foi calculada em pmol.mg^{-1}.min^{-1}, segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade (pmol/mg.min)} = \frac{\text{n° de moléculas de arginina - [}^{3}\text{H-citrulina] – branco}}{\text{(Total – branco) x tempo reação x [proteína]}}$$

A correção foi feita pelo tempo da reação, trinta minutos (descrito no método acima) e pela quantidade de proteínas, onde o resultado é expresso em: pmol L-cit/min/mg prot. Para validar o método foi realizada curva cinética, considerando cinco tempos: 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos e 90 minutos, tomando-se como referência valores das propriedades de nNOS tanto físicas como constantes cinéticas, descritas por Bredt e Snyder (1990) bem como Griffith e Stuehr (1995), a saber: $V_{máx}$ de 0,96 µmol/min/mg de proteína e K_m de arginina igual a 1,5 µM. Portanto, o ensaio de nNOS foi padronizado com a preocupação de evitar o trabalho no tempo de saturação, respeitando os conhecidos dados cinéticos desta isoforma.

A fórmula acima resume a determinação final da atividade enzimática (também descrita no método).

4.2.4.2 Dosagem de corticosterona

Para confirmar a resposta ao estresse, foram coletadas amostras de sangue da veia lateral caudal (aproximadamente 300 μL), após anestesia com cetamina 100 mg/kg associada a xilazina 10 mg/kg IP de cinco animais por grupo (adolescentes e adultos) descritos no protocolo experimental, exceto nos animais tratados com 7NI. As coletas ocorreram em três tempos distintos: antes de iniciar os experimentos (nível basal), cinco minutos e três horas após a análise comportamental no dia do desafio. As amostras permaneceram em banho-maria por 1 hora a 37°C, e, após, foram centrifugadas por cinco minutos a 10000 rpm para separação do soro.

A etapa da dosagem de corticosterona por colorimetria foi realizada pelo Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação, da professora Dra. Carolina Demarchi Munhoz de Souza, do Departamento de Farmacologia, no Instituto de Ciências Biomédicas I, da Universidade de São Paulo.

O ensaio foi determinado através do kit Costicosterone EIA® (Assay Designs, Enzo LifeSciences®, Reino Unido), conforme as instruções do fabricante. O teste se baseia na ligação competitiva do anticorpo policlonal anti-corticosterona com a corticosterona presente nas amostras e na curva-padrão, bem como em moléculas de fosfatase alcalina que apresentam corticosterona ligada covalentemente. As amostras de soro na diluição (1:30) e a curva-padrão foram diluídas em tampão de amostra e adicionadas (em duplicata) à placa sensibilizada com anticorpo anti-IgG de ovelha, com solução contendo fosfatase alcalina conjugada com corticosterona (EIA Conjugate®) e anticorpo anti-corticosterona policlonal de ovelha (EIA Antibody®). Após incubação de 2 horas a temperatura ambiente, as placas foram lavadas 4 vezes, com tampão de lavagem fornecido pelo kit. Em seguida, foi adicionado substrato p-Npp (p-nitrofenil fosfato). Após 1 hora, a reação enzimática foi interrompida pela adição da solução trissódio fosfato (Stop Soluttion®), na mesma sequência em que o substrato foi adicionado. A espectrofotometria foi realizada com leitura a 405 nm, contando com auxílio do aparelho Synergy HT Multi-Mode (Microplate Reader Bio Tek, Winnoski, VT, USA). A densidade óptica foi empregada para o cálculo das concentrações de corticosterona (μg/ dL).

4.2.5 Análise dos resultados

Para a análise comportamental, atividade de nNOS e o ensaio de corticosterona as comparações estatísticas foram feitas por análise de variância (ANOVA). O test t de Student também foi aplicado ao ensaio de corticosterona. Em todas as comparações realizadas, a probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada para determinar diferenças significantes. Os resultados são expressos como média ± E.P.M.

4.2.6 Delineamento experimental

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em 20 de outubro de 2009, registrado sob número 134 na folha 78 do livro 2 para uso de animais em experimentação.

4.2.6.1 Experimento I - Estudo da sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol

Para estudar os efeitos do ECI e etanol em sensibilização comportamental, camundongos adolescentes e adultos foram expostos ao estresse crônico imprevisível (ver em paradigma do estresse) (n=24) ou receberam solução salina IP (n=24) ou etanol 1,8 g/kg IP (n=24) por 11 dias. Os grupos foram subdivididos para desafio com: etanol 1,8 g/kg (n=12) ou salina (n=12) no 12° dia. A atividade locomotora foi medida no campo aberto durante 10 minutos, imediatamente após a injeção. Para relacionar a influência do estresse e do etanol no comportamento, o nível de corticosterona no soro foi determinado em 5 animais, em cada grupo (ver no ensaio de corticosterona).

A tabela abaixo demonstra os grupos citados.

Tabela 2 – Grupos experimentais tratados e realizados no Experimento I, cujo objetivo foi observar o efeito agudo ou repetido de etanol, assim como o protocolo de estresse crônico imprevisível no período de 11 dias de tratamento. Os grupos foram separados de acordo com a idade e o tratamento ao qual foram submetidos. Os animais foram eutanasiados 3 horas após o teste (D12) em que receberam uma injeção de salina IP ou etanol 1,8 g/kg. AD (camundongos adultos); ADL (camundongos adolescentes). SAL/SAL (grupo controle); SAL/ET (tratamento agudo de etanol); ET/ET (tratamento repetido de etanol).

Experimento I – Administração aguda de etanol, repetida de etanol e estresse crônico imprevisível

Grupo experimental	**Idade**	**Tempo de tratamento**	**Tratamento**	**Teste**	**Intervalo entre teste e eutanásia**
SAL/SAL	ADL	11 dias	salina	salina	3 h
S/SAL	ADL	11 dias	estresse	salina	3 h
ET/SAL	ADL	11 dias	etanol	salina	3 h
SAL/ET	ADL	11 dias	salina	etanol	3 h
S/ET	ADL	11 dias	estresse	etanol	3 h
ET/ET	ADL	11 dias	etanol	etanol	3 h
SAL/SAL	AD	11 dias	salina	salina	3 h
S/SAL	AD	11 dias	estresse	salina	3 h
ET/SAL	AD	11 dias	etanol	salina	3 h
SAL/ET	AD	11 dias	salina	etanol	3 h
S/ET	AD	11 dias	estresse	etanol	3 h
ET/ET	AD	11 dias	etanol	etanol	3 h

Três horas após a análise da atividade locomotora, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. O encéfalo foi dissecado para remoção do hipocampo e do córtex frontal, para análise da atividade de nNOS.

4.2.6.2 Experimento II - Envolvimento de nNOS em sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol

Para estudar o papel de nNOS em sensibilização cruzada entre ECI e etanol, a atividade de nNOS foi analisada em hipocampo e córtex frontal de todos os grupos (*pool* de 2; n=6 cada grupo), exceto nos grupos tratados com 7NI. Para entender o envolvimento de nNOS em sensibilização comportamental, outros grupos foram tratados com 7NI 15 mg/kg IP por 11 dias. Os grupos foram divididos em: controle (recebendo salina IP, n=16), etanol agudo 1,8 g/kg (no dia do desafio após salina IP por 11 dias, n=16), etanol repetido 1,8 g/kg (n=16) e submetidos ao ECI (n=24). Após o tratamento repetido com etanol e ECI os animais foram desafiados com etanol 1,8 g/kg (12° dia). Os grupos foram subdivididos em: não pré-tratados com 7NI (n=8, em cada grupo) e pré-tratado com 7NI (n=8, em cada grupo). O pré-tratamento com 7NI consistiu em injeção IP 30 minutos antes da injeção de salina ou etanol por 11 dias. Os grupos submetidos ao ECI receberam 7NI IP uma vez ao dia (n=8) ou em água de beber (n=8). Em água de beber, os animais receberam 7NI 60 mg/kg/caixa a cada 24 horas, em caixas com 4 camundongos. No dia do desafio (12° dia), a atividade locomotora foi analisada no campo aberto por 10 minutos, imediatamente após o desafio.

4.3 Estudo II: Participação do sistema glutamatérgico/ óxido nítrico na sensibilização cruzada entre estresse por imobilização e etanol em camundongos adultos

4.3.1 Drogas/ tratamento

4.3.1.1 Etanol

O etanol (ET, 95% vol/vol, Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil) foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) para produzir uma solução de etanol 12% v/v e foi administrada em uma dose de 1,8 g/kg. Os animais controles receberam volumes equivalentes de salina. Todas as injeções foram administradas por via IP.

4.3.1.2 Dizocilpina

Dizocilpina (Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), um antagonista não-competitivo do receptor NMDA, foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) e administrado por via IP na dose 0,25 mg/kg (CAMARINI et al., 2000a; MEYER; PHILLIPS, 2007).

4.3.2 Paradigma do estresse

Os animais foram alocados em dois grupos: (1) controle (não-estresse), (2) estresse por imobilização. Outros dois grupos foram tratados com dizocilpina 0,25 mg/kg 30 minutos antes do procedimento de estresse por 14 dias.

O estresse por imobilização foi produzido mantendo os animais imobilizados diariamente em tubo plástico com 5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento por 60 minutos entre 10 h e 11 h no período diurno durante 14 dias consecutivos (ARAÚJO et al., 2003).

4.3.3 Procedimento comportamental: atividade dos animais em campo aberto

A atividade geral dos animais foi avaliada por meio do sistema de captação de imagens *Etho Vision (Noldus Information Technology,* Holanda) em um campo aberto (uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, forrada com fórmica preta). O fundo da arena é dividido por meio de três círculos em três partes que, por sua vez, são subdivididas por segmentos de retas em 19 partes, aproximadamente iguais. Esse aparelho foi construído baseado naquele sugerido por Broadhurst (1960).

Cada animal foi colocado, individualmente, no centro da arena do campo aberto e foi observado por um período de 10 minutos. Do repertório comportamental de um camundongo em campo aberto, os parâmetros indicativos de sua atividade geral, registrados, foram: frequência de locomoção total, central e periférica. Foi considerada a frequência locomotora total (cm/10 min).

4.3.4 Ensaio

4.3.4.1 Dosagem da atividade da enzima nNOS

O ensaio para verificar a atividade da enzima nNOS ocorreu conforme descrito na página 40.

4.3.5 Análise dos resultados

Para a análise comportamental e o ensaio enzimático (atividade de nNOS) as comparações estatísticas foram feitas por análise de variância (ANOVA). Em todas as comparações realizadas, a probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada para determinar diferenças significantes. Os resultados são expressos como média ± E.P.M.

4.3.6 Delineamento experimental

4.3.6.1 Experimento I - Efeitos do pré-tratamento com dizocilpina em estudo de sensibilização comportamental ao etanol

Os efeitos do etanol agudo e tratamento crônico de etanol em estudo de sensibilização comportamental foram investigados, para que os efeitos de dizocilpina pudessem ser estudados em um segundo momento. Nesta primeira etapa, camundongos machos Swiss adultos receberam salina IP (n=16) ou etanol 1,8 g/kg por 14 dias. Os grupos foram subdivididos para desafio com: etanol 1,8 g/kg (n=8) ou salina (n=8) IP no 15° dia. A atividade locomotora foi medida no campo aberto por 10 minutos, imediatamente após o 1° dia (D1), no 8° dia (D8) e no dia do desafio (D15). Todos os animais antes do tratamento com salina ou etanol foram submetidos a dois dias de habituação, H1 e H2, respectivamente. Nestes dias, os animais foram analisados no campo aberto por 10 minutos, imediatamente após a injeção IP de salina.

Para estudar os efeitos de dizocilpina diante de sensibilização comportamental ao etanol, camundongos machos Swiss adultos foram pré-tratados

com 0,25 mg/kg de dizocilpina 30 minutos antes das injeções IP de salina (n=16) ou do tratamento com etanol 1,8 g/kg (n=16) IP por 14 dias. Os grupos foram subdivididos em desafio com salina (n=8) e etanol 1,8 g/kg (n=8) no 15° dia. A atividade locomotora foi medida no campo aberto por 10 minutos, imediatamente após o 1° dia (D1), no 8° dia (D8) e no dia do desafio (D15). Todos os animais antes do tratamento com salina ou etanol foram submetidos a dois dias de habituação, H1 e H2, respectivamente. Nestes dias, os animais foram analisados no campo aberto por 10 minutos, imediatamente após a injeção IP de salina.

4.3.6.2 Experimento II - Efeitos do estresse por imobilização em estudo de sensibilização comportamental ao etanol

Para estudar os efeitos do estresse por imobilização em sensibilização comportamental ao etanol, camundongos machos Swiss adultos foram submetidos ao procedimento de estresse por imobilização durante 60 minutos 1 vez ao dia (n=16) ou receberam injeção diária IP de salina (n=16) por 14 dias. Os grupos foram subdivididos em desafio com salina (n=8) e etanol 1,8 g/kg (n=8) no 15° dia. A atividade locomotora foi medida no campo aberto por 10 minutos, imediatamente após o 1° dia (D1), no 8° dia (D8) e no dia do desafio (D15). Todos os animais antes do tratamento com salina ou etanol foram submetidos a dois dias de habituação, H1 e H2, respectivamente. Nestes dias, os animais foram analisados no campo aberto por 10 minutos, imediatamente após a injeção IP de salina.

4.3.6.3 Experimento III - Efeitos do pré-tratamento com dizocilpina em sensibilização cruzada entre estresse e etanol

Com o propósito de estudar os efeitos de dizocilpina na sensibilização cruzada entre estresse e etanol, camundongos machos Swiss adultos foram pré-tratados com 0,25 mg/kg de dizocilpina 30 minutos antes do procedimento de estresse por imobilização durante 60 minutos 1 vez ao dia (n=16) ou das injeções IP de salina (n=16) por 14 dias. Os grupos foram subdivididos em desafio com salina (n=8) e etanol 1,8 g/kg (n=8) no 15° dia. A atividade locomotora foi medida no campo aberto por 10 minutos, imediatamente após o 1° dia (D1), no 8° dia (D8) e no dia do desafio

(D15). Todos os animais antes do tratamento com salina ou etanol foram submetidos a dois dias de habituação, H1 e H2, respectivamente. Nestes dias, os animais foram analisados no campo aberto por 10 minutos, imediatamente após a injeção IP de salina.

4.3.6.4 Experimento IV - Atividade da nNOS em sensibilização comportamental ao etanol, sensibilização cruzada entre estresse e etanol e diante do pré-tratamento com dizocilpina

Os efeitos do estresse por imobilização e etanol diante da sensibilização cruzada associados ou não ao pré-tratamento com DZP, sob a atividade de nNOS foram estudados. Os grupos submetidos ao estresse por imobilização, desafiados com salina ou etanol, pré-tratados com DZP (n=16) ou não pré-tratados com DZP (n=16), bem como o grupo controle (SAL/SAL, n=8) e grupo pré-tratado com DZP antes de salina desafiado com salina (DZP + SAL/SAL, n=8) foram submetidos à eutanásia 3 horas após o desafio com salina ou etanol, condição em que o encéfalo foi dissecado. O CF e o HP foram escolhidos para estudar a atividade de nNOS, motivado pelo interesse em compreender a relação entre DZP associado ao estresse por imobilização em estudo de sensibilização cruzada nestas regiões neuronais.

5 RESULTADOS

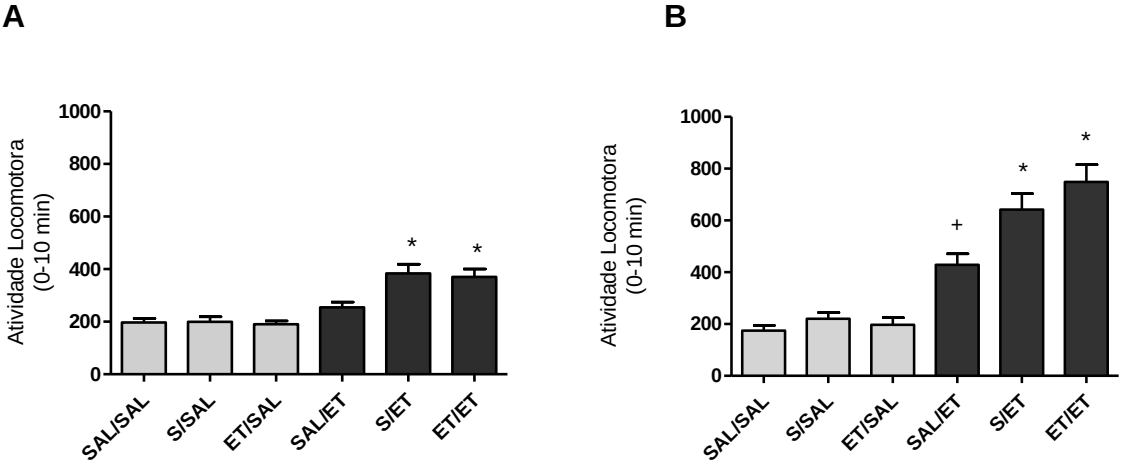
5.1 Estudo I: Sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol em camundongos Swiss machos adolescentes e adultos

5.1.1 Experimento I - Estudo da sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol

5.1.1.1 O estresse crônico imprevisível induz sensibilização cruzada com etanol em camundongos adolescentes e adultos

Os grupos S/ET (estresse desafiado com etanol) e ET/ET (etanol desafiado com etanol), tanto adolescentes quanto adultos, demonstraram aumento de atividade locomotora, se comparados com o grupo controle (tratado com salina e desafiado com salina: SAL/SAL, e com o grupo tratado com salina e desafiado com etanol: SAL/ET). Além disto, nos adultos há um aumento da atividade locomotora no grupo SAL/ET (salina desafiado com etanol) comparado com o controle (SAL/SAL) (figura 3B). Os animais submetidos ao estresse ou tratados com etanol apresentaram maiores níveis de atividade locomotora comparados aos tratados com salina, após uma injeção desafio de etanol, sugerindo desenvolvimento de sensibilização comportamental ao etanol e sensibilização cruzada entre estresse e etanol. Esses fenômenos ocorreram tanto em animais adultos quanto em adolescentes ($F_{2,84} = 5,75$; $p < 0,01$ e $F_{2,58} = 3,16$; $p < 0,05$, respectivamente), mas em menor magnitude em adolescentes, como já tem sido demonstrado em nosso laboratório, em relação à sensibilização ao etanol (CARRARA-NASCIMENTO et al., 2011).

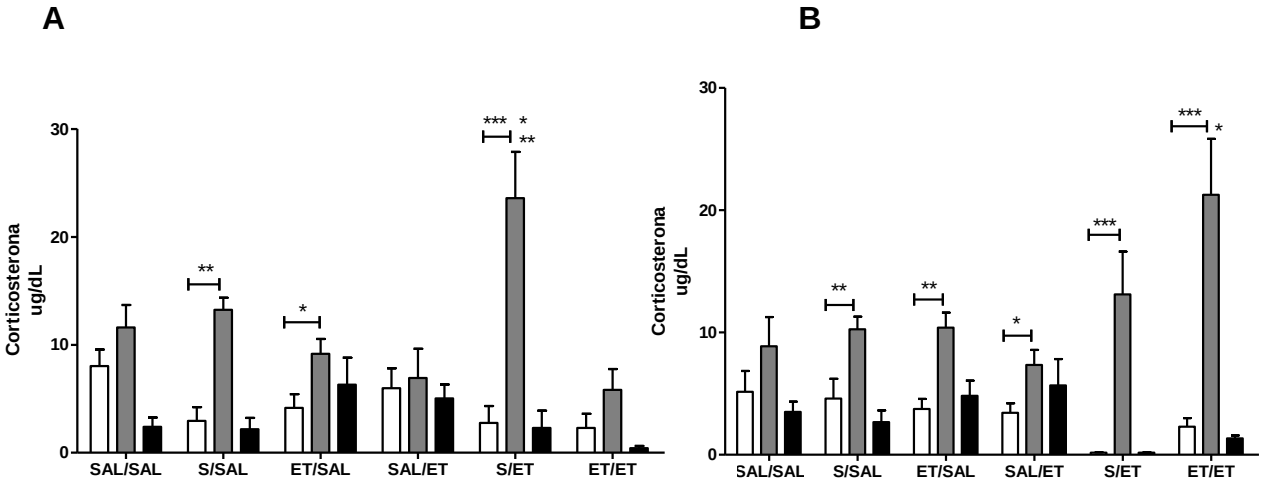
Figura 3 - Atividade locomotora de camundongos adolescentes (A) e adultos (B) no dia do desafio (12°dia), após injeção de salina ou etanol 1,8 g/kg.



Cada coluna representa a média ± E.P.M. com análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste Bonferroni.*p<0,05 vs SAL/ET; +p<0,05 vs SAL/SAL. SAL/SAL: animais tratados com salina IP por 11 dias, desafiados com salina; S/SAL: animais submetidos ao estresse crônico imprevisível (ECI) por 11 dias, desafiados com salina; ET/SAL: animais tratados com etanol 1,8 g/kg IP por 11 dias, desafiados com salina; SAL/ET: animais tratados com salina IP por 11 dias, desafiados com etanol 1,8 g/kg; S/ET: animais submetidos ao ECI por 11 dias, desafiados com etanol 1,8 g/kg; ET/ET: animais tratados com etanol 1,8 g/kg IP por 11 dias, desafiados com etanol 1,8 g/kg.

5.1.1.2 O tratamento crônico com etanol aumenta corticosterona em adultos, enquanto o etanol aumenta a corticosterona em adolescentes pré-expostos ao estresse

Figura 4 - Dosagem de corticosterona por colorimetria de camundongos adolescentes (A) e adultos (B).



A dosagem de corticosterona ocorreu a partir de três amostras de soro: nível basal (1ª coleta), após 15 minutos do desafio com salina ou etanol (2ª coleta) e 3 horas após o desafio (3ª coleta). Cada coluna representa a média ± E.P.M. com análise de variância (ANOVA) de três vias. Na comparação entre a 1ª coleta e a 2ª coleta foi usado o teste t, para analisar diferenças estatísticas, onde: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. No gráfico 4A (2ª coleta): *p<0,05 vs SAL/SAL e S/SAL; **p<0,01 vs ET/SAL, SAL/E e ET/ET. No gráfico 4B (2ª coleta): *p<0,05 vs SAL/SAL, S/SAL, ET/SAL e SAL/ET. Descrição das barras: 1ª coleta (barras brancas); 2ª coleta (barras cinza escuro); 3ª coleta (barras pretas).

As figuras 4A e 4B demonstram, respectivamente, ensaio de corticosterona em camundongos Swiss adolescentes e adultos. As figuras demonstram nível de corticosterona no soro (µg/dL) a partir de três coletas: nível basal, antes de iniciar os experimentos (1ª coleta), após 15 minutos do desafio com salina ou etanol (2ª coleta) e três horas após o desafio com salina ou etanol (3ª coleta). Pode-se nitidamente notar que o maior nível de corticosterona é demonstrado na 2ª coleta, após os 11 dias de tratamento ou ECI, com amostras obtidas no dia do desafio. O aumento de corticosterona, comparado ao basal, é evidente nos grupos expostos ao estresse (S/SAL) e naqueles em abstinência (ET/SAL) em ambos: adolescentes e adultos. Em adultos a injeção aguda de etanol (após administração de salina por 11 dias) também demonstrou aumento de corticosterona. O desafio com etanol aumentou corticosterona induzido por ECI em adolescentes (20,06 ± 2,84 µg/dl), conforme demonstrado na figura 4A. Em adultos, esse aumento ocorreu naqueles tratados com etanol e desafiados com etanol (21,26 ± 4,57 µg/dl) diferente do que ocorreu em adolescentes (5,81 ± 1,92 µg/dl), observado na figura 4B e na tabela 3. O teste t de Student confirmou diferenças entre as idades nos níveis de corticosterona 15 minutos após o desafio no grupo ET/ET (t = 3,665, p = 0,0105).

Tabela 3 - Nível de corticosterona no soro em três coletas em ambos: adolescentes (ADL) e adultos (AD). Dia 0: um dia antes de começar o tratamento com etanol ou injeções de salina, ou estresse crônico imprevisível; dia 12: 15 minutos após o desafio com salina ou etanol; dia 12: 180 minutos após o desafio com salina ou etanol.

Grupos	***Dia 0: Nível basal***		***Dia 12: 15 minutos após injeção no desafio***		***Dia 12: 180 minutos após injeção no desafio***	
	ADL (n=5)	***AD (n=5)***	***ADL (n=5)***	***AD (n=5)***	***ADL (n=5)***	***AD (n=5)***
SAL/SAL	8,02±1,53	5,15±1,70	11,60±2,08	8,87±2,39	2,39±0,86	3,50±0,83
S/SAL	2,94±1,27	4,59±1,61	13,23±1,12	10,25±1,03	2,18±1,05	2,66±0,95
ET/SAL	4,16±1,26	3,74±0,82	9,17±1,36	10,39±1,22	6,31±2,49	4,81±1,23
SAL/ET	5,98±1,83	3,43±0,77	6,92±2,69	7,35±1,21	5,02±1,30	5,67±2,16
S/ET	2,76±1,56	0,17±0,04	20,06±2,84	13,12±3,49	2,29±1,60	0,17±0,04
ET/ET	2,30±1,29	2,29±0,69	5,81±1,92	21,26±4,57	0,41±0,20	1,33±0,25

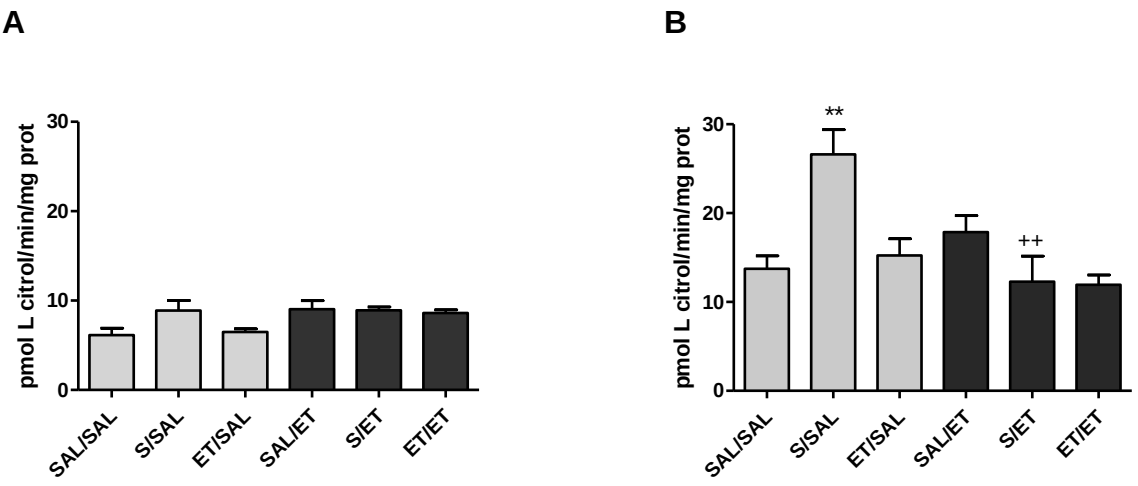
O valor em ensaio de corticosterona por colorimetria é expresso em µg/ dL. Os resultados são representados por média ± E.P.M.

5.1.2 Experimento II - Envolvimento de nNOS em sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol

5.1.2.1 Estresse aumenta a atividade de nNOS em hipocampo de adultos e o etanol atenua esse efeito

Em camundongos adolescentes não ocorreram diferenças estatísticas quanto à atividade de nNOS em hipocampo (figura 5A). Em adultos, pode-se observar que o ECI aumentou a atividade de nNOS (grupo S/SAL) e o desafio com etanol diminuiu esta atividade (grupo S/ET), conforme demonstra a figura 5B ($F_{6,36}$= 5,628, p < 0,01). Comparando as figuras 5A e 5B, podemos notar que há diferenças de L-citrulina pmol/ minuto/ mg proteína entre adolescentes e adultos. A média ± E.P.M. da quantificação de proteínas diferiu entre adolescentes (7,857 ± 0,36 mg/ml) e adultos (14,96 ± 0,99 mg/ml) em hipocampo (t= 5,50, p < 0,0001).

Figura 5 - Atividade de nNOS em hipocampo de camundongos adolescentes (A) e adultos (B).



A medida ocorreu a partir de taxas de conversão de [^{3} H] L-citrulina. Cada coluna representa a média ± E.P.M. com análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni. **p<0,01 *vs* SAL/SAL; ++p<0,01 *vs* S/SAL.

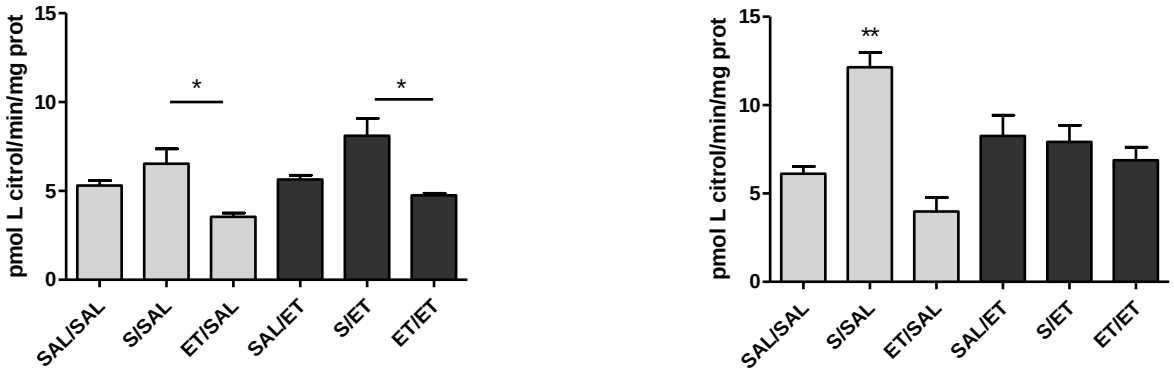
5.1.2.2 Estresse aumenta a atividade de nNOS em córtex frontal de adultos, mas não de adolescentes, enquanto a sensibilização cruzada entre estresse e etanol induz um maior efeito sobre a nNOS em adolescentes

Há um aumento da atividade da enzima nNOS em córtex frontal de camundongos adolescentes submetidos ao ECI se comparados com os animais tratados repetidamente com etanol, tanto desafiados com salina como etanol ($F_{4,15}$= 6,179, $p < 0,05$), conforme demonstrado na figura 6A. Na figura 6B, podemos observar que os camundongos adultos submetidos ao ECI desafiados com salina (S/SAL) demonstraram um aumento da atividade de nNOS ($F_{6,36}$= 6,770, $p < 0,01$). ANOVA de duas vias com atividade de nNOS x idade foi empregada, em todos os grupos. A análise mostrou que a atividade de nNOS aumentou em adultos comparados com adolescentes quando os animais foram submetidos ao ECI ($F_{2,72}$ = 2,39, $p < 0,01$).

Estes resultados demonstram que o estresse aumentou a atividade da nNOS em adultos, mas não em adolescentes. Tanto a sensibilização cruzada quanto a sensibilização ao etanol não alterou a atividade da nNOS em adultos. Entretanto, a sensibilização cruzada entre estresse e etanol induziu uma maior atividade da nNOS em comparação com o tratamento repetido com etanol em adolescentes.

Figura 6 - Atividade de nNOS em córtex frontal de camundongos adolescentes (A) e adultos (B).

A **B**



A medida ocorreu a partir de taxas de conversão de [^{3} H] L-citrulina. Cada coluna representa a média ± E.P.M. com análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni. *p<0,05: S/SAL e S/ET comparado com ET/SAL e ET/ET (fig. 6A), respectivamente; **p<0,01 *vs* SAL/SAL (fig. 6B).

5.1.2.3 7-nitroindazol inibe sensibilização cruzada entre estresse e etanol e a sensibilização ao etanol em camundongos adolescentes e adultos

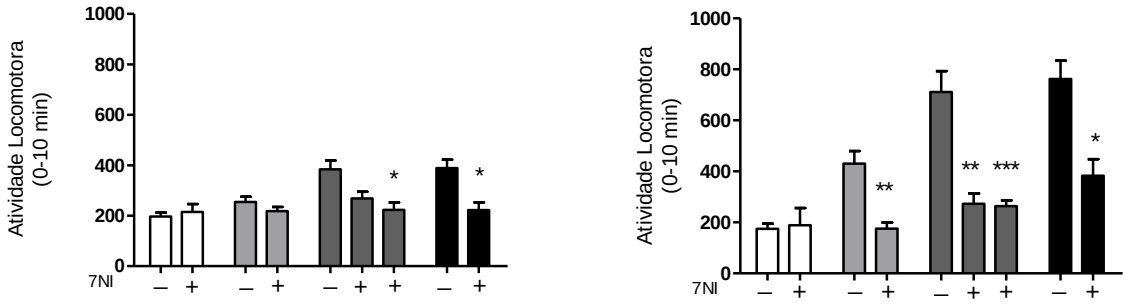
As figuras 7A e 7B demonstram, respectivamente, pré-tratamento com 7-nitroindazol (7NI) na dose 15mg/kg em camundongos Swiss adolescentes e adultos. O pré-tratamento com 7NI ocorreu 30 minutos antes das injeções diárias IP de salina ou etanol (1,8 g/kg) ou uma vez ao dia nos animais submetidos ao ECI. Outro grupo submetido ao ECI em ambos (adolescentes e adultos) recebeu 7NI em água de beber, com reposição feita a cada 24 horas.

Os adolescentes não apresentaram efeito estimulante agudo locomotor ao etanol e uma sensibilização de menor magnitude. Já em adultos, a dose de etanol foi estimulante e a administração repetida de etanol, assim como a exposição ao estresse induziram sensibilização comportamental, em resposta a uma dose desafio de etanol.

Pode-se observar que o pré-tratamento com 7NI em adolescentes submetidos ao ECI e tratado repetidamente com etanol ($F_{2,72}$=10,73, $p < 0,05$) e adultos nos grupos submetidos ao ECI ou tratados com etanol agudamente e repetidamente ($F_{2,72}$= 21,54, $p < 0,001$), diminuiu atividade locomotora no dia do desafio. Este resultado foi mais robusto em adultos que apresentaram redução de atividade locomotora tanto com 7NI IP como em água de beber. Já os adolescentes apresentaram menor atividade locomotora no dia do desafio no grupo ECI que recebeu 7NI em água de beber, comparando com o respectivo grupo controle (sem 7NI). Em adolescentes do grupo ET/ET, o pré-tratamento com 7NI reduziu atividade locomotora no dia do desafio ($p < 0,05$). Em adultos o pré-tratamento com 7NI no grupo que recebeu solução salina IP por 11 dias, foi capaz de diminuir a atividade locomotora diante da injeção aguda de etanol, no dia do desafio. Portanto, o 7NI inibiu tanto o efeito estimulante induzido pela administração aguda de etanol em adultos, quanto à sensibilização cruzada e a sensibilização ao etanol em adolescentes e adultos.

Figura 7 - Atividade locomotora de camundongos adolescentes (A) e adultos (B) pré-tratados com 7NI no dia do desafio (12°dia).

A **B**



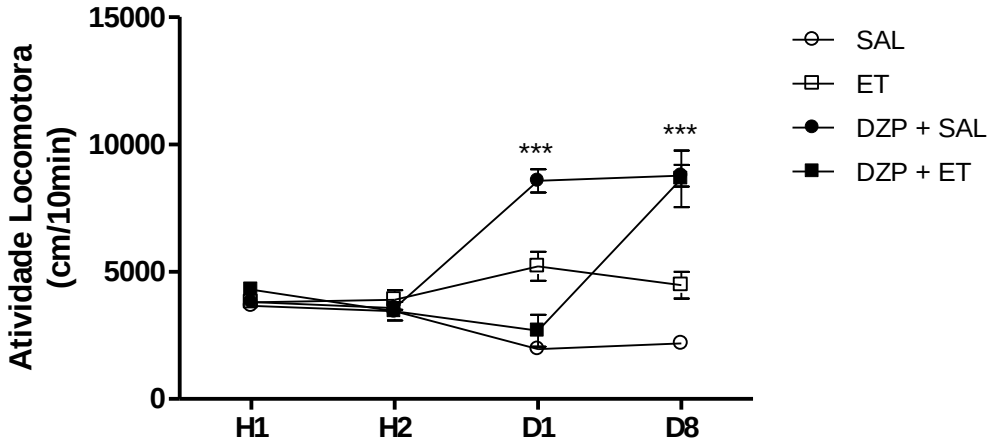
A atividade locomotora foi observada durante 10 minutos, após injeção desafio de etanol 1,8 g/kg. Os animais receberam 7-nitroindazol (7NI) 30 minutos antes de solução salina IP ou etanol. O grupo submetido ao ECI recebeu 7NI uma vez ao dia ou em água de beber. Legenda: – 7NI i.p. representa os animais que não receberam 7NI; + 7NI ip representa os animais que receberam 7NI IP ou em água de beber. A terceira barra nos grupos S/ET representa os animais que receberam 7NI em água de beber. Cada coluna representa a média ± E.P.M. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001. As comparações estatísticas foram feitas por análise do teste t não-pareado. Descrição das barras: SAL/SAL (barras brancas); SAL/ET (barras cinza claro); S/ET (barras cinza escuro); ET/ET (barras pretas).

5.2 Estudo II: Participação do sistema glutamatérgico/ óxido nítrico na sensibilização cruzada entre estresse por imobilização e etanol em camundongos Swiss machos adultos

5.2.1 Experimento I - Efeitos do pré-tratamento com dizocilpina em estudo de sensibilização comportamental ao etanol

A figura 8 mostra efeitos do tratamento com SAL ou ET (na ausência de DZP) e diante do pré-tratamento com DZP 30 minutos antes de SAL ou ET IP em camundongos Swiss adultos nos dias de habituação com SAL IP (H1 e H2), no primeiro e oitavo dias de tratamento, D1 e D8, respectivamente. ANOVA de duas vias para o fator tratamento X dias mostrou uma interação entre estes fatores ($F_{4,64}$ = 16,96, p < 0,001). O pós-teste de Bonferroni confirmou que o grupo DZP + SAL exibiu atividade locomotora maior em D1 e D8 (P < 0,001), comparado com o grupo controle (SAL + SAL). Já o grupo pré-tratado com DZP antes de ET (DZP + ET) apresentou aumento de atividade locomotora somente em D8 (p < 0,001), comparado com o grupo controle.

Figura 8 - Atividade locomotora de camundongos Swiss machos adultos pré-tratados e não pré-tratados com DZP nos dias de habituação (H1 e H2), no primeiro dia de tratamento (D1) e no oitavo dia de tratamento (D8).



H1 e H2: dias de habituação. D1 e D8: dias de tratamento quando a atividade locomotora foi quantificada. *** P < 0,001 comparado com o grupo SAL + SAL em D1 e D8. SAL:grupo que recebeu solução salina IP diariamente; ET: grupo que recebeu etanol 1,8 g/kg IP repetido; DZP + SAL: grupo que recebeu dizocilpina 0,25 mg/kg IP 30 minutos antes de salina IP; DZP + ET: grupo que recebeu dizocilpina 0,25 mg/kg 30 minutos antes de etanol 1,8 g/kg IP repetido.

Devido ao interesse em analisar a atividade locomotora ao longo do tratamento intra-grupo no grupo DZP + SAL, ANOVA de duas vias para tratamento x dias mostrou uma interação entre estes fatores ($F_{4,97}$ = 9,52, p < 0,001). Nesta interação, o primeiro dia de tratamento (D1) e o oitavo dia (D8) demonstraram maior atividade locomotora, se comparado com os dias de habituação (H1 e H2) (p < 0,001). Todavia, o desafio com SAL diminuiu a atividade locomotora em D15 (p < 0,001), conforme mostra a figura 9. Já o desafio com ET manteve a mesma atividade locomotora observada em D1 e D8 (p > 0,05) (fig. 9). Portanto, no dia do desafio há uma diferença entre SAL e ET, exibida por valores de p < 0,01, sinalizando que o desafio com ET não alterou a atividade locomotora diante do tratamento por 14 dias com DZP + SAL.

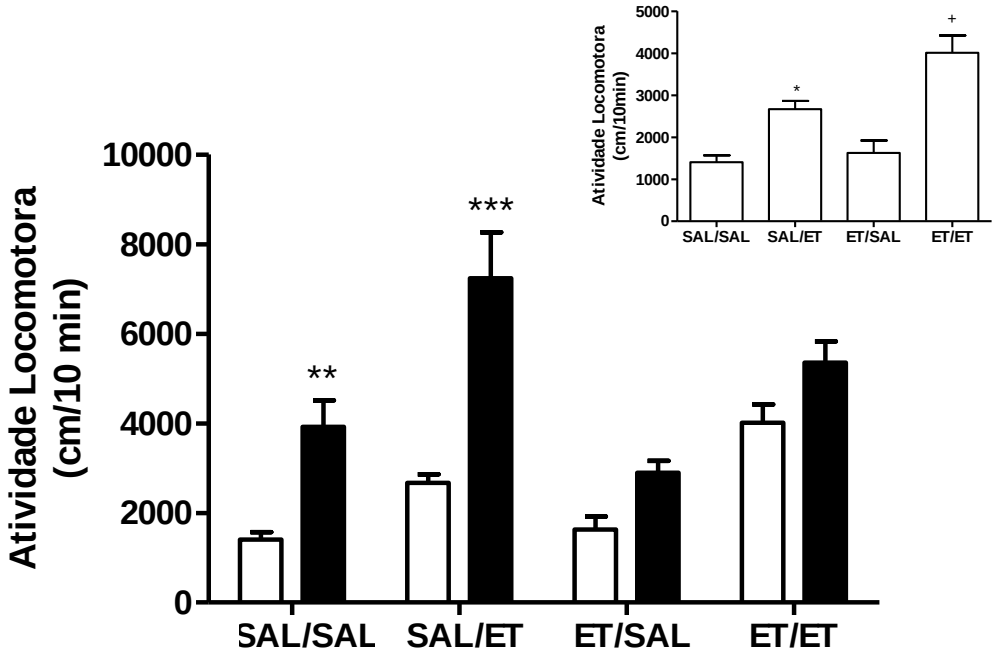
Com o propósito de também investigar os efeitos do pré-tratamento com DZP 30 minutos antes de ET 1,8 g/kg IP (grupo DZP + ET), ANOVA de duas vias para tratamento x dias mostrou uma interação entre estes fatores ($F_{5,16}$ = 26,77, p < 0,001). Nesta interação, o pré-tratamento com DZP em D8 demonstrou um aumento da atividade locomotora, comparado com D1 e os dias de habituação (H1 e H2) (p <

0,001). O desafio com SAL ou ET em D15 reduziu a atividade locomotora, se comparado com D8 ($p < 0,001$); mas, não com D1 ($p > 0,05$). Estes resultados sugerem que o desafio com SAL ou ET atenuou atividade locomotora, comparado com D8, confirmado pela figura 9.

No estudo de sensibilização comportamental ao etanol, os animais receberam por 14 dias SAL IP desafiados no 15° dia com SAL (grupo controle), ou receberam uma única dose aguda de ET na dose 1,8 g/kg no dia do desafio, ou foram tratados repetidamente por 14 dias com esta mesma dose de ET e desafiados no 15° dia com uma injeção IP de SAL ou ET (fig. 9). ANOVA de duas vias para tratamento X desafio indicou uma interação entre estes fatores no dia do desafio (15° dia) ($F_{2,32} = 16,92$, $p < 0,001$). O pós-teste Bonferroni confirmou que a dose aguda de ET no dia do desafio produziu sensibilização comportamental, se comparado com o grupo controle ($p < 0,05$); assim como o tratamento repetido de ET produziu sensibilização comportamental, comparado com o tratamento agudo ($p < 0,05$). Estes dados sugerem que houve sensibilização comportamental ao etanol, tanto no tratamento agudo como repetido, em camundongos machos Swiss adultos.

A figura 9 mostra os efeitos do pré-tratamento com DZP diante do tratamento agudo ou repetido de ET em estudo de sensibilização comportamental comparado com os grupos não pré-tratados com DZP, no dia do desafio (D15). ANOVA de duas vias para DZP X tratamento revelou uma significante interação ($F_{2,64}= 10,78$, $p < 0,001$). O pós-teste Bonferroni revelou um aumento de atividade locomotora espontânea no grupo controle (SAL/SAL) diante do pré-tratamento com DZP ($p < 0,01$), potencialização de atividade locomotora em animais que receberam dose aguda de ET no dia do desafio ($p < 0,001$) após pré-tratamento com DZP por 14 dias, e ausência do efeito de DZP em D15 de animais tratados repetidamente com ET desafiados com SAL ou ET ($p > 0,05$); comparando com os grupos não pré-tratados em DZP. Os dados sugerem que somente o pré-tratamento com DZP e este mesmo pré-tratamento antes de ET agudo, aumenta atividade locomotora no dia do desafio. Comparando com o grupo também pré-tratado com DZP antes de SAL e desafiado com SAL, o aumento da atividade locomotora no grupo DZP + SAL/ET apresenta maior robustez, sinalizando sensibilização cruzada entre DZP e ET.

Figura 9 – Atividade locomotora de camundongos Swiss machos adultos no dia do desafio pré-tratados e não pré-tratados com DZP por 14 dias.



O pré-tratamento com DZP por 14 dias, 30 min antes de SAL ou ET, no dia do desafio (D15) com SAL ou ET demonstra: aumento em atividade locomotora (SAL/SAL e SAL/ET, barras pretas) comparado com os grupos não tratados com DZP (barras brancas). Descrição das barras: grupos não tratados com DZP (barras brancas); grupos tratados com DZP (barras pretas). *p<0,05 *vs* SAL/SAL; +p<0,05 *vs* SAL/ET; Comparação entre grupos tratados com DZP (barras pretas) e os grupos não tratados com DZP (barras brancas): ** p<0,01 *vs* SAL/SAL (barra branca); *** p<0,001 *vs* SAL/ET (barra branca). Os dados foram representados em média ± E.P.M.

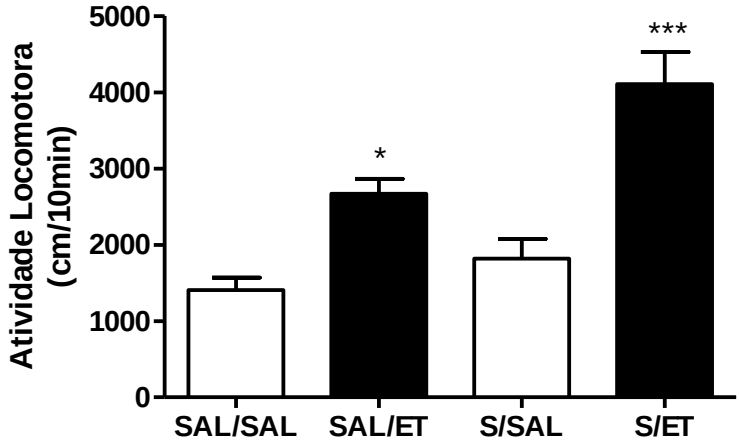
5.2.2 Experimento II – Efeitos do estresse por imobilização em estudo de sensibilização comportamental ao etanol

5.2.2.1 Sensibilização cruzada entre estresse por imobilização e etanol

A figura 10 mostra a atividade locomotora de camundongos adultos submetidos ao estresse por imobilização, desafiados com SAL ou 1,8 g/kg de ET no teste para sensibilização locomotora. ANOVA de duas vias para tratamento X desafio indicou uma interação entre estes fatores no dia do desafio (15° dia) ($F_{2,32}$= 13,73, p < 0,001). O pós-teste de Bonferroni indicou que o desafio com 1,8 g/kg de ET elevou a atividade locomotora, em relação aos controles desafiados com SAL (p < 0,05). Não houve efeito do estresse por imobilização repetido induzindo locomoção, observado no dia do desafio com salina (grupo S/SAL; p > 0,05); enquanto animais submetidos

ao estresse por imobilização repetido desafiados com ET exibiram atividade locomotora mais alta do que todos os outros grupos tratados, incluindo o grupo desafiado agudamente com ET (p's < 0,001). Estes dados indicam que houve sensibilização cruzada entre estresse por imobilização repetido e etanol em camundongos adultos.

Figura 10 - Sensibilização cruzada entre estresse por imobilização e etanol em camundongos Swiss machos adultos.



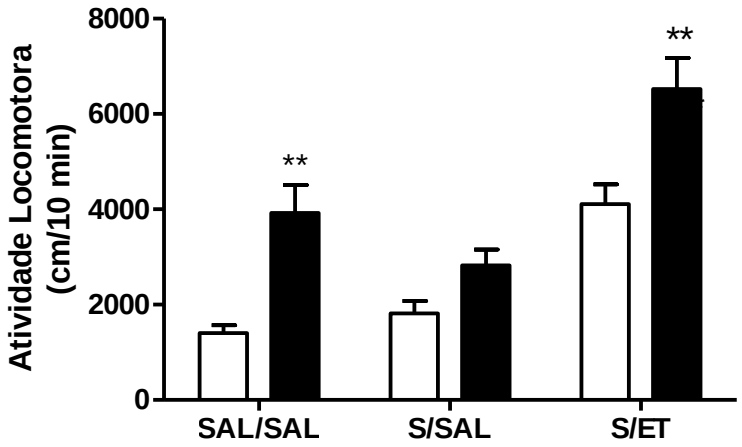
Atividade locomotora no dia do desafio (15° dia) em adultos submetidos ao estresse por imobilização por 14 dias. Os camundongos foram desafiados com salina ou etanol 1,8 g/kg e imediatamente a atividade locomotora foi medida por 10 minutos no campo aberto. As colunas representam: SAL/SAL receberam salina IP por 14 dias e foram desafiados com salina no 15° dia; SAL/ET: receberam salina IP por 14 dias e foram desafiados com etanol 1,8 g/kg no 15° dia; S/SAL: submetidos ao estresse por imobilização por 14 dias e desafiados com salina no 15° dia; S/ET: submetidos ao estresse por imobilização por 14 dias e desafiados com etanol 1,8 g/kg no 15° dia.. *p<0,05 *vs* SAL/SAL; ***p<0,001 *vs* SAL/SAL, SAL/ET and S/SAL. Os dados foram representados em média ± E.P.M.

5.2.3 Experimento III - Efeitos do pré-tratamento com dizocilpina em sensibilização cruzada entre estresse e etanol

A figura 11 mostra os efeitos do pré-tratamento com DZP sob o estresse em sensibilização comportamental ao etanol comparado com os grupos não pré-tratados com dizocilpina. ANOVA de duas vias para DZP X tratamento revelou uma significante interação ($F_{6,48}$= 13,25, p < 0,01). O pós-teste Bonferroni revelou uma potencialização de atividade locomotora espontânea no grupo controle (SAL/SAL) diante do pré-tratamento com DZP (p < 0,01), ausência de efeito de DZP sob a locomoção espontânea de animais submetidos ao estresse por imobilização repetido

(grupo S/SAL; p > 0,05) e uma potencialização de sensibilização cruzada entre estresse repetido e etanol em camundongos do grupo S/ET (p < 0,001).

Figura 11 – Atividade locomotora de camundongos Swiss machos adultos no dia do desafio pré-tratados e não pré-tratados com DZP antes de EI por 14 dias.



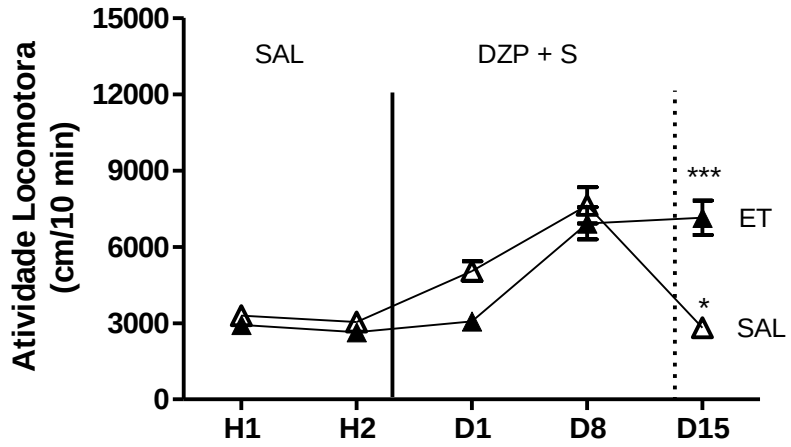
O pré-tratamento com DZP por 14 dias, após estresse por imobilização (EI) por 1 h, no dia do desafio (D15) demonstra: aumento em atividade locomotora (SAL/SAL e S/ET, barras pretas) comparado com os grupos não tratados com DZP (barras brancas). Descrição das barras: grupos não tratados com DZP (barras brancas); grupos tratados com DZP (barras pretas). Comparação entre grupos tratados com DZP (barras pretas) e grupos não tratados com DZP (barras brancas): **p<0,01 *vs* SAL/SAL e S/ET. Os dados foram representados em média ± E.P.M.

5.2.3.1 Efeitos associados de dizocilpina e estresse são mantidos por desafio com etanol

A figura 12 mostra o efeito do pré-tratamento com DZP no decorrer da atividade locomotora de várias fases do procedimento de sensibilização comportamental em camundongos submetidos ao estresse por imobilização repetido (da figura 11). A figura mostra a atividade locomotora de camundongos pré-tratados com DZP em 2 dias de habituação (salina IP; H1, H2), bem como em D1 e D8 de estresse por imobilização repetido durante 1 hora em que os animais foram pré-tratados com 0,25 mg/kg de DZP 30 minutos antes do procedimento de estresse, e a atividade locomotora destes animais quando desafiados com salina ou etanol na ausência de estresse ou pré-tratamento com DZP em D15. Devido ao interesse em comparação intra-grupo da atividade locomotora ao longo do experimento, ANOVA de uma via para o fator dia foi usada. Esta análise mostrou que o grupo desafiado

com etanol manteve sensibilização comportamental, com a atividade locomotora em D15 maior que D1 ($F_{2,16}$ = 25,52, p < 0,001) e equivalente exibição em D8. Por outro lado, o grupo desafiado com salina em D15 exibiu diminuição de atividade locomotora em D15 comparado com ambos, D1 e D8 ($F_{2,16}$ = 20,76, p < 0,05). Portanto, a sensibilização comportamental eliciada por DZP + estresse repetidos não foi mantida por injeção de salina, sugerindo um estado de dependência do efeito.

Figura 12 - Atividade locomotora em camundongos Swiss machos adultos expostos aos dias de habituação e pré-tratados com DZP 30 minutos antes do EI por 14 dias, desafiados com salina ou etanol.



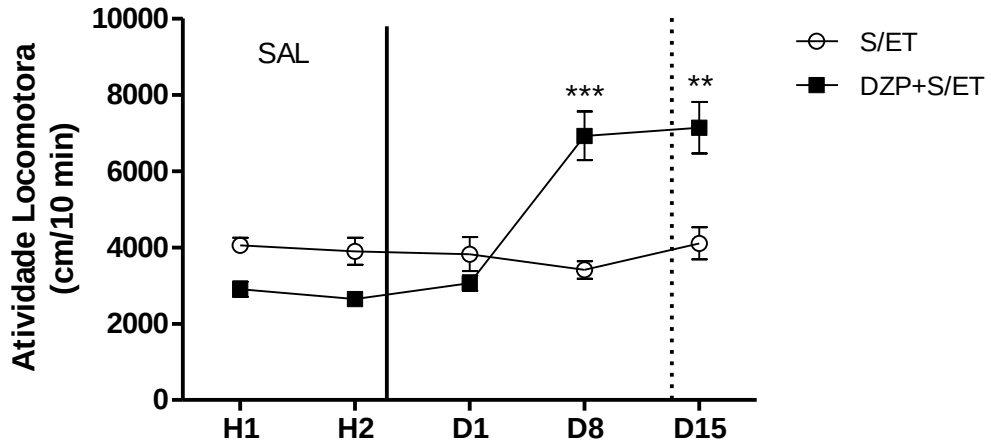
A atividade locomotora foi quantificada nos dias de habituação com solução salina IP (dia 1: H1 e dia 2: H2), no primeiro dia de tratamento (D1), no oitavo dia de tratamento (D8) e no décimo quinto dia (D15: dia do desafio). Em D15 os animais foram desafiados com SAL ou ET 1,8 g/kg. ***p<0,001, atividade locomotora em D15 foi mais alta que D1, no grupo desafiado com ET. *p<0,05, a atividade locomotora em D15 foi menor, comparado com D1 e D8, no grupo desafiado com SAL. DZP + S: grupo tratado com DZP 30 min antes do procedimento de estresse por imobilização.

5.2.3.2 Dizocilpina potencializa sensibilização cruzada entre estresse e etanol

A figura 13 mostra os efeitos de DZP ao longo de mudanças em atividade locomotora total de várias fases do procedimento de sensibilização comportamental no estresse repetido de camundongos desafiados com 1,8 g/kg de etanol em D15. ANOVA de duas vias para pré-tratamento X dia em D1 e D8 mostrou que o fator tratamento foi significante ($F_{2,16}$ = 15,66, p < 0,001). O teste t não revelou diferenças no grupo em D1 de tratamento repetido (p > 0,05), enquanto a atividade locomotora de camundongos submetidos ao estresse pré-tratados com DZP em D8 foi aproximadamente o dobro do observado em animais sem pré-tratamento, grupo

S/ET (t = 6,483, p < 0,0001). Comparando a atividade locomotora no dia do desafio com etanol (D15), o teste t mostrou que o pré-tratamento com DZP sob o estresse aumentou atividade locomotora (7141 ± 675) comparado com o grupo não pré-tratado (4107 ± 418,9), confirmando que DZP sob o estresse produziu atividade locomotora mais alta no dia do desafio com etanol (t = 4,047, p = 0,0014).

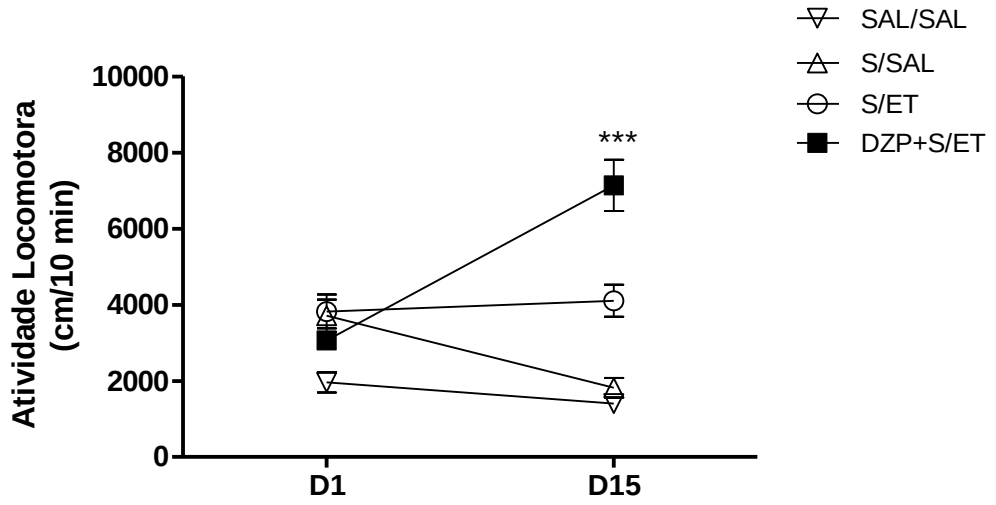
Figura 13 - Atividade locomotora em camundongos Swiss machos adultos expostos aos dias de habituação e submetidos ao EI ou pré-tratados com DZP 30 minutos antes de EI por 14 dias, desafiados etanol.



A atividade locomotora foi quantificada nos dias de habituação (dia 1: H1 e dia 2: H2), no primeiro dia de tratamento (D1), no oitavo dia de tratamento (D8) e no décimo quinto dia (D15: dia do desafio). No dia do desafio ambos os grupos foram desafiados com etanol (ET) 1,8 g/kg IP. S/ET: grupo submetido ao estresse por imobilização desafiado com etanol; DZP + S/ET: grupo tratado com dizocilpina 0,25 mg/kg 30 min antes do estresse por imobilização, desafiado com etanol. ***p<0,001, atividade locomotora em D8 do grupo DZP + S/ET foi mais alta comparado com o grupo S/ET. **p<0,01, atividade locomotora em D15 do grupo DZP + S/ET foi mais alta comparada com o grupo S/ET.

A figura 14 mostra a atividade locomotora total nos dias D1 e D15 no grupo controle (SAL/SAL) e nos grupos submetidos ao estresse repetido e desafiados com salina (S/SAL) ou etanol (S/ET), e pré-tratados com DZP antes do procedimento de estresse, desafiados com etanol (DZP + S/ET). ANOVA de duas vias para tratamento X dia confirmou que o pré-tratamento com DZP aumentou atividade locomotora somente em animais com uma história de estresse repetido que receberam etanol no desafio em D15 ($F_{4,32}$ = 35,40, p < 0,0001).

Figura 14 - Atividade locomotora em D1 e D15 de camundongos Swiss machos adultos submetidos ao EI ou pré-tratados com DZP antes de EI.



A atividade locomotora foi quantificada no 1° dia de tratamento (D1) e no dia do desafio (D15). ***p<0,001, atividade locomotora em D15 do grupo DZP + S/ET foi mais alta comparada com os grupos: SAL/SAL, S/SAL e S/ET. SAL/SAL: grupo que recebeu solução salina IP por 14 dias, desafiado com salina; S/SAL: grupo submetido ao estresse por imobilização durante 14 dias, desafiado com salina; S/ET: grupo submetido ao estresse por imobilização durante 14 dias, desafiado com etanol 1,8 g/kg IP; DZP + S/ET: grupo tratado com dizocilpina 0,25 mg/kg 30 min antes do estresse por imobilização durante 14 dias, desafiado com etanol 1,8 g/kg IP.

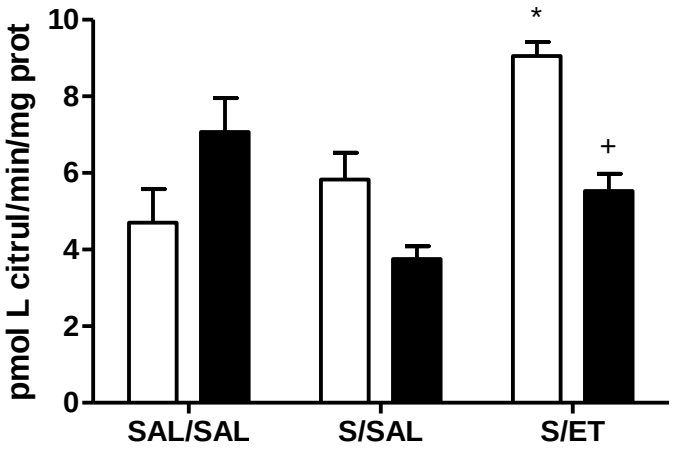
5.2.4 Experimento IV - Atividade da nNOS em sensibilização cruzada entre estresse e etanol e diante do pré-tratamento com dizocilpina

5.2.4.1 Dizocilpina atenua a atividade de nNOS induzida pelo desafio com etanol após estresse, em córtex frontal e hipocampo

A figura 15 mostra a atividade de nNOS em córtex frontal de camundongos submetidos ao estresse por imobilização desafiados com SAL ou ET, pré-tratados ou não com DZP. Análise estatística revelou, com ANOVA de duas vias para tratamento X atividade de nNOS, uma interação entre estes fatores ($F_{6,24}$ = 6,765, $p < 0,05$). Na ausência do pré-tratamento com DZP, o pós-teste Bonferroni confirmou um aumento da atividade de nNOS no grupo submetido ao estresse desafiado com ET (S/ET), comparado com os grupos: controle e com os animais submetidos ao estresse desafiados com SAL ($p < 0,05$). O grupo S/ET apresentou uma diminuição da atividade de nNOS quando pré-tratado com DZP, comparado com o mesmo grupo

sem o pré-tratamento ($p < 0,05$). Estes resultados indicam que DZP diminuiu atividade de nNOS em córtex frontal de animais que exibiram sensibilização cruzada entre estresse e ET, apontando a participação do receptor NMDA neste fenômeno.

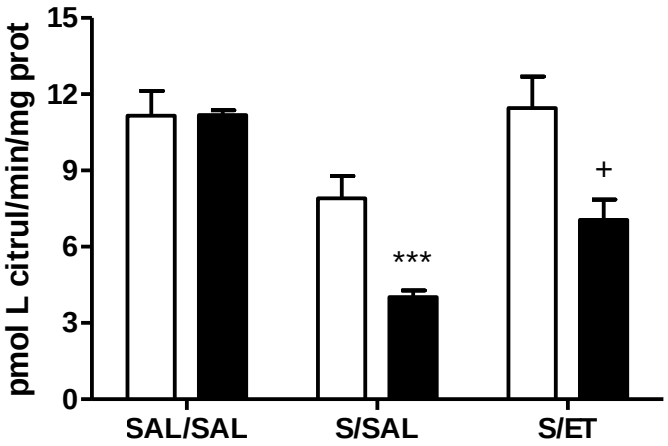
Figura 15 - Atividade de nNOS em córtex frontal de camundongos Swiss machos adultos tratados com salina ou submetidos ao EI pré-tratados e não pré-tratados com DZP.



A medida ocorreu a partir de taxas de conversão de [^{3} H] L-citrulina. A atividade de nNOS foi medida 3 horas após a atividade locomotora em campo aberto. Descrição das barras: grupos não tratados com DZP (barras brancas); grupos tratados com DZP (barras pretas). Comparação entre grupos tratados com DZP (barras pretas) e grupos não tratados com DZP (barras brancas): +p<0,05 *vs* S/ET (barra branca). Cada coluna representa a média ± E.P.M.

A figura 16 mostra a atividade de nNOS em HP de camundongos submetidos ao estresse por imobilização desafiados com SAL ou ET, pré-tratados ou não com DZP. ANOVA de duas vias para tratamento X atividade de nNOS indicou uma interação entre estes fatores ($F_{6,24} = 10,48$, $p < 0,001$). Confirmado por pós-teste Bonferroni, os animais do grupo S/ET apresentaram diminuição da atividade de nNOS quando pré-tratados com DZP, comparando com o mesmo grupo sem o pré-tratamento e com o grupo controle (SAL/SAL) ($p < 0,05$). Os animais somente submetidos ao estresse, pré-tratados com DZP apresentaram uma diminuição da atividade de nNOS, comparado com o grupo SAL/SAL ($p < 0,001$). Estes resultados sugerem a participação do receptor NMDA em estudo de sensibilização cruzada entre estresse e ET, e na resposta ao estresse em HP.

Figura 16 - Atividade de nNOS em hipocampo de camundongos Swiss machos adultos tratados com salina ou submetidos ao EI pré-tratados e não pré-tratados com DZP.



A medida ocorreu a partir de taxas de conversão de [^{3} H] L-citrulina. A atividade de nNOS foi medida 3 horas após a atividade locomotora em campo aberto. Descrição das barras: grupos não tratados com DZP (barras brancas); grupos tratados com DZP (barras pretas). Comparação entre grupos tratados com DZP (barras pretas) e grupos não tratados com DZP (barras brancas): ***p<0,001 *vs* S/SAL (barra branca); +p<0,05 *vs* S/ET (barra branca). Cada coluna representa a média ± E.P.M.

6 DISCUSSÃO

6.1 Estudo I: Sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e etanol em camundongos Swiss machos adolescentes e adultos

Em humanos, o estresse crônico durante a adolescência é visto como um fator chave para a vulnerabilidade às drogas de abuso e o desenvolvimento tardio de psicopatologias.

Os resultados demonstram que há sensibilização cruzada entre ECI e ET em camundongos ADL e AD. Os animais (ADL e AD) submetidos ao estresse ou pré-tratados com ET apresentaram aumento de atividade locomotora, comparados aos tratados com SAL, após uma injeção de ET no dia do desafio (fig. 3A e fig. 3B). Os resultados mostram que animais ADL também estão sujeitos aos efeitos do estresse sobre respostas a drogas de abuso.

Nos AD observamos que os animais do grupo que recebeu ET agudo, ou seja, receberam injeções de solução salina durante 11 dias e foram desafiados com ET, demonstraram um aumento da atividade locomotora, comparados com o grupo controle (SAL/SAL). Este fato não ocorreu com os ADL, mostrando respostas diferenciais aos efeitos agudos locomotores do ET dependentes da idade. Os dados sugerem que os camundongos ADL são menos sensíveis ao efeito estimulante agudo locomotor do etanol, comparados aos AD. Diferenças de maturação neuronal podem explicar esses resultados comportamentais diferenciais. De fato, há uma resposta variável no efeito agudo de ET entre ADL. Vale ressaltar que a sensibilização comportamental ao ET é um fenômeno evidenciado pelo aumento gradativo da atividade locomotora após administração repetida. Dados de nosso Laboratório demonstram que os ADL apresentam ausência de sensibilização quando o ET é administrado de forma pareada ao campo aberto. Quando administrado de forma não pareada, ocorre uma sensibilização, porém, mais atenuada do que a observada nos AD (CARRARA-NASCIMENTO et al., 2011; FARIA et al., 2008).

Dados de nosso Laboratório (CAMARINI et al., 2011; CARRARA-NASCIMENTO et al., 2011; FARIA et al., 2008) corroboram os de Stevenson et al. (2008). Os animais ADL são menos sensíveis ao fenômeno do que os AD. A importância desse resultado reside no fato de que filhos de alcoólicos, que

representam um grupo de risco para o desenvolvimento do alcoolismo, são menos sensíveis aos efeitos fisiológicos do ET, sobretudo quando recebem administrações repetidas (NEWLIN; THOMSON, 1991). É possível supor que a menor sensibilidade às neuroadaptações que ocorrem durante a indução da sensibilização em ADL seja um dos fatores que contribuem para a maior vulnerabilidade à dependência em indivíduos AD que usaram a droga durante a adolescência (GRANT; DAWSON, 1998).

Crescentes trabalhos publicados indicam que os efeitos do ET sobre a função neurocomportamental são regulados pelo desenvolvimento neuronal (LITTLE et al., 1996; SILVERI; SPEAR, 1998; YAN et al., 2010).

De acordo com Itzhak e Anderson (2008), repetida exposição ao ET em ADL pode causar adaptações neurais duradouras ocasionando maior sensibilidade ao ET na vida adulta. Faria et al. (2008) e Stevenson et al. (2008), usando diferentes doses de ET, concluíram que os ADL não demonstram sensibilização ao ET em baixas doses, como exemplo a dose utilizada neste trabalho: 1,8 g/kg; necessitando de doses maiores para expressar o fenômeno de forma semelhante aos AD. Outros estudos em roedores mostram que a sensibilidade ao ET em ADL pode ser maior ou menor que em AD, dependendo dos paradigmas específicos estudados (SIRCAR; SIRCAR, 2005; SPEAR; VARLINSKAYA, 2005; VARLINSKAYA; SPEAR, 2006). A ausência de efeito estimulante ao ET agudo em ADL pode ser justificada pelo fato de que os sistemas de neurotransmissores envolvidos: via mesolímbica, receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato, receptores gabaérgicos e receptores opióides (BLEDNOV et al., 2004; DEMAREST et al., 1998; KALIVAS, 1995; MEYER; PHILLIPS, 2007; PASTOR et al., 2005; VEZINA; KIM, 1999), não estão completamente desenvolvidos na adolescência (SPEAR, 2000).

Estudos demonstram que ADL exibem diferenças de respostas em medidas comportamentais relacionadas a medo, ansiedade, depressão e reação ao estresse (ver revisões ADRIANI; LAVIOLA, 2004; SLAWECKI, 2005). Em relação ao efeito de ET interferindo nos níveis de glicocorticóides, a administração de ET eleva os níveis de corticosterona em animais em desenvolvimento e animais maduros (RIVIER et al., 1984; RIVIER, 1993) e as elevações associadas ao ET nos níveis de corticosterona aumentam significativamente durante a ontogenia (SILVERI; SPEAR, 2004). ADL apresentam picos semelhantes de corticosterona em resposta a

estímulos estressores, mas por tempo mais prolongado do que AD (CHOI; KELLOGG, 1996; GOLDMAN et al., 1973; SAPOLSKY et al., 1985). Os resultados deste trabalho confirmaram aumento substancial de corticosterona em ADL submetidos ao ECI e desafiados com ET, quando comparados com o mesmo grupo em animais AD, em amostra de soro coletada 15 minutos após o desafio com etanol (fig. 4A e fig. 4B). Meaney et al. (1985) sugerem que a resposta prolongada de animais jovens ao estresse pode ser devido à imaturidade na regulação *feedback* (ou retroalimentação) negativa do eixo HPA, mediada, em parte, por receptores glicocorticóides no HP. Isso poderia explicar o aumento exacerbado nos níveis de corticosterona em ADL pré-expostos ao estresse, após uma injeção desafio de ET. Os dados deste trabalho sugerem que os ADL podem ser mais vulneráveis a estímulos estressores, corroborado por elevada atividade locomotora no desafio com ET; sustentando a hipótese de sensibilização cruzada entre ECI e ET. Esse aumento de maior magnitude não ocorreu em ADL do grupo tratado repetidamente com ET e desafiado com ET.

A corticosterona tem uma ação específica em neurônios dopaminérgicos da AVTM, potencializando a atividade sináptica mediada por ativação de receptores NMDA, AMPA e cainato. O eixo HPA de ADL responde de maneira bastante diferente dos AD, aos estímulos estressores (PRENDERGAST; LITTLE, 2007). Em ratos, a atividade elevada de disparo de neurônios dopaminérgicos na AVTM prevê uma maior susceptibilidade à dependência. Em ADL, os neurônios dessa região mesencefálica disparam mais rapidamente do que em AD. Ao mesmo tempo, as correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC) ocorrem em menor frequência e amplitude em ADL, comparado com AD (McCUTCHEON et al., 2012).

Os estudos que acessam a trajetória do controle dopaminérgico de interneurônios GABAérgicos, mostram que a modulação da dopamina de interneurônios GABAérgicos da classe “Fast-Spiking” (que disparam pulsos tônicos de alta frequência) mudam dramaticamente durante a adolescência, com agonistas D2 passando de moderadamente inibitórios em ratos na fase pré-puberal para extremamente excitatórios em ratos AD jovens (ver O’DONNELL, 2010 como revisão). Portanto, agentes moduladores GABAérgicos podem induzir uma resposta comportamental ou bioquímica diferencial durante uma fase do desenvolvimento em que as interações dopaminérgicas-gabaérgicas ainda não estão bem estabelecidas.

De fato, ADL são menos sensíveis aos efeitos sedativos induzidos pelo ET (SILVERI; SPEAR, 1998).

Analisando o resultado do ensaio de corticosterona em AD, nas amostras de soro da segunda coleta (15 minutos após o desafio com SAL ou ET), notamos que os animais AD apresentaram maior nível de corticosterona quando tratados repetidamente com ET e desafiados com ET (fig. 4B), inclusive com maior nível se comparado com o mesmo grupo em ADL. Nossos resultados demonstraram também que os animais AD, os quais desenvolveram sensibilização comportamental ao ET, apresentaram aumento de corticosterona em soro. Este fato sugere que o fenômeno de sensibilização comportamental poderia, em parte, estar acompanhado do aumento de corticosterona em AD, sugerindo uma correlação de desregulação do eixo HPA e adição. Assim, a hipótese de sensibilização cruzada entre ECI e ET, com estes dados segue confirmando a relação estresse-etanol; uma vez que não somente pré-exposição ao ECI aumenta corticosterona no desafio com ET, mas, também o tratamento repetido com ET seguido por desafio com ET aumenta corticosterona. Estes dados sinalizam que ambos, ECI e ET, aumentam corticosterona, demonstrando que vias comuns são requeridas para os efeitos comportamentais associados ao aumento de corticosterona neste estudo de sensibilização cruzada.

Considerando a atividade da enzima nNOS em HP de ADL e AD (figuras: 5A e 5B, respectivamente), podemos observar que nos camundongos ADL não houve alteração da atividade enzimática em nenhum dos grupos, com relação ao grupo controle.

O HP em particular é um crítico mediador do funcionamento do eixo HPA, dependente do mecanismo de retroalimentação negativa por liberação de glicocorticóides (BROWN et al., 1999). Assim, uma desregulação desta retroalimentação negativa subsequente ao etanol pode contribuir à responsividade do eixo HPA alterada, o que é observada na dependência ao álcool (PRENDERGAST; LITTLE, 2007). Somando a este fato, a maturação encefálica durante a adolescência, que ocorre particularmente no CPF e HP (MONTI et al., 2005; SPEAR, 2000), como já discutido anteriormente, sugere que os ADL apresentam respostas diferenciais a agentes estressores e ao efeito antagonista glutamatérgico induzido pelo ET, comparado aos AD.

Alterações de desenvolvimento na expressão de receptores NMDA são específicas da subunidade e dependentes da região encefálica (PORTERA-CAILLIAU, 1996; WINSLOW et al., 1990), com a expressão da subunidade de NR2 sendo regulada de tal forma, em termos maturacionais, que ao nascer, a subunidade predominante é a NR2B (SHENG et al., 1994; VALLANO, 1998). Por exemplo, no córtex e tálamo, os níveis das subunidades NR2B são expressos em níveis elevados no período pós-natal recente, comparado com AD, enquanto a expressão da subunidade NR2A é quase ausente ao nascer (LIU et al., 2004; SHENG et al., 1994). Durante o curso do desenvolvimento pós-natal, a predominância do NR2B diminui com aumento da expressão da subunidade NR2A, alcançando gradativamente os padrões típicos de expressão de receptores NMDA de AD (SHENG et al., 1994). Essas mudanças maturacionais são, no entanto, regiões-específicas. Por exemplo, a reposição de NR2B por NR2A é observada no cerebelo (VALLANO, 1998) e na amígdala lateral (LOPEZ DE ARMENTIA; SAH, 2003), embora não ocorra na amígdala central (LOPEZ DE ARMENTIA; SAH, 2003). Essas mudanças regionais na expressão de NMDA bem como as diferenças ontogênicas na composição das subunidades no encéfalo imaturo *versus* maduro podem explicar a ausência de alteração da atividade da nNOS em HP de ADL. A menor quantidade de proteínas em HP de ADL, comparando com AD (fig. 5A e 5B), indica que há diferenças em neurodesenvolvimento e expressão de receptor NMDA e suas subunidades, confirmando a ausência de alteração da atividade de nNOS, resultado de menor efeito de ativação do receptor NMDA. Portanto, na comparação entre atividade da nNOS em HP de ADL e AD, a ausência de diferença da atividade desta enzima em ADL, demonstra um grau de maturidade diferente devido ao estado de formação desta região neuronal em ADL, envolvendo os receptores NMDA.

Nos camundongos AD do grupo S/ET (estresse desafiado com etanol) observamos uma diminuição da atividade de nNOS em HP, comparado com o grupo S/SAL (estresse desafiado com salina). De modo complementar, os animais do grupo S/SAL, demonstraram um significativo aumento da atividade de nNOS, quando comparado com o controle (SAL/SAL: salina desafiado com salina). Os dados sugerem que o ET nos camundongos AD, parece atenuar o efeito do ECI sob a atividade da nNOS. Dados de literatura mostram que o etanol inibe o receptor NMDA (NESTLER et al., 1993) e pode promover diminuição do influxo de cálcio e,

consequentemente, diminuição da atividade da nNOS, e, portanto, menor produção de NO.

Ainda analisando os resultados da atividade de nNOS em HP de AD, sabe-se que o CRF aumenta PEPS (potencial excitatório pós-sináptico) em HP (ALDENHOFF et al., 1983), por potencializar transmissão sináptica mediada por receptor NMDA via ativação do receptor CRF_2 (UNGLESS et al., 2003). O desafio com ET em HP de AD garantiu antagonismo de receptor NMDA em animais pré-tratados com ET ou submetidos ao estresse. O desafio com ET pode ter ativado interneurônios hipocampais, devido ao aumento de amplitude de hiperpolarização mediada por receptor GABA A (YAN et al*.,* 2010), denotando um desequilíbrio entre GABA e glutamato no HP. Os receptores NMDA, particularmente, os que contêm as subunidades 2A (NR2A) e 2B (NR2B) são os que têm maior afinidade ao ET no encéfalo (ALLGAIER, 2002; WOODWARD, 2000; YAMAKURA et al., 1993).

No raciocínio, uma provável explicação é que a inibição do receptor NMDA por ET, levou à ativação de interneurônios hipocampais, com aumento de amplitude de hiperpolarização mediada por receptor GABA A (YAN et al., 2010), conforme abordado anteriormente. O desenvolvimento da expressão deste efeito difere entre interneurônios localizados no *stratum oriens* (SO) e *stratum lacunosum moleculare* (SLM), consideradas importantes regiões hipocampais.

Analisando a atividade de nNOS em CF de camundongos ADL observamos que os grupos submetidos ao ECI (S/SAL e S/ET) demonstraram um aumento da atividade de nNOS se comparado com os grupos tratados repetidamente com ET, desafiados com SAL ou ET (respectivamente: ET/SAL e ET/ET) (fig. 6A). Portanto, em ADL a sensibilização cruzada entre ECI e ET (grupo S/ET) aumentou atividade da nNOS em CF (fig. 6A), comparado com o grupo tratado repetidamente com ET (ET/ET). Em camundongos AD, houve um aumento da atividade de nNOS no grupo S/SAL (submetido ao ECI e desafiado com salina), comparado com o grupo controle (fig. 6B).

Notamos em CF de ADL, que o ECI aumentou atividade de nNOS, diferente do que ocorreu com os grupos tratados com ET. Com este resultado, está mais uma evidência da discussão discorrida anteriormente acerca do grau de maturidade envolvendo neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica, com expressão de receptores diferente nestes sistemas, bem como a resposta diferencial diante de

estímulo estressor, comparado com AD. De modo complementar em ADL, o ECI seguido de SAL ou ET no desafio, sinaliza que os efeitos do estresse aumentando atividade de nNOS são observados 1 dia após a última exposição ao estresse. Isto não ocorreu em CF de ADL tratados cronicamente com ET, desafiados com SAL ou ET.

A exposição repetida ao estresse aumentou significativamente a atividade da nNOS em CF de AD (grupo S/SAL) (fig. 6B), confirmado por observação 1 dia após a última exposição do protocolo de ECI. O desafio com ET após ECI indica uma tendência de redução da atividade de nNOS, embora não exista diferença estatística. Haddad (2004) relata que a exposição aguda ao ET, neste caso no dia do desafio, pode estimular a atividade do eixo HPA. Mas, aqui, a injeção aguda de ET ocorreu após pré-exposição ao ECI, atenuando a atividade da enzima. Nossos resultados (fig. 5B e fig. 6B) suportam a hipótese de que alterações na atividade do eixo HPA em AD podem estar relacionadas com alterações hipotalâmicas responsivas ao NO.

O gene de nNOS é necessário para o desenvolvimento de sensibilização comportamental à cocaína (ITZHAK et al., 1998) e ao ET (ITZHAK; ANDERSON, 2008), sugerindo uma influência do gene de nNOS na plasticidade sináptica relacionada aos efeitos de drogas de abuso. O NO pode desempenhar um papel como sinalizador molecular em neuroadaptações diante da exposição repetida ao ET. Isto conduz à hipótese de que a expressão do gene de nNOS pode resultar em alterações dos níveis de NO, e, portanto, este funcionamento pode ser modulado indiretamente por drogas de abuso e estresse.

Nesta parte do trabalho, pode-se concluir que há sensibilização cruzada entre estresse e ET em camundongos ADL e AD, mas diferenças na atividade de nNOS em HP e CF, bem como nos níveis de corticosterona, ocorrem devido à diferença de idade, influenciando nos aspectos diferenciais entre expressão e densidade de receptores CRF, dopaminérgicos, glutamatérgicos e subunidades do receptor NMDA, em resposta aos efeitos de ECI e ET.

Conduzidos pela hipótese de que existe sensibilização cruzada entre estresse e ET, a qual pode ser mediada pela neurotransmissão glutamatérgica e pelo NO, a próxima etapa foi tratar os animais com o inibidor da nNOS, o 7NI. Neste trabalho, demonstramos que o pré-tratamento com 7NI reduziu a atividade locomotora em

ADL e AD submetidos ao estresse ou tratados com ET, desafiados com ET (fig. 7A e 7B). Todavia, o resultado foi mais robusto em AD, onde o pré-tratamento com 7NI tanto IP como em água de beber em animais submetidos ao protocolo de estresse, demonstrou redução de atividade locomotora no dia do desafio. Estes resultados sustentam nossa hipótese acerca da participação de NO na sensibilização cruzada entre estresse e ET e a constatação de uma menor sensibilidade dos animais ADL aos efeitos do ET mediados pela enzima nNOS, no sistema glutamatérgico/ NO via receptor NMDA.

6.2 Estudo II: Participação do sistema glutamatérgico/ óxido nítrico na sensibilização cruzada entre estresse por imobilização e etanol em camundongos Swiss machos adultos

O estresse pode desencadear ou intensificar o consumo de drogas de abuso, assim como reinstalar comportamentos de busca pela droga; já extintos. Isso se deve à atuação em circuitos neuronais que medeiam o consumo de drogas induzido pelo estresse. Vários tipos de estressores induzem sensibilização cruzada com drogas psicoestimulantes. A natureza e previsibilidade do estímulo aversivo são fatores importantes quando se considera a influência do estresse sobre os efeitos comportamentais. Trabalhos de Araújo et al. (2003) e Lepsch et al. (2005) demonstram que enquanto em ADL a sensibilização cruzada foi observada após a exposição a ambos os tipos de estresse, por imobilização e imprevisível, nos AD a sensibilização ocorreu apenas após a exposição a estresse previsível.

No presente trabalho, utilizamos tanto o ECI quanto o estresse por imobilização (EI). O ECI tem como vantagem mimetizar situações de estresse não esperadas e evitar a adaptação do eixo HPA ao estresse repetido. O protocolo do ECI requer a exposição a diferentes tipos de estressores, com distintos tempos de exposição. Porém, como um de nossos objetivos foi tratar os animais com antagonistas que pudessem inibir o desenvolvimento da sensibilização cruzada, optamos, nesta etapa do trabalho, por utilizar o EI para termos melhor controle do tempo de atuação do antagonista sobre o estresse aplicado, assim como compreender as respostas comportamentais diante do EI, o qual já havia sido demonstrado por Roberts et al. (1995) na sensibilização cruzada com etanol.

A figura 9 confirma sensibilização comportamental ao etanol, assim como observamos no protocolo do estudo I. Mas, neste protocolo os animais foram tratados por 14 dias, além de dois dias de habituação com SAL. A habituação é importante para reduzir o estresse da novidade. Quando estes mesmos grupos foram pré-tratados com DZP (fig. 9), o pré-tratamento antes de SAL em animais desafiados com SAL (DZP + SAL/SAL) aumentou a atividade locomotora, comparado com o grupo sem pré-tratamento com DZP (grupo controle: SAL/SAL). Isto indica que somente o pré-tratamento com DZP é capaz de aumentar atividade locomotora no dia do desafio. Este resultado foi mais robusto nos animais desafiados com ET (grupo DZP + SAL/ET), sugerindo que houve sensibilização cruzada entre DZP e ET. Este fato compõe um indicativo que contraria nossa hipótese inicial, pautada na possibilidade de prevenção de sensibilização comportamental ao ET. Porém, representa uma resposta importante aos resultados posteriores, embasando a hipótese consolidada a partir deste resultado, em que DZP seria capaz de potencializar o EI, demonstrado tanto em nível comportamental, através da atividade locomotora, quanto bioquímico, através da atividade da nNOS. Analisando as figuras 8 e 9, claramente notamos que o desafio com ET após pré-tratamento com DZP antes de injeções diárias de SAL, mantém a atividade locomotora observada em D8, e demonstra superior atividade locomotora na comparação com D1. Esta é uma evidência notória de que DZP não foi capaz de reverter efeito agudo de ET. No grupo tratado repetidamente com ET, o pré-tratamento com DZP demonstra efeito semelhante ao grupo ET/ET, mais uma vez apontando que o pré-tratamento com DZP não reduziu atividade locomotora no dia do desafio. As figuras 8 e 9 confirmam que no grupo tratado repetidamente com ET, o pré-tratamento com DZP não reduziu atividade locomotora no dia do desafio com ET, uma vez que o desafio com ET apresentou atividade locomotora maior que a exibida no primeiro dia de tratamento (DZP + ET). A maior evidência de que DZP, de fato, colabora aumentando a atividade locomotora é identificada no grupo controle, ou seja, quando os animais receberam DZP 30 min antes de SAL e foram desafiados com SAL. Wolf e Khansa (1991) também demonstraram que DZP associado com SAL apresenta pronunciada atividade locomotora, até superior a outro grupo estudado com anfetamina associada à salina. Outros estudos têm confirmado que a administração repetida de DZP pode gerar sensibilização (CAREY

et al., 1995; CRISWELL et al., 1993; DUKE et al., 1997; JEZIORSKI et al., 1994; SEGAL et al., 1995; WEDZONY et al., 1993; WEDZONY, CZYAK, 1994; WISE et al., 1996; WOLF et al., 1993). O resultado aqui apresentado sobre os efeitos de DZP em tratamento repetido de ET, contradiz o observado em um trabalho de nosso grupo (CAMARINI et al., 2000a), em que DZP bloqueou o desenvolvimento de sensibilização comportamental ao ET. Todavia, em Camarini et al. (2000a), os animais foram tratados repetidamente com etanol no mesmo ambiente em que eram avaliados, determinando uma sensibilização condicionada às pistas ambientais. No presente trabalho, os animais não receberam o etanol no mesmo local do teste. Esses resultados confirmam a hipótese levantada no artigo de Camarini et al. (2000a) de que DZP, um antagonista de receptor NMDA, é capaz de interferir nos mecanismos de aprendizagem e prevenir o desenvolvimento da sensibilização condicionada, mas não da sensibilização não condicionada.

Ainda assim, é paradoxal o fato de DZP prevenir sensibilização comportamental diante de efeitos estimulantes, como observado por Camarini et al. (2000a) para ET e por Wolf e Khansa (1991) para anfetaminas; ao mesmo tempo que elicia a sua própria sensibilização (WOLF; KHANSA, 1991) na mesma dose (0,25 mg/kg).

Com a finalidade de conhecer os efeitos de DZP sob o EI no estudo de sensibilização cruzada, primeiro confirmamos a existência de sensibilização cruzada entre EI e ET (fig. 10). A sensibilização cruzada entre estresse e etanol, conforme mostra a figura 10, evidencia uma via comum de ativação. A plasticidade neuronal do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico em resposta a estressores e às drogas de abuso é a base de convergência desses estímulos (GOEDERS, 2002; MARINELLI; PIAZZA, 2002). Entretanto, a indução da sensibilização comportamental depende também da funcionalidade de receptores NMDA e AMPA localizados em neurônios dopaminérgicos da AVTM (KARLER et al., 1989; VANDERSCHUREN; KALIVAS, 2000; WOLF, 1998; ZHANG et al., 1997). Como revelado farmacologicamente pelo uso de antagonistas de receptores NMDA, os receptores NMDA da AVTM têm um papel essencial em várias formas de adaptações comportamentais (KALIVAS; ALESDATTER, 1993; SUTO et al., 2003). Por esta razão, o pré-tratamento com DZP representou uma ferramenta farmacológica para investigar a participação do receptor NMDA neste fenômeno. As

figuras 11, 13 e 14 mostram claramente que o pré-tratamento com DZP potencializou EI diante da sensibilização cruzada com ET; circunstância em que ET no desafio mantém os efeitos comportamentais observados ao longo do pré-tratamento com DZP associado ao EI (fig. 12). A potencialização é evidenciada na comparação entre o grupo EI desafiado com ET sem pré-tratamento com DZP e o mesmo grupo pré-tratado com DZP (fig. 13). Neste contexto, alguns trabalhos demonstraram que DZP induz aumento de corticosterona (TOLLIVER et al., 1996; WEDZONY, CZYAK, 1994), sustentando mais uma evidência de que a repetida administração de DZP potencializa EI induzindo sensibilização comportamental ao ET.

Correlacionando estes resultados comportamentais com a participação da enzima nNOS, e considerando que o CPF envia aferências glutamatérgicas para a AVTM e para o NAc (sítios que estão envolvidos na indução e expressão da sensibilização comportamental, respectivamente) e que vias glutamatérgicas do CPF modulam a atividade de células da dopamina na AVTM e no NAc, estudamos também os efeitos da sensibilização cruzada entre EI e ET sob a atividade da nNOS em CF. Observamos na figura 15 que a sensibilização cruzada entre EI e ET aumentou atividade da nNOS em CF. Este resultado sugere o envolvimento de NO na sensibilização comportamental, pois há confirmação do aumento da atividade da nNOS no grupo submetido ao EI sem pré-tratamento com DZP, sinalizando o aumento de DA e glutamato nesta região.

Porém, o pré-tratamento com DZP parece modular o desenvolvimento de sensibilização quando os animais vivenciam estímulo estressor associado à subsequente injeção de ET, demonstrado por diminuição da atividade da nNOS (fig. 15). A diminuição da atividade da nNOS em CF, ocasionada por bloqueio de receptor NMDA, possivelmente altera a regulação promovida por aferência glutamatérgica desta região incidindo no NAc e na AVTM. Evidências eletrofisiológicas sustentam a regulação inibitória de glutamato projetado do CPF, na liberação de DA no NAc (PENNARTZ et al., 1992). Esta diminuição da regulação inibitória glutamatérgica partindo de CPF até o NAc, sinaliza que diminui o efeito inibitório de glutamato atuando indiretamente em receptor dopaminérgico pré-sináptico, consequentemente causando aumento de liberação de DA em NAc. Esta explicação vem de encontro com o resultado comportamental, em que DZP

potencializou EI na sensibilização comportamental ao ET, fundamentado por aumento de DA no NAc. As consequências do aumento de DA em NAc, conhecidas na expressão da sensibilização comportamental às drogas de abuso, sinalizam, em estudos de adição, dependência produzida por uma droga. Os resultados apresentados tanto comportamentais, bem como da atividade da nNOS em CF, nos permitem visualizar que a associação do estresse (neste caso um tipo de estresse previsível) com uma droga antagonista do receptor NMDA pode intensificar sensibilização comportamental ao ET. A demonstração deste fenômeno se consolida com o expressivo aumento da atividade locomotora no dia do desafio (fig. 11) e diminuição da atividade da nNOS em CF (fig. 15) do grupo S/ET pré-tratado com DZP, em comparação com os outros grupos. Naturalmente, a investigação da expressão de receptores dopaminérgicos pré e pós-sinápticos, assim como a concentração extracelular de DA no NAc e até mesmo a expressão de autorreceptores localizados nos corpos celulares dopaminérgicos da AVTM confirmariam tal explicação, conduzida pela hipótese da regulação dependente de aferência glutamatérgica projetada desde o CPF.

Na figura 16 constatamos uma nítida diminuição da atividade de nNOS em HP no grupo que recebeu DZP antes do EI, desafiado com uma injeção de SAL (DZP + S/SAL), comparando também com o grupo S/SAL. Neste caso, o pré-tratamento com DZP influenciou na ativação da nNOS. O mesmo ocorreu com os animais desafiados com ET (grupo: DZP + S/ET). Deste modo, o aprendizado e a memória ficam comprometidos, pois os receptores NMDA estão preferencialmente localizados no HP, e animais com bloqueio específico de receptor NMDA perdem a capacidade de aprendizado (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Vale lembrar também da relação com LTP e memória, com envolvimento de NO (BÖHME, 1993).

Portanto, os estudos propostos neste trabalho sinalizam que a enzima nNOS via receptor NMDA/ óxido nítrico participa na sensibilização cruzada entre estresse e etanol.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados e da discussão apresentada, pode-se concluir que:

- há sensibilização cruzada entre ECI e ET em camundongos machos Swiss ADL e AD;
- ADL mesmo demonstrando menor atividade locomotora no desafio (se comparado com AD) apresentam aumento de corticosterona quando recebem uma dose de ET após ECI repetido (grupo S/ET). Já em AD, ET aumenta corticosterona (grupo ET/ET, na 2ª coleta), compondo mais uma evidência da relação ECI – ET em estudo de sensibilização cruzada, porque não somente ECI aumenta corticosterona, mas ET também aumenta corticosterona;
- o tratamento repetido com ET demonstra níveis diferentes de corticosterona entre ADL e AD, apontando menor sensibilidade de ADL aos efeitos de ET;
- Em AD, ECI aumenta atividade de nNOS em HP e CF. Esta atividade é amenizada por ET. Já em ADL o ECI aumenta atividade da nNOS em CF na sensibilização cruzada com ET, comparado com o grupo tratado repetidamente com ET, indicando que o estresse compõe um estímulo ao comportamento de busca de uma droga. Este fato em ADL sinaliza que o estresse nesta idade é um fator que pode predispor e agravar o consumo de ET;
- o pré-tratamento com 7NI reduziu a atividade locomotora em ADL e AD submetidos ao ECI ou tratados com ET, desafiados com ET. O resultado foi mais robusto em AD. Estes resultados confirmam a participação da enzima nNOS na sensibilização cruzada entre ECI e ET em ADL e AD, sustentando a hipótese da participação do NO e a constatação de uma menor sensibilidade dos animais ADL aos efeitos do ET mediados pelo sistema glutamatérgico/NO;
- há sensibilização cruzada entre EI e ET em camundongos Swiss machos AD e sensibilização cruzada entre DZP e ET, indicando que DZP tem seus efeitos comportamentais estimulantes aumentados por ET;
- DZP potencializou sensibilização cruzada entre EI e ET. Este dado se correlaciona com a diminuição da atividade de nNOS em CF e HP, sinalizando a participação do receptor NMDA relacionada com a enzima nNOS em resposta à associação de estresse e antagonista de receptor NMDA no sistema glutamatérgico/ NO.

REFERÊNCIAS*

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. **Behav. Pharmacol.,** v. 15, n. 5-6, p. 341-352, 2004.

ALDENHOFF, J. B.; GRUOL, D. L.; RIVIER, J.; VALE, W.; SIGGINS, G. R. Corticotropin releasing factor decreases postburst hyperpolarizations and excites hippocampal neurons. **Science,** v. 221, n. 4613, p. 875-877, 1983.

ALLGAIER, C. Ethanol sensitivity of NMDA receptors. **Neurochem. Int.,** v. 41, n. 6, p. 377-382, 2002.

ALZENSTEIN, M. L.; SEGAL, D. S.; KUCZENSKI, R. Repeated amphetamine and fencamfamine: sensitization and reciprocal cross-sensitization. **Neuropsychopharmacology,** v. 3, n. 4, p. 283-390, 1990.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 4th ed. text revision. Washington, DC: American Psychiatric Press, 2000.

ARAÚJO, A. P. N. **Aspectos comportamentais e moleculares da sensibilização cruzada entre estresse e cocaína.** 2001. 75 f. Dissertação (Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ARAÚJO, A. P.; DeLUCIA, R.; SCAVONE, C.; PLANETA C. S. Repeated predictable or unpredictable stress: effects on cocaine-induced locomotion and cyclic AMP-dependent protein kinase activity. **Behav. Brain Res.,** v. 139, n. 1-2, p. 75-81, 2003.

BEAL, M. F. Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Ann. Neurol.,** v. 38, p. 357-366, 1995.

BLEDNOV, Y. A.; WALKER, D.; OSTEMDORF-KAHANEK., E.; HARRIS, R.A. Mice lacking metabotropic glutamate receptor 4 do not show the motor stimulatory effect of ethanol. **Alcohol,** v. 34, p. 251-259, 2004.

BÖHME, G. A.; BOM, C., LEMAIRE, M.; REIBAUD, M.; PIOT, O., STUTZMANN, J. M.; DOBLE, A.; BLANCHARD, J. C. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 90, n. 19, p. 9191-9194, 1993.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 86, p. 9030-9033, 1989.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 87, p. 682-685, 1990.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neural messenger. **Neuron,** v. 8, p. 3-11, 1992.

BROADBENT, J.; KAMPMUELLER, K. M.; KOONSE S. A. Expression of behavioral sensitization to ethanol by DBA/2J mice: the role of NMDA and non-NMDA glutamate receptors. **Psychopharmacology (Berl.),** v. 167, n. 3, p. 225-234, 2003.

BROWN, E. W.; RUSH, A. J.; McEWEN, B. S. Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. **Neuropsychopharmacology,** v. 21, p. 474-484, 1999.

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

CAMARINI, R.; FRUSSA-FILHO, R.; MONTEIRO, M. G.; CALIL, H. M. MK-801 Blocks the development of behavioral sensitization to ethanol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 24, p. 285-290, 2000a.

CAMARINI, R.; NOGUEIRA PIRES, M. L.; CALIL, H. M. Involvement of the opioid system in the development and expression of sensitization to the locomotor-activating effect of ethanol. **Int. J. Neuropsychopharmacol.,** v. 3, n. 4, p. 303-309, 2000b.

CAMARINI, R.; HODGE, C. W. Ethanol preexposure increases ethanol self-administration in C57BL/6J and DBA/2J mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 79, n. 4, p. 623-632, 2004.

CAMARINI, R.; PAUTASSI, R. M.; MÉNDEZ, M.; QUADROS, I. M.; SOUZA-FORMIGONI, M. L.; BOERNGEN-LACERDA, R. Behavioral and neurochemical studies in distinct animal models of ethanol's motivational effects. **Curr. Drug Abuse Rev.,** v. 3, n. 4, p. 205-21, 2010.

CAREY, R. J.; DAI, H.; KROST, M.; HUSTON, J. P. The NMDA receptor and cocaine: evidence that MK-801 can induce behavioral sensitization effects. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 51, n. 4, p. 901-908, 1995.

CARRARA-NASCIMENTO, P. F.; GRIFFIN, W. C. 3rd; PASTRELLO, D. M.; OLIVE, M. F.; CAMARINI, R. Changes in extracellular levels of glutamate in the nucleus accumbens after ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent and adult mice. **Alcohol,** v. 45, n. 5, p. 451-460, 2011.

CHANDLER, L. J.; NEWSOM, H.; SUMNERS, C.; CREWS, F. T. Chronic etanol exposure potentiates NMDA excitotoxicity in cerebral cortical neurons. **J. Neurochem.,** v. 60, p. 1578-1581, 1993.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual Review Phisiol.**, v. 67, p. 269-284, 2005.

CHOI, S.; KELLOGG, C. K. Adolescent development influences functional responsiveness of noradrenergic projections to the hypothalamus in male rats. **Brain Res. Dev. Brain Res.,** v. 94, n. 2, p. 144-151, 1996.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis. **JAMA,** v. 267, p. 1244-1252, 1992.

CREWS, F. T.; BRAUN, C. J.; HOPLIGHT, B.; SWITZER, R. C. 3rd; KNAPP, D. J. Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 24, n. 11, p. 1712-1723, 2000.

CRISWELL, H. E.; JOHNSON, K. B.; MUELLER, R. A.; BREESE, G. R. Evidence for involvement of brain dopamine and other mechanisms in the behavioral action of the N-methyl-D-aspartic acid antagonist MK-801 in control and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 265, n. 2, p. 1001-1010, 1993.

CUNNINGHAM, C. L.; NOBLE, D. Conditioned activation induced by ethanol: role in sensitization and conditioned place preference. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 43, n. 1, p. 307-313, 1992.

DAUTZENBERG, F. M.; HAUGER, R. L. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. **Trends Pharmacol. Sci.,** v. 23, n. 2, p. 71-77, 2002.

DEMAREST, K.; HITZEMANN, B.; MAHJUBI, E.; McCAUGHRAN, J. JR.; HITZEMANN, R.; Further evidence that the central nucleus of the amygdala is associated with the ethanol-induced locomotor response. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 22, p. 1531-1537, 1998.

DUKE, M. A.; O'NEAL, J.; McDougall, S.A. Ontogene of dopamine agonist-induced sensitization: role of NMDA receptors. **Psychopharmacology (Berl.),** v. 129, n. 2, p. 153-160, 1997.

FADDA, F.; ROSSETTI, Z. L. Effect of chronic ethanol consumption on hippocampal acetylcholine release and memory performance in rats. **Alcohol,** v. 32, p. 353, 1998a.

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

FELTENSTEIN, M. W.; SEE, R. E. The neurocircuitry of addiction: an overview. **Br. J. Pharmacol.,** v. 154, n. 2, p. 261-274, 2008.
FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.,** v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FÖRSTERMANN, U.; GORSKY, L. D.; POLLOCK, J. S. SCHMIDT, H. H. H. W.; HELLER, M.; Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. **Biochem. Biophys. Res. Commum.,** v. 168, p. 727-732, 1990.

FREED, W. J.; MICHAELIS, E. K. Glutamic acid and ethanol dependence. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 8, n. 5, p. 509-514, 1978.

GARTHWAITE, J; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggest role as intercellular messenger in the brain. **Nature,** v. 336, p. 385-388, 1988.

GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R. M. J. MONCADA, S. A. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 172, p. 413-416, 1989.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-signalling in the nervous system. **TINS,** v. 14, p. 60-67, 1991.

GARTHWAITE, J; BOULTON, C. L. Nitric oxide signalling in the central nervous system. **Annu. Rev. Physiol.,** v. 57, p. 683-706, 1995.

GOEDERS, N. E. Stress and cocaine addiction. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 301, n. 3, p. 785-789, 2002.

GORSKY, L. D.; FÖRSTERMANN, U.; ISHII, K.; MURAD, F. Production of an EDRF-like activity in the citosol of N1E-115 neuroblastoma cells. **FASEB J.,** v. 4, p. 1494-1500, 1989.

GRANT, K. A.; VALVERIUS, P.; HUDSPITH, M.; TABAKOFF, B. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. **Eur. J. Pharmac.,** v. 176, p. 289-296, 1990.

GRANT, B. F.; DAWSON, D. A. Age of onset of drug use and its association with DSM-IV drug abuse and dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. **J. Subst. Abuse,** v. 10, n. 2, p. 163-173, 1998.

GROSSMAN, A. B.; ROSSANSMITH, W. G.; KABIGTING, E. B.; CADD, G.; CLIFTON, D.; STEINER, R. A. The distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotropin-releasing hormone neurons. **J. Endocrinol.,** v. 140, p. 5-8, 1994.

GULUYA, K.; GRANT, K. A.; VALVERIUS, P.; HOFFMAN, P. L.; TABAKOFF, B. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. **Brain. Res.,** v. 547, p. 129-134, 1991.

HADDAD, J. J. Alcoholism and neuro-immune-endocrine interactions: physiochemical aspects. **Biochem. Biophysic. Research Communic.,** v. 323, p. 361-371, 2004.

HUNT, W. A. Are binge drinkers more at risk of developing brain damage? **Alcohol,** v. 10, n. 6, p. 559-561, 1993.

HUNT, W. A.; LANDS, W. E. A role for behavioral sensitization in uncontrolled ethanol intake. **Alcohol,** v. 9, n. 4, p. 327-328, 1992.

IORIO, K. R.; REINLIB, R.; TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P. L. Chronic exposure of cerebellar granule cells to ethanol results in increased N-methyl-D-aspartate receptor function. **Mol. Pharmacol.,** v. 41, p. 1142-1148, 1992.

ITZHAK, Y.; ALI, S. F.; MARTIN, J. L.; BLACK, M. D.; HUANG, P. L. Resistance of neuronal nitric oxide synthase-deficient mice to cocaine-induced locomotor sensitization. **Psychopharmacology,** v. 140, p. 378-386, 1998.

ITZHAK, Y.; ANDERSON, K. L.; ALI, S. F. Differential response of nNOS knockout mice to MDMA ("ecstasy")- and methamphetamine-induced psychomotor sensitization and neurotoxicity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.,** v. 1025, p. 119-128, 2004.

ITZHAK, Y.; ALI, S. F. Role of nitrergic system in behavioral and neurotoxic effects of amphetamine analogs. **Pharmacol. Ther.,** v. 109, n. 1-2, p. 246-262, 2006.

ITZHAK, Y., ANDERSON, K. L. Ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent and adult mice: role of the nNOS gene. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 32, n. 10, p. 1839-1848, 2008.

ITZHAK, Y.; ROGER-SÁNCHEZ, C.; ANDERSON, K. L. Role of the nNOS gene in ethanol-induced conditioned place preference in mice. **Alcohol,** v. 43, n. 4, p. 285-291, 2009.

ITZHAK, Y.; ROGER-SÁNCHEZ, C.; KELLEY, J. B.; ANDERSON, K. L. Discrimination between cocaine-associated context and cue in a modified conditioned place preference paradigm: role of the nNOS gene in cue conditioning. **Int. J. Neuropsychopharmacol.,** v. 13, n. 2, p. 171-180, 2010.

JEZIORSKI, M.; WHITE, F. J.; WOLF, M. E. MK-801 prevents the development of behavioral sensitization during repeated morphine administration. **Synapse,** v. 16, n. 2, p. 137-147, 1994.

KALIVAS, P. W.; STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. **Brain. Res. Rev.,** v. 16, n. 3, p. 223-244, 1991.

KALIVAS, P. W.; ALESDATTER, J. E. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor stimulation in the ventral tegmental area and amygdala in behavioral sensitization to cocaine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 267, n. 1, p. 486-495, 1993.

KALIVAS, P. W. Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants. **Drug Alcohol Dep.,** v. 37, p. 95-100, 1995.

KALLURI, H. S. G.; MEHTA, A. K.; TICKU, M. K. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. **Mol. Brain Res.,** v. 58, p. 221-224, 1998.

KARLER, R.; CALDER, L. D.; CHAUDHRY, I. A.; TURKANIS, S. A. Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. **Life Sci.,** v. 45, n. 7, p. 599-606, 1989.

KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **J. Cyclic Nucleotide Res.,** v. 3, p. 23-35, 1977.

KLATT, P.; SCHMIDT, K.; URAY, G.; MAYER, B. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, co-factor requirement, and the role of N-hydroxy-L-arginine as an intermediate. **J. Biol. Chem.,** v. 268, p. 781-787, 1993.

KIM, C. K.; RIVIER, C. L. Nitric oxide and carbon monoxide have a stimulatory role in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to physico-emotional stressors in rats. **Endocrinology,** v. 141, p. 2244-2253, 2000.

KOOB, G. F. Allostatic view of motivation: implications for psychopathology. In: BEVINS, R. A.; BARDO, M. T. (Ed.). **Motivacional factors in the etiology of drug abuse**. Lincoln, NE: University of Nebraska Press, 2004. p. 1-18. (Nebraska Symposium on Motivation, v. 50).

KOOB, G. F. A role for brain stress systems in addiction. **Neuron,** v. 59, p. 11-34, 2008.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology,** v. 35, p. 217-238, 2010.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science,** v. 278, p. 52-58, 1997.

KOOB, G. F.; ROBERTS, A. J.; SCHULTEIS, G.; PARSONS, L. H.; HEYSER, C. J.; HYYTIÄ, P.; MERLO-PICH, E.; WEISS, F. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 22, n. 1, p. 3-9, 1998.

LEE, E. H.; LEE, C. P.; WANG H. I.; LIN, W. R. Hippocampal CRF, NE, and NMDA system interactions in memory processing in the rat. **Synapse,** v. 14, n. 2, 144-153, 1993.

LEPSCH, L. B.; GONZALO, L. A.; MAGRO, F. J.; DeLUCIA, R.; SCAVONE, C.; PLANETA, C. S. Exposure to chronic stress increases the locomotor response to cocaine and the basal levels of corticosterone in adolescent rats. **Addict. Biol.,** v. 10, n. 3, p. 251-256, 2005.

LI, Q.; WILSON, W. A.; SWARTZWELDER, H.S. Develomental differences in the sensitivity of spontaneous and miniature IPSCs to ethanol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 30, p. 119-126, 2006.

LITTLE, P. J.; KUHN, C. M.; WILSON, W. A.; SWARTZWELDER, H. S. Differential effects of ethanol in adolescent and adult rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 20, p. 1346-1351, 1996.

LOPEZ DE ARMENTIA, M.; SAH, P. Development and subunit composition of synaptic NMDA receptors in the amygdala: NR2B synapses in the adult central amygdala. **J. Neurosci.,** v. 23, n. 17, p. 6876-6883, 2003.

LÓPEZ, J. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Neural circuits mediating stress. **Biol. Psychiatry,** v. 46, p. 1461-1471, 1999.

LIU, X. B.; MURRAY, K. D.; JONES, E. G. Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. **J. Neurosci.,** v. 24, n. 40, p. 8885-8895, 2004.

LOVINGER, D. M.; WHITE, G.; WEIGHT, F. F. NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. **J. Neurosci.,** v. 10, n. 4, p. 1372-1379, 1990.

MALENFANT, S. A.; O'HEARN, S.; FLEMING, A. S. MK801, an NMDA antagonist, blocks acquisition of a spatial task but does not block maternal experience effects. **Physiol Behav,** v. 49, n. 6, p. 1129-1137, 1991.

MARIN, P.; LAFON, M.; BOCKAERT, J. A nitric oxide activity selectively stimulated by NMDA receptors depends on protein kinase C activation in mouse striatal neurons. **Eur. J. Neurosci.,** v. 4, p. 425-432, 1992.

MARINELLI, M.; PIAZZA, P. V. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. **Eur. J. Neurosci.,** v. 16, n. 3, p. 387-394, 2002.

MARKWIESE, B. J.; ACHESON, S. K.; LEVIN, E. D.; WILSON, W. A.; SWARTZWELDER, H. S. Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 22, n. 2, p. 416-421, 1998.

MASUR, J.; BOERNGEN, R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 13, n. 6, p. 777-780, 1980.

MATTSON, B. J.; BOSSERT, J. M.; SIMMONS, D. E.; NOZAKI, N.; NAGARKAR, D.; KREUTER, J. D.; HOPE, B. T. 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.,** v. 95, n. 5, p. 1481-1494, 2005.

McCUTCHEON, V. V.; GRANT, J. D.; HEATH, A. C.; BUCHOLZ, K. K.; SARTOR, C. E.; NELSON, E. C.; MADDEN, P. A.; MARTIN, N. G. Environmental influences predominate in remission from alcohol use disorder in young adult twins. **Psychol. Med.,** v. 16, p. 1-11, 2012.

MENZAGUI, F.; HEINRICHS, S. C.; PICH, E. M.; WEISS, F.; KOOB, G. F. The role of limbic and hypotalamic corticotropin-releasing factor in behavioral responses to stress. **Ann. N. Y. Acad. Sci.,** v. 697, p. 142-154, 1993.

MEYER, P. J.; PHILLIPS, T. J. Bivalent effects of MK-801 on ethanol-induced sensitization do not parallel its effects on ethanol-induced tolerance. **Behav. Neurosci.,** v. 117, n. 3, p. 641-649, 2003.

MEYER, P. J.; PHILLIPS, T. J. Behavioral sensitization to ethanol does not result in cross-sensitization to NMDA receptor antagonists. **Psychopharmacology,** v. 195, p. 103–115, 2007.

MONCRIEFF, J.; DRUMMOND, D. C.; CANDY, B.; CHECINSKI, K.; FARMER, R. Sexual abuse in people with alcohol problems. A study of the prevalence of sexual abuse and its relationship to drinking behaviour. **Br. J. Psychiatry**, v. 169, n. 3, p. 355-360, 1996.

MONTI, P. M.; MIRANDA, R.; NIXON, K. J.; SHER, K. J.; SWARTZWELDER, H. S.; TABERT, S. F. et al. Adolescence, booze, brains and behavior. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 29, p. 207-220, 2005.

NAGY, J.; LÁSZLÓ, L. Increased sensivity to NMDA is involved in alcohol-withdrawal induced citotoxicity observed in primary cultures of cortical neurons chronically pre-treated with ethanol. **Neurochem. Int.,** v. 40, p. 585-591, 2002.

NAGY, J.; KOLOK, S.; DEZSO, P.; BOROS, A.; SZOMBATHELYI, Z. Differential alterations in the expression of NMDA receptor subunits following chronic ethanol treatment in primary cultures of rat cortical and hippocampal neurones. **Neurochem. Intern.,** v. 42, p. 35-43, 2003.

NELSON, R. J.; KRIEGSFELD, L. J.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. **Front. Neuroendocrinology,** v. 18, p. 463-491, 1997.

NESTLER, E. J.; HOPE, B. T.; WIDNELL, K. L. Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. **Neuron,** v. 11, n. 6, p. 995-1006, 1993.

NEWLIN, D. B.; THOMSON, J. B. Chronic tolerance and sensitization to alcohol in sons of alcoholics. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v, 15, n. 3, p. 399-405, 1991.

O'DONNELL, P. Adolescent maturation of cortical dopamine. **Neurotox. Res.,** v. 18, n. 3-4, p. 306-312, 2010.

OLTON, D. S. The use of animal models to evaluate the effects of neurotoxins on cognitive processes. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.,** v. 5, n. 6, p. 635-640, 1983.

ORTIZ, J.; FITZGERALD, L. W.; LANE, S.; TERWILLINGER, R.; NESTLER, E. J. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 6, p. 443-452, 1996.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.,** v. 54, p. 581-618, 1998.

PALACHICK, B.; CHEN, Y. C.; ENOCH, A. J.; KARLSSON, R. M.; MISHINA, M.; HOLMES, A. Role of major NMDA or AMPA receptor subunits in MK-801 potentiation of ethanol intoxication. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 32, n. 8, p. 1479-1492, 2008.

PALMER, M. R.; HOFFER, B. J. GABAergic mechanisms in the electrophysiological actions of ethanol on cerebellar neurons. **Neurochem. Res.,** v. 15, n. 2, p. 145-151, 1990.

PALMER, R. M.; REES, D. D.; ASHTON, D. S., MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 153, n. 3, p. 1251-1256, 1988.

PASTOR, R.; SANCHIS-SEGURA, C.; ARAGON, C. M. Effect of selective antagonism of mu(1)-, mu(1/2)-, mu(3)-, and delta-opioid receptors on the locomotor-stimulating actions of ethanol. **Drug Alcohol Depend.,** v. 78, p. 289–295, 2005.

PIERCE, R. C.; KUMARESAN, V. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? **Neurosci. Biobehav. Rev.,** v. 30, n. 2, p. 215-38, 2006.

PHILLIPS, T. J.; HUSON, M.; GWIAZDON, C.; BURKHART-KASCH, S.; SHEN, E. H. Effects of acute and repeated ethanol exposures on the locomotor activity of BXD recombinant inbred mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 19, n. 2, p. 269-278, 1995.

PORTERA-CAILLIAU, C.; PRICE, D. L.; MARTIN, L. J. N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. **J. Neurochem.,** v. 66, n. 2, p. 692-700, 1996.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog. Neurobiol.,** v. 64, p. 51-68, 2001.

PRENDERGAST, M. A.; LITTLE, H. J. Adolescence, glucocorticoids and alcohol. **Pharmacology Biochem. Behavior,** v. 86, p. 234-245, 2007.

PRENDERGAST, M. A.; MULHOLLAND, P. J. Glucocorticoid and polyamine interactions in the plasticity of glutamatergic synapses that contribute to ethanol-

associated dependence and neuronal injury. **Addict. Biol.,** v. 17, n. 2, p. 209-223, 2012.

PYAPALI, G. K.; TURNER, D. A.; WILSON, W. A.; SWARTZWELDER, H. S. Age and dose-dependent effects of ethanol on the induction of hippocampal long-term potentiation. **Alcohol,** v. 19, n. 2, p. 107-111, 1999.

QUADROS, I. M.; HIPÓLIDE, D. C.; FRUSSA-FILHO, R.; DE LUCCA E. M.; NOBREGA, J. N.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. Resistance to ethanol sensitization is associated with increased NMDA receptor binding in specific brain areas. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 442, n. 1-2, p. 55-61, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 920 p.

REUL, J. M.; HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. **Curr. Opin. Pharmacol.,** v. 2, n. 1, p. 23-33, 2002.

RICHARDSON, H. N.; LEE, S. Y.; O'DELL, L. E.; KOOB, G. F.; RIVIER, C. L. Alcohol self-administration acutely stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but alcohol dependence leads to a dampened neuroendocrine state. **Eur. J. Neurosci.,** v. 28, n. 8, p. 1641-1653, 2008.

RIEDEL, W. Role of nitric oxide in the control of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Z. Rheumatol.,** v. 59, p. 36-42, 2000.

RIPLEY, T. L.; LITTLE, H. G. Effects on ethanol withdrawal hyperexcitability of chronic treatment with a competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. **J. Pharmac. Exp. Ther.,** v. 272, p. 112-118, 1995.

RIVIER, C.; BRUHN, T.; VALE, W. Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor (CRF). **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 229, n. 1, p. 127-131, 1984.

RIVIER, C. Female rats release more corticosterone than males in response to alcohol: influence of circulating sex steroids and possible consequences for blood alcohol levels**. Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 17, n. 4, p. 854-859, 1993.

ROBERTS, A. J.; LESSOV, C. N.; PHILLIPS, T. J. Critical role for glucocorticoid receptors in stress- and ethanol-induced locomotor sensitization. **J. Pharmac. Exp. Ther.,** v. 275, p. 790-797, 1995.

RON, D.; WANG, J. The NMDA receptor and alcohol addiction. In: VAN DONGEN, A. M. (Ed.). Biology of the NMDA receptor. Boca Raton (FL): CRC Press, 2009. Chapter Frontiers in Neuroscience.

SARDÁ, J. J.; LEGAL, E. J.; JABLONSKI, S. J. **Estresse**: conceitos, métodos, medidas e possibilidades de intervenção. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2004.

SARTOR, C. E.; WALDRON, M.; DUNCAN, A. E.; GRANT, J. D.; McCUTCHEON, V. V.; NELSON, E. C.; MADDEN, P. A.; BUCHOLZ, K. K.; HEATH, A. C. Childhood sexual abuse and early substance use in adolescent girls: the role of familial influences. **Addiction,** 2013. (Epub ahead of print).

SCHÄFER, I.; TESKE, L.; SCHULZE-THÜSING, J.; HOMANN, K.; REIMER, J.; HAASEN, C.; HISSBACH, J.; WIEDEMANN, K. Impact of childhood trauma on hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity in alcohol-dependent patients. **Eur. Addict. Res.,** v. 16, n. 2, p. 108-114, 2010.

SCHULMAN, J. A.; WEIGHT, F. F. Synaptic transmission: long-lasting potentiation by a postsynaptic mechanism. **Science,** v. 194, n. 4272, p. 1437-1439, 1976.

SCHULMAN, H. Nitric oxide: a spatial second messenger. **Mol. Psychiatr.,** v. 2, p. 296-299, 1997.

SEGAL, D. S.; KUCZENSKI, R.; FLORIN, S. M. Does dizocilpine (MK-801) selectively block the enhanced responsiveness to repeated amphetamine administration? **Behav. Neurosci.,** v. 109, n. 3, p. 532-546, 1995.

SELYE, H. **The stress of life**. New York: McGraw Hill, 1984. (publicado originalmente em 1956).

SHENG, M.; CUMMINGS, J.; ROLDAN, L. A. JAN, Y. N.; JAN, L. Y. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. **Nature,** v. 368, n. 6467, p. 144-147, 1994.

SHENG, H.; ZHANG, Y.; SUN, J.; GAO, L.; MA, B.; LU, J.; NI, X. Corticotropin-releasing hormone (CRH) depresses n-methyl-D-aspartate receptor-mediated current in cultured rat hippocampal neurons via CRH receptor type 1. **Endocrinology,** v. 149, n. 3, p. 1389-1398, 2008.

SILVERI, M. M.; SPEAR, L. P. Decreased sensitivity to the hypnotic effects of ethanol early in ontogeny. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 22, p. 670-676, 1998.

SILVERI, M. M.; SPEAR, L. P. The effects of NMDA and GABA A pharmacological manipulations on acute and rapid tolerance to ethanol during ontogeny. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 28, n. 6, p. 884-894, 2004.

SIRCAR, R.; SIRCAR, D. Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 29, p. 1402-1410, 2005.

SMITH, S. S.; LI, J. Novel action of nitric oxide as mediator of N-methyl-D-aspartate-induced phosphatidylinositol hydrolysis in neonatal rat cerebellum. **Mol. Pharmacol.,** v. 43, p. 1-5, 1993.

SNYDER, S. H.; DAWSON, T. M.; Nitric oxide and related substances as neural messengers. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. (Ed.) **Psychopharmacology:** the fourth generation of progress. New York: Raven Press, 1995. p. 609-618.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci. Biobehav. Rev.,** v. 24, p. 417-463, 2000.

SPEAR, L. P.; VARLINSKAYA, E. I. Adolescence, alcohol sensitivity, tolerance and intake. **Recent Dev. Alcohol,** v. 17, p. 143-159, 2005.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia**: bases neurocientíficas e aplicações práticas. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 686 p.

STEVENSON, R. A.; BESHEER, J.; HODGE, C. W. Comparison of ethanol locomotor sensitization in adolescent and adult DBA/2J mice. **Psychopharmacology,** v. 197, p. 361-370, 2008.

STEWART, D. C.; BROWN, S. A. Withdrawal and dependency symptoms among adolescent alcohol and drug abusers. **Addiction,** v. 90, n. 5, p. 627-635, 1995.

STEWART, J.; VEZINA, P. A comparison of the effects of intra-accumbens injections of amphetamine and morphine on reinstatement of heroin intravenous self-administration behavior. **Brain Res.,** v. 457, n. 2, p. 287-294, 1988.

STUHER, D. J.; KWON, N. S.; NATHAN, C. F.; GRIFFITH, O. W.; FELDMAN, P. L.; WISEMAN, J. N-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **J. Biol. Chem.,** v. 266, p. 6259-6263, 1991.

SUTO, N.; TANABE, L. M.; AUSTIN, J. D.; CREEKMORE, E.; VEZINA, P. Previous exposure to VTA amphetamine enhances cocaine self-administration under a progressive ratio schedule in an NMDA, AMPA/kainate, and metabotropic glutamate receptor-dependent manner. **Neuropsychopharmacology,** v. 28, n. 4, p. 629-639, 2003.

SWARTZWELDER, H. S.; WILSON, W. A.; TAYYEB, M. I. Age-dependent inhibition of long-term potentiation by ethanol in immature versus mature hippocampus. **Alcohol. Clin. Exp. Res.,** v. 19, n. 6, p. 1480-1485, 1995.

TAPERT, S. F.; BROWN, S. A.; MYERS, M. G.; GRANHOLM, E. The role of neurocognitive abilities in coping with adolescent relapse to alcohol and drug use. **J. Stud. Alcohol,** v. 60, n. 4, p. 500-508, 1999.

TREVISAN, L.; FITZGERALD, L. W.; BROSE, N.; GASIC, G. P.; HEINEMANN, S. F.; DUMAN, R. S.; NESTLER, E. J. Chronic ingestion of ethanol up-regulates NMDAR1 receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus. **J. Neurochem.,** v. 62, n. 4, p. 1635-1638, 1994.

UNGLESS, M. A.; SINGH, V.; CROWDER, T. L.; YAKA, R.; RON, D.; BONCI, A. Corticotropin-releasing factor requires CRF binding protein to potentiate NMDA receptors via CRF receptor 2 in dopamine neurons. **Neuron,** v. 39, n. 3, p. 401-407, 2003.

VALLANO, M. L. Developmental aspects of NMDA receptor function. **Crit. Rev. Neurobiol.,** v. 12, n. 3, p. 177-204, 1998.

VANDERSCHUREN, L. J.; KALIVAS, P. W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology (Berl.),** v. 151, n. 2-3, p. 99-120, 2000.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Chronic tolerance to the social consequences of ethanol in adolescent and adult Sprague-Dawley rats. **Neurotoxicol. Teratol.,** v. 29, p. 23-30, 2007.

VENDRUSCOLO, L. F.; BARBIER, E.; SCHLOSBURG, J. E.; MISRA, K. K.; WHITFIELD, T. W.; LOGRIP, M. L.; RIVIER, C.; REPUNTE-CANONIGO, V.; ZORRILLA, E. P.; SANNA, P. P.; HEILIG, M.; KOOB, G. F. Corticosteroid-dependent plasticity mediates compulsive alcohol drinking in rats. **J. Neurosci.,** v. 32, n. 22, p. 7563-7571, 2012.

VEZINA, P.; KIM, J. H. Metabotropic glutamate receptors and the generation of the locomotor activity: interactions with midbrain dopamine. **Neurosci. Biobehav. Rev.,** v. 23, p. 577-589, 1999.

WEDZONY, K.; GOLEMBIOWSKA, K.; KLIMEK, V. MK-801-induced symptoms of sensitization. The lack of correlation with the extracellular concentration of dopamine in the rat prefrontal cortex. **Brain Res.,** v. 625, n. 2, p. 333-336, 1993.

WEDZONY, K.; CZYRAK, A. The role of corticosteroids in the acquisition of sensitization to locomotor stimulant effects of MK-801. **Brain Res.,** v. 657, n. 1-2, p. 351-356, 1994.

WEIDENFELD, J.; FELDMAN, S.; DEKEYSER, F. G.; OVADIA, H. Effect of exogenous nitric oxide and inhibitors of nitric oxide synthase on the hypothalamic pituitary adrenal axis responses to neural stimuli. **Neuroendocrinology,** v. 70, p. 153-159, 1999.

WINSLOW, J. T.; INSEL, T. R.; TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Rat pup isolation calls are reduced by functional antagonists of the NMDA receptor complex. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 190, n. 1-2, p. 11-21, 1990.

WISE, R. A.; MENDREK, A.; CARLEZON, W. A. Jr. MK-801 (dizocilpine): synergist and conditioned stimulus in bromocriptine-induced psychomotor sensitization. **Synapse,** v. 22, n. 4, p. 362-368, 1996.

WOODWARD, J. J. Ethanol and NMDA receptor signaling. **Crit. Rev. Neurobiol.,** v. 14, n. 1, p. 69-89, 2000.

WOLF, M. E.; WHITE, F. J.; HU, X. T. Behavioral sensitization to MK-801 (dizocilpine): neurochemical and electrophysiological correlates in the mesoaccumbens dopamine system. **Behav. Pharmacol.,** v. 4, n. 4, p. 429-442, 1993.

WOLF, M. E. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. **Prog. Neurobiol.,** v. 54, n. 6, p. 679-720, 1998.

YAMADA, K.; NODA, Y.; NAKAYAMA, S.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; HASEGAWA, T.; NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. **Br. J. Pharmacol.,** v. 115, p. 852-858, 1995.

YAMAKURA, T.; MORI, H.; MASAKI, H.; SHIMOJI, K.; MISHINA, M. Different sensitivities of NMDA receptor channel subtypes to non-competitive antagonists. **Neuroreport,** v. 4, n. 6, p. 687-690, 1993.

YAN, H.; LI, QIANG; MADISON, R.; WILSON, W. A.; SWARTZWELDER, S. Differential sensitivity of hippocampal interneurons to ethanol in adolescent and adult rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 335, n. 1, p. 51-60, 2010.

ZHANG, X. F.; HU, X. T.; WHITE, F. J.; WOLF, M. E. Increased responsiveness of ventral tegmental area dopamine neurons to glutamate after repeated administration of cocaine or amphetamine is transient and selectively involves AMPA receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 281, n. 2, p. 699-706, 1997.

ZORRILLA, E. P.; KOOB, G. F. The therapeutic potential of CRF1 antagonists for anxiety. **Expert. Opin. Investig. Drugs,** v. 13, n. 7, p. 799-828, 2004.