SABRINA LUCIO SOARES

Alterações na ativação do CREB e nos níveis de BDNF induzidas pelo etanol em camundongos adolescentes e adultos

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

São Paulo
2011

SABRINA LUCIO SOARES

Alterações na ativação do CREB e nos níveis de BDNF induzidas pelo etanol em camundongos adolescentes e adultos

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Camarini

Versão Original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Soares, Sabrina Lucio.
Alterações na ativação do CREB e nos níveis de BDNF induzidas pelo etanol em camundongos adolescentes e adultos / Sabrina Lucio Soares. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Rosana Camarini.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Dependência ao etanol em animais adolescentes.

Versão do título para o inglês: Alterations on CREB activation and BDNF levels induced by ethanol in adolescent and adult mice.

Descritores: 1. Dependência 2. Sensibilização comportamental 3. Etanol 4. Adolescência 5. CREB 6. BDNF I. Camarini, Rosana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB090/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sabrina Lucio Soares.

Título da Tese: Alterações na ativação do CREB e nos níveis de BDNF induzidas pelo etanol em camundongos adolescentes e adultos.

Orientador(a): Rosana Camarini.

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

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

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

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

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

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **116** nas fls. **37** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Rosana Camarini, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Efeitos do tratamento prolongado com etanol sobre a sinalização da via do AMPc em camundongos adolescentes e adultos***" do qual participou(aram) o(s) alunos **Sabrina Lucio Soares, Priscila Carrara, Jaqueline Rocha, Rulian Ricardo Faria, André Rueda e o pesquisador Cristóforo Scavone,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **17.08.2006.**

São Paulo, 17 de agosto de 2006.

Prof. Dr. UBIRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA – ICB/USP

sabina

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 - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.41.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 116/06/CEEA datado de 17/08/069, por solicitação da Profa. Dra. Rosana Camarini, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de novo delineamento experimental ao projeto de pesquisa "***Efeitos do tratamento prolongado com etanol sobre a sinalização da via do AMPc em camundongos adolescentes e adultos***", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 03 de agosto de 2009.

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

Aos meus pais que souberam de

forma sublime aproximar a distância

entre nossas gerações, para

caminhar ao meu lado.

Ao Cássio pelo amor e amizade.

AGRADECIMENTOS

Esse é um momento em que nossa cabeça nos faz voltar ao tempo para resgatar todos aqueles momentos relevantes que simbolizam o fechamento de um ciclo. Muitas foram as dificuldades pelas quais passei, muitas lágrimas foram derramadas, mas, tenho certeza, que conquistei muitas vitórias. Dedico esse pequeno trecho da minha Tese para agradecer a todos aqueles que participaram de alguma forma desse processo.

Agradeço primeiramente à minha orientadora e amiga Profa. Rosana Camarini que acreditou em mim quando abriu as portas do laboratório que estava em início de montagem (quantas reformas passamos juntas!) e permitir que eu fizesse parte da sua história como orientadora. Obrigada pela confiança. Aprendi muito compartilhando a vivência do laboratório. Ri e chorei com todos que por ali passaram e isso me tornou uma pessoa melhor do que quando entrei. Obrigada pela oportunidade e por permitir compartilhar do seu conhecimento e da sua alegria.

Ao Prof. Cristoforo Scavone, agradeço por abrir as portas do laboratório, por me orientar e incentivar. Agradeço também a todos os integrantes do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular pelo apoio com os experimentos de EMSA.

À Prof. Regina Pekelmann Markus e Profa. Zulma Ferreira obrigada por me ajudar com os ensaios de EMSA e por abrir as portas do laboratório nos momentos em que precisei.

Agradeço ao Prof. Jackson e à Profa. Luciane pela orientação com os ensaios de Imuno-histoquímica e por me receberem de portas abertas desde o início. Aproveito também para agradecer as Técnicas Joelcimar e Amanda pela orientação na execução dos experimentos e a todos os alunos do laboratório. Renata, muito obrigada pela força.

À Profa. Elizabeth Teodorov, agradeço pela ajuda com os ensaios de Western Blot e orientações em geral. Seu apoio foi fundamental nesse processo.

Ao Prof. Roberto De Lucia muito obrigada pela orientação no início do meu ingresso na Pós-graduação, e pelo apoio e atenção.

Aos amigos e colegas do laboratório, André, Priscila, Rulian, Ana Maria, Daniel, Jaqueline, Maria Cristina, Mariana e Diego, obrigada pela oportunidade de conviver e aprender com todos vocês. Vou levar comigo ótimas lembranças.

Agradeço aos técnicos Mateus e Manoel pelo apoio e seriedade com a manipulação dos animais de experimentação, e pelas conversas e risadas que compartilhamos durante esse período.

À amiga Marília, a minha gratidão pela amizade e apoio. Obrigada por estar ao meu lado e ter me ajudado em tantos momentos. Cecília, obrigada pela amizade, ajuda com os experimentos e conversas pelos corredores do ICB. Aprendi muito com vocês. Iniciamos juntas nosso caminho na Pós-graduação e foi incrível poder compartilhar tantas experiências com vocês duas.

Aos amigos da UNIFESP, agradeço as sugestões e a companhia maravilhosa. Foi fantástico ter compartilhado tantos momentos com vocês, os quais serão guardados com muito carinho.

Aos animais de experimentação, meu eterno respeito por proporcionarem o desenvolvimento desse trabalho que resulta em mais uma peça importante na construção do conhecimento científico.

Aos meus pais Mara e Acyr, pelo apoio incondicional durante os quase 9 anos em que me dediquei à pesquisa. Sei o quanto foi difícil para vocês entenderem as minhas razões, mas saibam que eu não teria conseguido alcançar mais essa vitória sem o apoio de vocês. Obrigada mãe pelo incentivo diário para me impulsionar nos momentos mais difíceis. Você é maravilhosa. Obrigada pela confiança e amor. Vocês foram peça fundamental para que eu me tornasse quem sou hoje e sempre serão fundamentais na minha vida. Espero poder retribuir tudo o que fizeram por mim.

Ao meu marido Cássio, obrigada pelo amor, carinho, paciência e por dividir comigo mais essa conquista. Meu querido, obrigada por me apoiar em mais esse desafio e por me ouvir quando precisei desabafar e por oferecer seu abraço tão acolhedor.

Agradeço à minha família pelo carinho e por acreditarem em mim. Aos meus irmãos Fernando, Denis e Lúcio, obrigada por permitir que eu compartilhasse das suas vidas, e por me fazerem rir em tantos momentos. Amo muito vocês.

Aos meus sobrinhos maravilhosos agradeço o carinho e companheirismo. Obrigada por me encherem de alegria toda vez que estamos juntos. Amo demais e incondicionalmente.

Agradeço aos queridos Bruno e Nicinha por me acolherem na família. Vocês compartilharam toda a trajetória do Doutorado e foram muito importantes no meu desenvolvimento. Aos queridos Virgílio, Patrícia e Dante obrigada pelo carinho.

Aos meus animais, agradeço imensamente pelo acalanto. Bóris, você não teve tempo de comemorar essa alegria comigo, mas seu amor foi grandioso.

E a todos aqueles que participaram de alguma forma para essa conquista.

À FAPESP e CNPq por permitirem a realização desse trabalho.

E a Deus, por permitir minha existência e me dar coragem de seguir em frente.

"O saber é saber que nada se sabe. Esta é a definição
do verdadeiro conhecimento".
Kung-Fu-Tse

RESUMO

SABRINA, L. S. **Alterações na ativação do CREB e nos níveis de BDNF induzidas pelo etanol em camundongos adolescentes e adultos.** 2011. 126 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A exposição à de drogas de abuso na adolescência tem sido associada à maior vulnerabilidade à dependência. O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos do etanol sobre a modulação de CREB e BDNF no córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD) submetidos à sensibilização comportamental (SC). ADL não sensibilizaram, tiveram discreto aumento na imunorreatividade de pCREB e na ativação do CREB, e redução nos níveis de BDNF após tratamento repetido com etanol. A exposição precoce a drogas pode influenciar a vulnerabilidade à dependência.

Palavras-chave: Dependência. Sensibilização Comportamental. Etanol. Adolescência. CREB. BDNF.

ABSTRACT

SABRINA, L. S. **Alterations on CREB activation and BDNF levels induced by ethanol in adolescent and adult mice**. 2011. 126 p. Ph. D. Thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Exposure to drugs of abuse during adolescence has been associated to greater vulnerability to addiction. The aim of the present work was investigate ethanol effects on CREB and BDNF modulation within the prefrontal cortex and hippocampus of adolescent (ADL) and adult (AD) mice submitted to behavioral sensitization. ADL did not sensitize, showed discreet increase in immunoreactivity to pCREB and in CREB activation, and reduction in BDNF levels after repeated treatment with ethanol. Earlier exposure to drugs could influence vulnerability to addiction.

Key words: Addiction. Behavioral Sensitization. Ethanol. Adolescents. CREB. BDNF.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais e tratamentos realizados no Experimento I 61

Tabela 2 - Grupos experimentais e tratamentos realizados no Experimento II.....63

Tabela 3 - Resumo dos resultados obtidos.....92

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principal circuitaria motivacional encefálica envolvida com a impulsividade, tomada de decisão e dependência.....35

Figura 2. Circuito Cortical-Estriatal-Talâmico-Cortical dentro do Circuito Motivacional Primário.....37

Figura 3. Modelo tradicional de discussão sobre o comportamento adolescente como conseqüência do retardo no desenvolvimento do Córtex pré-frontal (CPF).....40

Figura 4. Organização do gene e estrutura dos domínios dos fatores de transcrição da família do CREB.....42

Figura 5. Relação entre os fatores de transcrição CREB e CREM na vigência de um estímulo.....43

Figura 6. Desenho experimental para se avaliar os efeitos do tratamento agudo com etanol sobre a atividade locomotora.....62

Figura 7. Desenho experimental para se avaliar os efeitos do tratamento repetido com etanol sobre a atividade locomotora.....64

Figura 8. Efeito do tratamento agudo com etanol (2,0 g/kg) sobre a locomoção total de camundongos adultos (n=19).....66

Figura 9. Dosagem temporal da alcoolemia em camundongos adultos.....67

Figura 10. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de competição no Córtex pré-frontal (CPF) e Hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes.....68

Figura 11. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de competição no Córtex pré-frontal (CPF) e Hipocampo (HPC) de camundongos adultos.....69

Figura 12. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de supershift no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adolescentes.....70

Figura 13. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de supershift no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adultos.....71

Figura 14. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de supershift no Hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes.....72

Figura 15. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de supershift no Hipocampo (HPC) de camundongos adultos.....73

Figura 16. **A.** Avaliação temporal da ativação do CREB no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adultos. **B.** Análise densitométrica das Bandas 1 e 2. 75

Figura 17. **A.** Avaliação temporal da ativação do CREB no Hipocampo (HPC) de camundongos adultos. **B.** Análise densitométrica das Bandas 1 e 2.....76

Figura 18. Efeitos da administração diária e repetida (D1 a D15) de etanol (2,0 g/kg) sobre a atividade locomotora de camundongos ADL e AD (n=14 a 17) 79

Figura 19. Alcoolemia de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD). no dia D22, após a última injeção de etanol (n=6).....80

Figura 20. **A.** Efeito do tratamento agudo e repetido com etanol (2,0 g/kg) sobre a ativação do CREB no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD). **B.** Análise densitométrica das Bandas 1 e 2.....81

Figura 21. **A.** Efeito do tratamento agudo e repetido com etanol (2,0 g/kg) sobre a ativação do CREB no Hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD). **B.** Análise densitométrica das Bandas 1 e 2.....83

Figura 22. **A.** Determinação da razão protéica pCREB/CREB no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD), submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental. **B.** Análise densitométrica das bandas.....85

Figura 23. **A.** Determinação da razão protéica pCREB/CREB no Hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD), submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental. **B.** Análise densitométrica das bandas.....86

Figura 24. Imunorreatividade do fator de transcrição CREB na sua forma fosforilada no córtex pré-límbico (PrL) e medial orbital (MO) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD) submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental.....88

Figura 25. Determinação dos níveis de BDNF no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD), submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental.....91

Figura 26. Determinação dos níveis de BDNF no Hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD), submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental.....92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - Serotonina

A2 – receptores de adenosina

AC – adenilil ciclase

AC - córtex cingulado anterior

AD – adultos (s)

ADL – adolescente (s)

ADP - difosfato de adenosina

ADP - difosfato de adenosina

AGm - córtex frontal agranular

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

AMPc-PKA -adenosina monofosfato cíclico – proteína quinase A

ATF-1 - ativador do fator de transcrição 1

ATP - trifosfato de Adenosina

AVTM - área ventral do tegmento mesencefálico

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

cAI - genes induzidos pelo AMPc

CaMK - quinase calmodulina Ca^{2+}/calmodulina

CaMKII – quinase calmodulina do tipo II Ca^{2+}/calmodulina

CaMKIV - quinase calmodulina do tipo IV dependente de Ca^{2+}/calmodulina

CBP - proteína de ligação ao CREB

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas

CPF - córtex pré-frontal

CPFm - córtex pré-frontal medial

CRE – elemento de resposta ao AMPc

CREB - proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc

CREM - modulador do elemento de resposta ao AMPc

D1 - receptores dopaminérgicos do tipo D_1

D2 - receptores dopaminérgicos do tipo D2

DA – dopamina

DNA - ácido desoxirribonucléico

DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association)

GABA - ácido gama-aminobutírico

$GABA_A$ - receptor gabaérgico $GABA_A$

$GABA_B$ - receptor gabaérgico $GABA_B$

HPC – hipocampo

ICER - repressores precoces induzidos pelo AMPc

IL – infralímbico

PI3K - fosfatidil inositol-3-quinase

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

MO – medial orbital

NAc - núcleo accumbens; estriado ventral

NMDA – receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato

OMS - Organização Mundial de Saúde

pCREB - CREB na sua forma fosforilada

PI3K/Akt - fosfatidil-inositol 3-quinase/Akt

PKA – proteína quinase A

PLC - fosfolipase C

PrL - córtex pré-límbico

SENAD - Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas

SNC - sistema nervoso central

TrkB - receptores do tipo tirosina quinase B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
1.1 Epidemiologia do uso de Álcool 22
1.2 Neurobiologia da Dependência 23
1.3 Dependência na Adolescência 24
1.4 Mecanismo de ação do Etanol 28
1.5 Sensibilização Comportamental e Etanol 31
1.6 Substratos neuroanatômicos da dependência na adolescência 34
1.7 Papel de fatores de transcrição da família do CREB na dependência ao etanol 41
1.8 Papel do BDNF na dependência ao etanol 46
1.9 Justificativa 48
2 OBJETIVOS 49
3 MATERIAL E MÉTODOS 50
3.1 Animais 50
3.2 Drogas/Tratamento 50
3.3 Registro da atividade geral de camundongos em campo aberto 51
3.4 Alcoolemia 51
3.5 Extração e determinação da concentração de proteínas nucleares 52
3.6 Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA) para o fator de transcrição CREB 53
3.6.1 Marcação da Sonda (^{32}P-CREB) 53
3.6.2 Reação de ligação e migração eletroforética 54
3.7 Ensaio de Western Blot 55
3.8 Avaliação dos níveis de BDNF por ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay) 57
3.9 Imunorreatividade de pCREB no CPFm 58
3.10 Análise estatística 60
3.11 Delineamento experimental 61

3.11.1 Experimento I – Efeitos da administração aguda de etanol na atividade locomotora e avaliação temporal da ativação do CREB no CPF e HPC de camundongos machos adultos...61
3.11.2 Experimento II – Efeitos da administração aguda e repetida de etanol sobre a atividade locomotora, a ativação do CREB, razão entre níveis proteicos de pCREB/CREB, imunorreatividade de pCREB e níveis de BDNF no CPF e HPC de camundongos machos adolescentes e adultos.....63
2.11.2.1 Sensibilização Comportamental.....63
4 RESULTADOS.....66
4.1 Experimento I – Efeitos da administração aguda de etanol na atividade locomotora e avaliação temporal da ativação do CREB no CPF e HPC de camundongos machos adultos.....66
4.1.1 Atividade locomotora.....66
4.1.2 Alcoolemia 67
4.1.3 Caracterização do Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (Eletrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA) para o fator de transcrição CREB.....67
4.1.4 Avaliação temporal da ativação do CREB após tratamento agudo com etanol.....74
4.2 Experimento II – Efeitos da administração aguda e repetida de etanol sobre a atividade locomotora, a ativação do CREB, razão entre níveis proteicos de pCREB/CREB, imunorreatividade de pCREB e níveis de BDNF no CPF e HPC de camundongos machos adolescentes e adultos 77
4.2.1 Atividade locomotora 77
4.2.2 Alcoolemia.....79
4.2.3 Ativação do CREB no CPF e HPC *80*
4.2.4 Razão entre níveis proteicos de pCREB/CREB no CPF e HPC.84
4.2.5 Imunorreatividade de pCREB no CPFm.....86
4.2.6 Níveis de BDNF avaliados por ELISA no CPF e no HPC.....*90*
5 DISCUSSÃO.....93
6 CONCLUSÕES.....*106*

REFERÊNCIAS..... *110*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do uso de Álcool

O uso de álcool tem aumentado em todo mundo. No Brasil, em pesquisa realizada pelo CEBRID em colaboração com o SENAD, intitulada II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil, publicado em 2005, envolvendo uma amostra de 7.939 brasileiros, com idade entre 12 e 65 anos, de 108 cidades com mais de 200 mil habitantes, demonstrou-se que 74,6% dos indivíduos eram usuários de bebidas alcoólicas, porcentagem maior do que a registrada em 2001 (68,7%) (CEBRID e SENAD, 2005). Em relação ao etanol, foi registrada a incidência de 12,3% de dependentes entre os entrevistados, porcentagem semelhante à observada em países como Chile com 12,6% (CONSELHO NACIONAL PARA CONTROLE DE ESTUPEFACIANTES - CONACE, 2006). Dentre os sinais/sintomas que determinam o diagnóstico da dependência ao álcool, os mais citados foram o "desejo de diminuir ou parar o uso", seguido pela "perda do controle em beber". Entre o *uso* e dependência, foi verificado que a cada 4 pessoas do sexo masculino, uma delas se torna dependente.

No entanto, os dados do CEBRID mostraram que a as pessoas não tem uma visão abrangente quanto ao risco de desenvolver a dependência. Esse mesmo levantamento domiciliar demonstrou que na faixa etária entre 12 e 17 anos de idade, a prevalência de uso de álcool foi de 54,3% e de dependência de 7%. É interessante observar que esses indivíduos dessa faixa etária relataram o fenômeno da tolerância ao uso do Álcool (CEBRID e SENAD, 2005). Dados obtidos pela OMS em 2001 mostraram que a idade média para início do consumo de álcool foi entre 16 e 19 anos na maioria dos países e que esse hábito é comum, principalmente na Europa, Américas e Oceania (DEGENHARDT et al., 2008).

1.2 Neurobiologia da Dependência

O uso de drogas psicotrópicas está enquadrado em normas sociais, sendo parte de rituais religiosos para algumas culturas e considerado como abuso para outras. Essas substâncias possuem capacidade de reforço que se refere ao potencial da droga em induzir um aumento na probabilidade de resposta. Dentro desse conceito, a droga pode ser definida como um estímulo que funciona como reforçador positivo pelos efeitos prazerosos que produz ou como reforçador negativo, por aliviar os sintomas da abstinência (KOOB e LE MOAL, 1997; PANDEY, 2004b). As características de reforço positivo e negativo das drogas de abuso e as neuroadaptações decorrentes do seu uso prolongado contribuem para o processo de dependência.

A dependência à substâncias psicotrópicas, retratada pela DSM-IV, é definida como uma desordem crônica, caracterizada pelo comportamento compulsivo pela procura e consumo (motivação exacerbada), pela perda do controle sobre a interrupção ou limitação do uso e finalmente, pela administração contínua da droga apesar das conseqüências adversas (disforia, ansiedade, irritabilidade) quando o acesso à esta é limitado. As características comportamentais citadas acima são consideradas fundamentais pela DSM-IV para constatação da dependência (APA, 1994; DEROCHE-GAMONET; BELIN; PIAZZA, 2004).

Essa desordem, compreendida como doença neurobiológica crônica, é uma condição multifatorial resultante da interação de determinantes biológicos, psicológicos e sociais, causada pela exposição repetida do encéfalo à droga, e se desenvolve em estágios, indo de um grau mais leve ao mais intenso (VOLKOW e LI, 2005). Nesse sentido, fatores genéticos, ambientais e intrínsecos de cada substância contribuem para que um indivíduo desenvolva ou não a dependência (VOLKOW, 2008).

Uma vez estabelecida, essa desordem pode se tornar uma condição longa na vida do indivíduo, o qual apresenta fissura intensa e aumento na probabilidade de recaída mesmo após décadas de abstinência (NESTLER, 2005; RON e JURD, 2005), sendo esse um dos fatores clínicos mais complicados de serem tratados no indivíduo dependente. A reexposição

aguda à droga, às pistas ambientais ou ao estresse pode reinstalar esse processo (SHAHAM e HOPE, 2005). Portanto, a dependência envolve mudanças neuroadaptativas estáveis no cérebro que são responsáveis por esse padrão de comportamento (NESTLER, 2001). Esse quadro adaptativo relacionado à recompensa vem sendo compreendido como uma forma de estabelecimento de memória e aprendizagem (HYMAN, 2006; ROSS e PESELOW, 2009).

No entanto, a dependência decorre não somente de neuroadaptações associadas ao consumo repetido de drogas de abuso, mas também depende das propriedades de reforço da droga. Os sinais observáveis dessa neuroadaptação incluem atenuação (tolerância) ou aumento (sensibilização) dos efeitos iniciais da droga (NESTLER e AGHAJANIAN, 1997), bem como o surgimento da síndrome de abstinência. O reforço, por sua vez, é definido como o potencial da droga em induzir aumento na probabilidade de resposta, sendo considerado um efeito retroativo do aprendizado que surge após o reforço do comportamento (WISE, 2004).

Apesar de as drogas de abuso apresentarem estrutura química diversa, bem como distintos mecanismos de ação e efeito farmacológico, todas são agudamente recompensadoras, podendo promover uso repetido e levar eventualmente, indivíduos vulneráveis ao desenvolvimento da dependência. Essas substâncias também induzem a sintomas emocionais negativos na abstinência, períodos prolongados de sensibilização, além de aprendizado associativo entre as pistas ambientais e a recompensa resultante da sua administração (NESTLER, 2005).

1.3 Dependência na Adolescência

Inúmeras evidências têm mostrado que a dependência ao álcool, tabaco e cannabis emerge mais rapidamente quando o consumo/abuso dessas drogas começa na adolescência (GRANT e DAWSON, 1997; SPEAR, 2000; WAGNER; JAMES; ANTHONY, 2002; CREWS e HODGE, 2007). Existem dois fatores importantes quanto à aquisição da dependência: a

quantidade de droga consumida e a vulnerabilidade inerente à dependência, frente a uma quantidade fixa de droga consumida (NESTLER, 2001). A compreensão quanto ao fato de um desses fatores ou ambos serem aumentados na adolescência, é relevante para a elucidação do início do desenvolvimento de distúrbios relacionados ao uso de drogas (CHAMBERS; TAYLOR; POTENZA, 2003).

Eventos relacionados ao desenvolvimento cerebral que facilitam comportamentos motivacionais promovendo aprendizado na vida adulta, podem simultaneamente aumentar a vulnerabilidade à ação de drogas de abuso, levando a distúrbios no uso de substâncias (CHAMBERS; TAYLOR; POTENZA, 2003).

O encéfalo do adolescente é uma estrutura em transição, e difere anatomicamente e neuroquimicamente daquele do adulto. A adolescência é um período gradual de transição entre a infância e a idade adulta, caracterizado por uma série de eventos, dificultando assim a definição de seus limites de início e de término. A puberdade, definida como a obtenção da maturidade sexual, por sua vez, é parte das transições graduais que caracterizam a adolescência e, em humanos, está diretamente associada ao inicio da puberdade. Em humanos, a duração da adolescência segue aproximadamente dos 12 aos 18 anos, enquanto em roedores esse limite segue aproximadamente dos dias 28 a 42 após o nascimento (SPEAR, 2000). No transcorrer da adolescência, as semelhanças compartilhadas por diversas espécies de mamíferos quanto às alterações comportamentais, hormonais e neurais, justificam o uso de modelos animais na adolescência para se avaliar a contribuição desses traços nessa fase do desenvolvimento (SPEAR, 2004).

As manifestações comportamentais características dessa fase são aumento do tempo gasto em interações sociais, a busca por novidades e sensações (*novelty/sensation-seeking behavior*), impulsividade (*impulsivity*) e a tomada de atitudes de risco (*risk-taking behavior*). Esses traços propiciam a exploração de novos comportamentos e situações, bem como o aumento de contato fora do ambiente familiar necessários para a aquisição de habilidades para o desenvolvimento da independência (SPEAR, 2000; CREWS e HODGE, 2007).

No entanto, altos níveis de comportamento de busca de novidades/sensações tem sido considerados fatores preditivos ao uso de álcool e drogas de abuso entre adolescentes humanos (CRAWFORD et al., 2003; WINDLE et al., 2008; MASSE e TREMBLEY, 1997), assim como o aumento da impulsividade.

A impulsividade, no contexto da dependência, é definida como um comportamento direcionado a um objetivo, sendo caracterizada pela fraqueza de julgamento na obtenção de uma recompensa (sexo, drogas, alimentos, dinheiro, entre outros), podendo levar a conseqüências deletérias. Comportamentos caracterizados por aumento na procura por novidades e/ou por baixa capacidade de tomada de decisões podem ser considerados impulsivos, e se encontram aumentados na adolescência, declinando com a idade (CHAMBERS; TAYLOR; POTENZA, 2003; CREWS e BOETTIGER, 2009).

Comparados aos indivíduos adultos, os indivíduos adolescentes ou mesmo os adultos que iniciaram o consumo na adolescência percorrem um caminho mais rápido à dependência, com períodos curtos entre a primeira exposição e a dependência ao álcool e *cannabis*, além de menor tempo entre a dependência por uma determinada droga e escalada para uma segunda substância (CLARK et al., 1998). Esse fato intensifica a idéia de que indivíduos adolescentes apresentam intensificação no comportamento de procura por sensações recompensadoras.

O consumo de álcool entre adolescentes pode comprometer o desempenho escolar, está associado ao tabaco e drogas ilícitas e pode causar alterações na estrutura e funções do encéfalo em desenvolvimento (WINDLE et al., 2008). Além disso, o consumo precoce tem sido associado ao envolvimento com sexo, muitas vezes de risco, podendo envolver alto risco de gravidez indesejada e contaminação por doenças sexualmente transmissíveis e acidentes no trânsito (EATON et al., 2006). Esses comportamentos têm sido relacionados à dificuldade de controle dos impulsos (CASEY et al., 2008).

Em relação ao estudo com álcool em roedores utilizando modelos de auto-administração, ratos adolescentes consomem mais etanol, relativo ao

peso corpóreo, do que ratos adultos (LANCASTER et al., 1996; TRUXELL; MOLINA; SPEAR, 2007). Esses dados corroboram estudos mais recentes que mostraram que, sob diversas condições contextuais e ambientais, ratos adolescentes consomem mais etanol do que os adultos da mesma espécie e sob as mesmas condições (DOREMUS et al., 2005).

Esses dados têm evidenciado que animais adolescentes não somente consomem de forma voluntária e substancial mais etanol do que os animais adultos como também diferem quanto a sua sensibilidade a vários efeitos induzidos pelo etanol. Nesse sentido, ratos adolescentes apresentam menor sensibilidade aos efeitos indesejáveis do etanol, que normalmente poderiam regular o consumo, como inibição social, sedação, prejuízo motor e efeitos de ressaca (VARLINSKAYA e SPEAR, 2002; HEFNER e HOLMES, 2007). Essa baixa sensibilidade aos efeitos negativos explica em parte o aumento na freqüência de consumo agudo *("binge")* entre adolescentes humanos. Contrastando esse fato, animais adolescentes apresentam maior sensibilidade à facilitação social induzida pelo etanol e ao prejuízo na potenciação de longa duração (*long term potenciation*; LTP) (SPEAR e VARLINSKAYA, 2010).

A partir das observações das mudanças associadas ao desenvolvimento, tem sido abordada pela literatura a hipótese de que a exposição precoce ao álcool possa tornar o indivíduo adulto mais vulnerável à dependência (DEWIT et al., 2000). Estudos sobre a epigenética do alcoolismo têm focado na função de componentes que remodelam a cromatina e, portanto, modulam a transcrição gênica (RENTHAL e NESTLER, 2008). Devido ao fato de o desenvolvimento neuronal atravessar o período da adolescência, as pesquisas em dependência têm procurado compreender quais são as conseqüências comportamentais e moleculares da exposição precoce às drogas de abuso. O uso de drogas durante a adolescência pode causar alterações na expressão de genes e fatores de transcrição, ou até na metilação de histonas, que podem perdurar mesmo após a interrupção do uso da droga (BLACK et al., 2006).

1.4 Mecanismo de ação do Etanol

O álcool, cuja palavra tem origem na palavra *al-kuhl*, representa uma série de compostos, sendo o etanol, tipicamente produzido pelo processo de fermentação de carboidratos por certas espécies de fungos do gênero *Sacharomyces*, o único direcionado ao consumo.

Os efeitos iniciais induzidos pelo consumo de álcool no SNC são desinibição, euforia e sedação, e na medida em que a dose consumida aumenta os indivíduos apresentam confusão mental, incoordenação motora, podendo levar ao coma.

Em comparação às demais drogas de abuso, o etanol é considerado uma droga fraca por exercer seus efeitos farmacológicos na ordem de gramas. No entanto, levando-se em consideração a simplicidade de sua estrutura química, seu mecanismo de ação é múltiplo e complexo influenciando muitos sistemas de neurotransmissão (sistema catecolaminérgico, opioidérgico, glutamatérgico, serotoninérgico, gabaérgico e colinérgico), promovendo alterações moleculares, celulares e portanto, mudanças nos sistemas neurais envolvidos (FADA e ROSSETI, 1998). De fato, pela natureza das suas ações, o etanol é considerado uma droga majoritariamente depressora do SNC.

Quanto à sua ação direta, o etanol é capaz de agir sobre os receptores gabaérgicos, sendo mais estudada sua ação sobre os receptores $GABA_{A.}$ Esses receptores são canais iônicos regulados por ligantes, permeáveis aos íons cloreto, e dependendo da sua composição podem ser mais ou menos sensíveis ao etanol. O GABA, principal aminoácido inibitório do encéfalo e de ampla ação, atua sobre os receptores $GABA_A$ e $GABA_B$, sendo a sua ação inibitória via $GABA_A$, facilitada na presença do etanol. A ação sobre o $GABA_B$, receptor metabotrópico acoplado à proteína Gi, está sendo investigada e acredita-se que a ativação desses receptores localizados na pré-sinapse previna a liberação de GABA, a qual é potencializada na presença de etanol, levando assim a tolerância induzida por essa droga (FADDA E ROSSETI, 1998; LOVINGER, 2008). A potencialização da transmissão gabaérgica parece contribuir com vários aspectos da intoxicação

aguda por etanol, como incoordenação motora, efeitos ansiolíticos e sedação. Quanto aos aspectos relacionados à exposição crônica, foi descrita redução na sensibilidade da atividade gabaérgica ($GABA_A$) ao etanol, como conseqüência de alterações nas subunidades desse receptor, com a ressalva de que dependendo da região cerebral, essa transmissão pode aumentar ou diminuir. Na abstinência, o efeito predominante é a superexcitabilidade podendo levar à ansiedade e até mesmo a convulsões (LOVINGER, 2008).

O etanol também exerce sua ação direta sobre os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, receptores pentaméricos ionotrópicos regulados por ligantes. Agudamente o etanol é capaz de inibir a transmissão sináptica glutamatérgica, principalmente mediada pelos receptores NMDA. Sendo o receptor NMDA envolvido com memória e aprendizagem, os efeitos deletérios do etanol sobre a memória podem envolver a inibição desse receptor. Cronicamente, o etanol é capaz de induzir o aumento na expressão de receptores NMDA como resultado do efeito inibitório do etanol agudo. Acredita-se que esse aumento esteja envolvido com a hiperexcitabilidade durante o período de abstinência (LOVINGER, 2008).

Segundo a natureza de ação do etanol sugere-se que, quando em altas doses, ele atuaria preferencialmente nos receptores $GABA_A$ pós-sinápticos além de inibir os receptores do tipo NMDA, contribuindo para a hiperpolarização da célula. Esse fenômeno é descrito como responsável pelos efeitos depressores (sedativos e disfóricos) do álcool (FADA e ROSSETI, 1998).

No sistema de recompensa, composto pelas vias dopaminérgicas mesolímbica e mesocortical, o etanol em baixas doses atuaria aumentando a liberação de DA no NAc. Esse efeito se deve à ação do etanol sobre os receptores $GABA_A$ presentes nos interneurônios gabaérgicos da AVTM, inibindo-os por hiperpolarização. Esse interneurônios inibidos, permitem a ativação dos neurônios dopaminérgicos, resultando no aumento na liberação de DA no NAc (SPANAGEL E WEISS, 1999). De maneira similar, o etanol também inibe os neurônios do NAc, os quais enviam projeções de feedback negativo sobre os corpos celulares dopaminérgicos presentes na AVTM. O efeito depressor do etanol sobre a inibição dos neurônios dopaminérgicos

também colabora para o aumento dos níveis de DA no NAc (SPANAGEL e WEISS, 1999; SPANAGEL, 2009).

Além das vias descritas acima, outra hipótese levantada é que na presença do etanol, a transmissão glutamatérgica excitatória via NMDA do interneurônio gabaérgico estaria bloqueada, impedindo a sua função e, assim, permitindo a ativação dos neurônios dopaminérgicos, levando à liberação de DA no NAc (FADA e ROSSETI, 1998).

Além da sua ação sobre a via clássica do reforço, tem havido um interesse crescente em desvendar os efeitos diretos do etanol em mecanismos intracelulares – dos quais um dos mais importantes é a via da PKA, a qual é ativada pelo AMPc e portanto é responsável pela fosforilação de fatores de transcrição. Estudos conduzidos em cultura de células mostraram que, agudamente, o etanol é capaz de potencializar a sinalização pela adenosina, nucleosídeo proveniente da metabolização do ATP ou ADP. Essa potencialização se deve à inibição da recaptação de adenosina, via transportador de nucleosídeo sensível ao etanol, levando ao aumento dos níveis extracelulares de adenosina, aumentando a ativação dos receptores A2 (acoplados à proteína Gs). Consequentemente, ocorre o aumento nos níveis de AMPc (MAILLIARD e DIAMOND, 2004), translocação da subunidade catalítica alfa (Cα) da PKA-dependente da ativação de receptores A2A para o núcleo (DOHRMAN et al., 1996), a qual é mantida enquanto o etanol estiver presente. Além disso, dados da literatura têm mostrado a capacidade do etanol de agir em isoformas específicas de AC, como a isoforma AC7 que foi a mais sensível aos efeitos do etanol (NELSON et al., 2003). Dessa forma, o etanol é capaz de modular a sinalização intracelular sobre a via do AMPc-PKA que é uma das vias responsáveis pela ativação do fator de transcrição CREB o qual está envolvido, dentre outras atividades, na plasticidade neuronal em resposta ao uso abusivo de drogas (RON e JURD, 2005). Essa translocação da subunidade catalítica da PKA (Cα) para o núcleo está envolvida com a fosforilação do fator de transcrição CREB, visto que o bloqueio dos receptores de adenosina A2 bloqueia a ação aguda do etanol sobre o aumento nos níveis de AMPc e fosforilação do CREB (CONSTANTINESCU et al., 1999). Além disso, a fosforilação pela PKA e a

ativação do CREB são necessários para a indução da expressão gênica de genes associados ao CRE. Embora no tratamento agudo com etanol, a translocação da subunidade catalítica da PKA (Cα) para o núcleo seja dependente da ativação dos receptores de adenosina A2, no tratamento crônico depende de outros fatores visto que tanto o uso de antagonista de receptor de adenosina A2 como antagonista de PKA, não alterou sua translocação para o núcleo (ASHER, et al., 2002; DOHRMAN et al., 1996). Estudos sobre a ação aguda de etanol mostraram a ativação da expressão gênica de genes associados ao CRE em diversas regiões encefálicas, especificamente aquelas envolvidas no sistema límbico como CPF, área CA1 do hipocampo, NAc, AVTM, entre outras (ASYYED et al., 2006). Quanto aos níveis de pCREB e atividade de ligação do CREB ao DNA, estudos têm verificado que, agudamente, o etanol induziu o aumento nos níveis de pCREB nos cerebelo e no NAc e aumento nos níveis e na ligação desse fator ao DNA no estriado, enquanto que o tratamento crônico foi responsável pela redução tanto nos níveis de fosforilação quanto na ligação de CREB nas mesmas regiões (HOFFMAN e TABAKOFF, 1990; LI et al., 2003; YANG et al., 1998a,b)

1.5 Sensibilização Comportamental e Etanol

A sensibilização comportamental é um modelo de neuroadaptação caracterizado por aumento progressivo dos efeitos estimulantes motores ou de comportamentos estereotipados induzidos pela administração repetida de drogas (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006). Esse fenômeno tem sido descrito para drogas psicoestimulantes como anfetaminas (SEGAL e MANDELL, 1974; SHUSTER et al., 1982), cocaína (SHUSTER et al., 1977), fencanfamina (AIZENSTEIN et al., 1990) e cafeína (MELISKA et al., 1990); e para outras drogas como morfina (BADDIANI; OATES; ROBINSON, 1975), ecstasy (SPANOS e YAMAMOTO, 1989) e nicotina (KITA et al., 1992).

Em 1980, duas pesquisadoras brasileiras caracterizaram, pela primeira vez, a sensibilização locomotora aos efeitos estimulantes induzidos

pelo etanol. Nesse estudo, o etanol, quando administrado repetidamente em doses altas (acima de 3,0 g/kg), induziu tolerância comportamental; entretanto em doses baixas (1,8 – 2,5 g/kg), induziu a sensibilização (MASUR e BOERNGEN, 1980).

As alterações biológicas da sensibilização se correlacionam com um estado motivacional descrito como “desejo”, “compulsão” ou “fissura”, que aumenta progressivamente com o uso contínuo da droga. Acredita-se que a sensibilização comportamental está relacionada principalmente a neuroadaptações caracterizadas pela sensibilização da via dopaminérgica mesolímbica (WISE e BOZARTH, 1987), no qual se observa o aumento na liberação de DA proveniente da AVTM no NAc (ROBINSON e BERRIDGE, 2000; 2008; Di CHIARA e IMPERATO, 1985). A maior disponibilidade de DA na fenda sináptica leva a maior ativação de seus receptores, principalmente do tipo D1, e estes tornam-se hipersensíveis após a sensibilização, provavelmente potencializando o sinal dopaminérgico mesolímbico (WHITE e KALIVAS, 1998). O aumento nos níveis de DA no NAc tem sido associado aos efeitos eufóricos e desinibição induzida pelo etanol, bem como por outras drogas de abuso. Estudos recentes mostraram que a administração de antagonistas D1, mas não antagonistas D2, preveniram a expressão da sensibilização comportamental ao etanol, sugerindo que as neuroadaptações envolvidas com a sensibilização comportamental dependem preferencialmente das ações dopaminérgicas nos receptores D1 (CAMARINI et al., 2010).

Existe uma grande variedade de estímulos motivacionais que aumentam a liberação de DA no NAc, como a ação de drogas de abuso (nicotina, álcool, cocaína, anfetamina, opióides, *cannabis*), recompensas frente a estímulos “naturais” (sexo, alimento, entre outros), situações e estímulos associados à recompensa (jogar vídeo-game) e estímulos aversivos e estressores. Além disso, a apresentação a estímulos novos, estímulos ambientais ou eventualidades, em combinação com drogas de abuso, são particularmente motivantes (BADIANI; OATES; ROBINSON, 2000). Dessa forma, a estimulação farmacológica do sistema dopaminérgico mediado por

drogas de abuso parece mimetizar e/ou agir sinergicamente com a motivação natural codificada pelo ambiente novo.

Uma teoria que tem vinculado a sensibilização como mecanismo neural que permeia a dependência a drogas de abuso é a teoria da "Saliência ao Incentivo" proposta por Robinson e Berridge (1993, 2000, 2001, 2003, 2008. Esse conceito postula que dentre as alterações nos processos psicológicos associados à dependência e induzidas por drogas de abuso, o mais importante é a sensibilização ou hipersensibilidade aos efeitos motivacionais e aos estímulos associados às drogas. A "Sensibilização ao Incentivo" faria com que os processos de atenção fossem associados à motivação e a estímulos associados à droga ("querer"). Quando combinado à falta de controle executivo sobre o comportamento, a Sensibilização do Incentivo pode culminar em sintomas associados à dependência. Dentro desse fundamento, é proposto que a administração repetida de drogas de abuso é capaz de induzir a chamada "saliência do incentivo" no qual ocorre a hipersensibilidade aos efeitos motivacionais induzidos pela droga. Dessa forma, o indivíduo sensibilizado apresenta maior motivação para o consumo com a transferência do estado de "gostar" para o "querer", ou seja, os efeitos induzidos pela droga se tornam cada vez mais atrativos. A sensibilização também estaria associada aos episódios de recaída, uma vez que os circuitos neuronais responsáveis pela transição do "gostar" para o "querer" a droga se mantém sensibilizado por meses até anos, podendo ser disparados por pistas ambientais associadas ao consumo da droga, levando a um incentivo motivacional para a busca da mesma.

Em seres humanos esse estado pode ser evidenciado através do comportamento de fissura (desejo) pela droga e em modelo murino através do aumento da atividade locomotora. Além disso, a indução da atividade locomotora por drogas de abuso em modelos animais tem sido correlacionada com a euforia induzida por drogas em seres humanos (PHILLIPS et al., 1996).

O que é crítico para a teoria da sensibilização do incentivo não é a sensibilização locomotora ou psicomotora, mas a sensibilização do incentivo. A ativação locomotora é vista como uma evidência da participação do

sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (WISE e BOZARTH 1987). A sensibilização motora pode ser frequentemente vista como uma evidência, embora indireta, da hipersensibilidade do circuito motivacional, ou seja, é a hipersensibilidade do circuito motivacional, e não do circuito da locomoção, que contribui de forma relevante para o "querer" a droga. Portanto, a atividade locomotora, utilizada como parâmetro comportamental no presente estudo, é uma avaliação indireta do fenômeno principal (ROBINSON e BERRIDGE, 2003).

Experimentos prévios de nosso grupo, que utilizaram a sensibilização comportamental como modelo de neuroadaptação, mostraram que animais adolescentes não exibiram sensibilização da atividade locomotora após tratamento repetido com etanol, quando comparados aos animais adultos da mesma espécie (FARIA et al., 2008). Neste estudo, os animais receberam o etanol pareado ao aparato de observação, ou seja, ao ser injetado com a droga, o animal era imediatamente exposto ao campo aberto. Este procedimento facilita a associação dos efeitos da droga com as pistas ambientais. Dessa forma, foi concluído que os adolescentes, ao contrário dos adultos, não apresentavam sensibilização condicionada.

1.6 Substratos neuroanatômicos da dependência na adolescência

As drogas de abuso produzem seus efeitos reforçadores por meio da ação sobre o sistema límbico, o qual é importante para o comportamento motivado, integração e regulação das emoções. A compreensão da anatomia e da função do sistema motivacional cerebral pode prover informação importante sobre a relação entre impulsividade, risco quanto ao uso de substâncias e a adolescência.

A motivação é uma atividade cerebral que tem como objetivo integrar informações sobre as mudanças de estado internas do organismo (fome, desejo sexual ou dor) e informações sobre as condições ambientais (recursos, oportunidades reprodutivas, a presença de perigo), resultando em um comportamento que seja vantajoso para o indivíduo, maximizando sua

sobrevivência (BECHARA, 2001; CREWS e BOETTIGER, 2009). Estudos em animais e humanos sugerem a existência de uma circuitaria motivacional primária envolvendo o CPF e NAc, os quais têm acesso direto e influenciam estruturas motoras (KALIVAS; CHURCHILL; ROMANIDES, 1999). Esse sistema é sustentado por um sistema motivacional secundário que provê muitas modalidades de informação sensorial por meio de projeções axonais à circuitaria motivacional primária (JENTSCH; ROTH; TAYLOR, 2000) (*Figura 1)*.

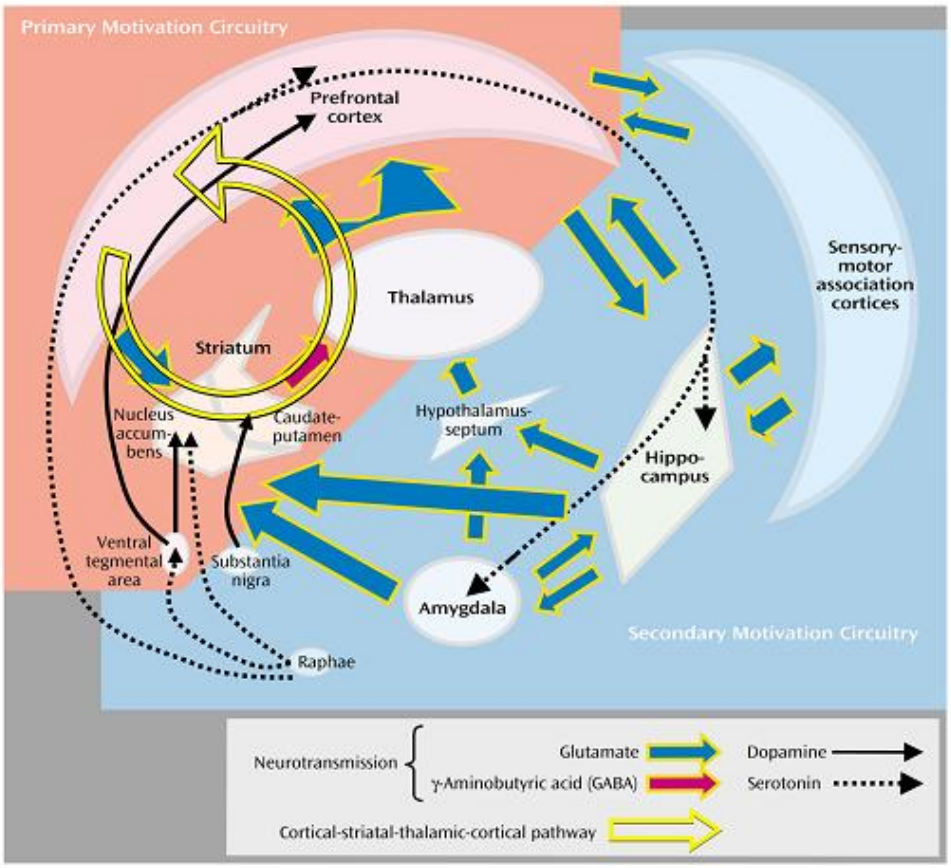


Figura 1. Principal circuitaria motivacional encefálica envolvida com a impulsividade, tomada de decisão e dependência. Circuito motivacional primário responsável pelos eventos de tomada de decisão e seleção de impulsos motivacionais para ações comportamentais. Esses eventos são determinados pela integração dos sistemas cortical-estriatal-talâmico-cortical (setas amarelas vazias) que podem igualmente promover ou inibir comportamentos motivados. Circuitaria motivacional secundária provê informações afetivas, associadas à memória, sensoriais e hormonais/homeostasia, gerando e influenciando o destino da motivação do circuito motivacional primário.
Fonte: retirado de Chambers, Taylor e Potenza (2003).

O circuito límbico em roedores é composto por amígdala, hipocampo e CPFm os quais enviam projeções excitatórias glutamatérgicas ao NAc, que por sua vez, envia projeções inibitórias GABAérgicas para a AVTM/substância negra e para o pálido ventral. Tanto o pálido dorsal como a AVTM enviam projeções inibitórias gabaérgicas para a região do tálamo medial dorsal e este por sua vez envia projeções excitatórias glutamatérgicas para o CPFm fechando o circuito límbico (PIERCE e KUMARESAN, 2006). Os neurônios dopaminérgicos na AVTM inervam NAc, amígdala, HPC, CPFm e pálido ventral; e dessa forma, mudanças nessa via dopaminérgica têm papel importante na modulação da informação através do sistema límbico.

Evidências têm mostrado que essa circuitaria que codifica comportamentos motivados está sob ação de eventos neurobiológicos que selecionam e priorizam determinados tipos de comportamento motivado a serem executados. Nesse contexto, substratos neurais têm sido associados à promoção ou inibição de estados motivacionais de forma a selecionar ações que sejam positivas para o indivíduo. Dentro desse contexto, distúrbios na capacidade de filtrar quais comportamentos motivados serão executados, incluindo impulsividade e ação de drogas de abuso, podem refletir a baixa capacidade de coordenação ou funcionamento anormal de sistemas neurais de indução ou inibição neural integrados à circuitaria motivacional primária (CREWS e BOETTIGER, 2009).

Quanto aos substratos associados à promoção da motivação, temos a liberação de DA no estriado como principal evento neuromodulatório implicado na tradução da motivação em ação. A liberação de DA no NAc e no estriado dorsal (caudado putamen) é promovida por sinais excitatórios provindos do córtex e demais áreas, estimulando neurônios dopaminérgicos da AVTM e substância negra, respectivamente (STRAFELLA et al., 2001). Entretanto, cada uma dessas áreas está associada a tipos distintos de processamento: a presença de DA no estriado dorsal está associada originalmente com a iniciação e condução de atividades motoras e comportamentos habituais, enquanto que a presença de DA no NAc está associada com estímulos motivacionais, recompensa subjetiva, cognição e aprendizado de novos comportamentos (MASTERMAN e CUMMINGS, 1997).

Alguns trabalhos indicam que a liberação de DA no NAc altera o padrão de disparos de grupos neuronais e influencia sua resposta frente aos estímulos provenientes das aferências glutamatérgicas do córtex, amígdala e hipocampo (FINCH, 1997) (*Figura 2*).

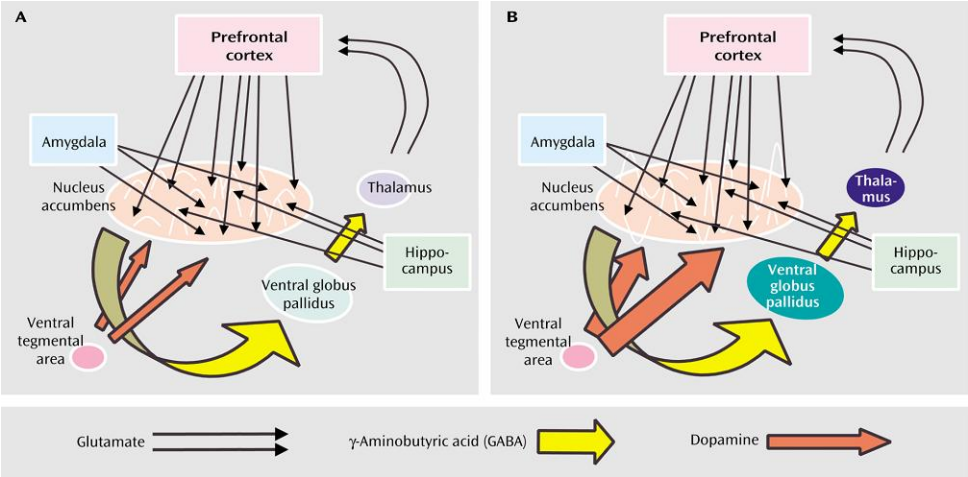


Figura 2. Circuito Cortical-Estriatal-Talâmico-Cortical dentro do Circuito Motivacional Primário. Aferências glutamatérgicas provindas do Córtex pré-frontal (CPF), Amígdala e Hipocampo em direção ao Núcleo Accumbens (NAc). Padrões de disparo transmitidas ao globo pálido por meio de aferências gabaérgicas, e deste para o tálamo que por sua vez influencia os centros corticais motores (A). A ação de drogas de abuso e ambientes novos acentua a liberação de dopamina (DA) no NAc (setas vermelhas), transformando motivação em ação. Como resultado, os padrões de disparo de grupos de neurônios do NAc se modificam de forma a aumentar disparos que codificam para comportamentos de tomada de atitude/ação. Esses eventos podem também facilitar mecanismos de plasticidade neuronal entre os neurônios do NAc e suas aferências, determinando repertórios futuros de representações motivacionais e/ou limiar de comportamentos estimulados (B).
Fonte: retirado de Chambers, Taylor e Potenza (2003).

Esse fato sugere que a informação sobre memória contextual, afetiva e sensorial, levando a geração de esforços motivados, é disparada pela liberação de DA no estriado, de modo que os centros motores subseqüentes possam receber e agir frente a informações motivacionais específicas (FINCH, 1997). Essa hipótese é corroborada pelo fato de que estudos mostraram que lesões no CPF, amígdala ou hipocampo alteraram comportamentos estimulados por estimulação farmacológica de liberação de DA no NAc (BURNS; ROBBINS; EVERITT, 1993).

Em relação aos substratos neurais associados à inibição da motivação, tem-se o sistema serotoninérgico e os componentes do CPF. Estudos têm mostrado que tanto a redução de 5-HT como danos ao CPF têm sido associados ao aumento da impulsividade (TAYLOR e JENTSCH, 2001; DAMASIO et al., 1994) . Além disso, prejuízos no CPF têm sido associados ao alto risco de desenvolvimento de desordens associadas ao uso de drogas de abuso, tanto em humanos (DELMONICO; HANLEY-PETERSON; ENGLANDER, 1998) quanto em animais (WEISSENBORN; ROBBINS; EVERITT, 1997).

Um mecanismo de ação sugerido para a disfunção no CPF, produzindo impulsividade e aumento do risco de dependência, incide sobre as projeções glutamatérgicas excitatórias provenientes dessa região em direção ao NAc e AVTM, alterando a liberação de DA, disparo neuronal e processos neuroplásticos no NAc. Sendo assim, acredita-se que o CPF está envolvido com a representação, execução e inibição da motivação por influenciar os padrões de disparo de grupos de neurônios do NAc (CHAMBERS; TAYLOR; POTENZA, 2003).

Outra função da DA, concomitantemente com o a ação das aferências glutamatérgicas e atividade dos interneurônios gabaérgicos do NAc, é associar o aprendizado relacionado à recompensa. Nesse contexto, o comportamento futuro é modelado de acordo com experiências passadas associadas à recompensa, ou seja, mudanças neuroplásticas nos neurônios do NAc. A estimulação repetida por uma determinada droga promove a liberação contínua de DA no NAc induzindo mudanças na expressão de proteínas associadas a sinalização intracelular, expressão gênica e arquitetura celular (NESTLER; BARROT; SELF, 2001). A transmissão dopaminérgica no NAc e em regiões do CPF que se projetam para NAc tem sido implicada em mecanismos de aprendizagem e plasticidade, incluindo mudanças na LTP e na morfologia dendrítica. Esses processos parecem mediar a sensibilização, por meio da qual o esforço motivado associado com a recompensa se torna aumentado à medida que o contexto da recompensa é repetidamente experimentado. A sensibilização, como um aumento da motivação associada à uma recompensa específica, induz a aquisição de um

comportamento específico que se torna cada vez mais intenso (ROBINSON e BERRIDGE, 1993).

Estudos neuroanatômicos em roedores, caracterizaram o CPFm como subdividido em quatro regiões, sendo as duas mais dorsais - AGm e AC - associadas ao comportamento motor, enquanto as duas regiões mais ventrais - PrL e IL - estão associadas principalmente, com processos emocionais e cognitivos (HOOVER e VERTES, 2007). Cada uma dessas sub-regiões recebe aferências específicas, resultando nas diferenças funcionais desempenhadas por cada uma delas, mas também recebe projeções comuns às demais. Entre as áreas que enviam projeções para todas as quatro sub-regiões discutidas acima estão regiões adjacentes ao CPFm, córtex insular, claustrum, região CA1 do hipocampo/subiculum, núcleo basal da amígdala , tálamo medial, AVTM, núcleo dorsal da rafe e locus ceruleus. O PrL e IL apresentam redução importante na quantidade de aferências corticais e talâmicas, sendo as mais proeminentes vindas do córtex límbico. O PrL recebe muitas aferências da região CA1/subiculum do hipocampo. O córtex insular, por sua vez, se comunica com o PrL através do envio de aferências da sua região mais rostral, enquanto sua região mais dorsal se conecta principalmente ao IL (ALLEN et al., 1991; GABBOTT et al., 2003).

Tanto o CPF quanto as demais regiões do sistema límbico passam por profunda reorganização durante a adolescência. O CPF, associado principalmente ao julgamento, tomada de decisões e controle das respostas emocionais, tem seu volume absoluto significativamente reduzido ao longo da adolescência. Essa redução se deve principalmente à perda de aferências excitatórias glutamatérgicas, ainda que ocorra, paralelamente, um aumento de aferências dopaminérgicas e serotoninérgicas para essa região (SPEAR, 2000; CREWS e HODGE, 2007).

Baseado em estudo de imagem em adolescentes, bem como estudos em roedores, Casey et al. (2008) propuseram um modelo de maturação do encéfalo nessa fase do desenvolvimento (*Figura 3*). Esse modelo neurobiológico propõe que as regiões límbicas amadurecem mais cedo do que o CPF, ou seja, a capacidade de controle dos impulsos e da tomada de decisão de desenvolve mais tardiamente.

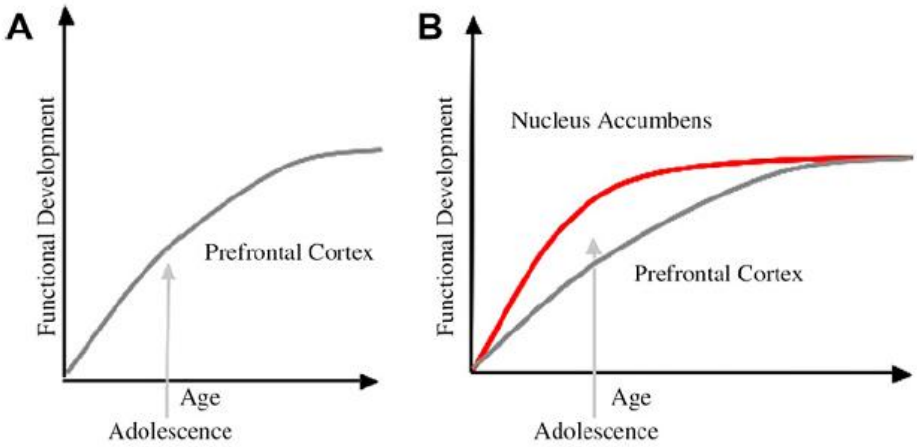


Figura 3. Modelo tradicional de discussão sobre o comportamento adolescente como conseqüência do retardo no desenvolvimento do Córtex pré-frontal (CPF); B. Modelo que leva em consideração o desenvolvimento do CPF mais tardiamente do que as regiões límbicas (por exemplo, o Núcleo Accumbens (NAc)) resultando no comportamento de risco.
Fonte: retirado de Casey et al. (2008).

No hipocampo, tanto as sinapses excitatórias quanto as arborizações dendríticas são remodeladas durante a adolescência. Embora boa parte do remodelamento seja glutamatérgico, os receptores dopaminérgicos apresentam pico de expressão no início da adolescência seguido de redução significativa até a fase adulta. Em adolescentes, o hipocampo é especialmente sensível aos efeitos do etanol. As evidências mostram que ratos adolescentes são mais suscetíveis aos efeitos do álcool sobre o prejuízo na formação da memória do que os adultos (WHITE e SWARTZWELDER, 2004).

Em estudos de neuroimagem, adolescentes e jovens adultos que iniciaram precocemente o consumo de álcool apresentaram considerável perda do volume hipocampal quando comparado aos indivíduos sem a desordem e considerados controle. Uma das hipóteses para esse fato baseia-se na ação do álcool sobre os receptores NMDA e nas funções neurotróficas associadas a esses receptores, levando assim à interrupção do desenvolvimento do hipocampo em adolescentes. Essas alterações durante a adolescência podem sugerir a suscetibilidade do hipocampo aos efeitos adversos induzidos pelo álcool. Além disso, adolescentes com desordem

alcoólica como resultado da ingestão precoce de álcool, apresentaram comorbidade ao uso compulsivo de *cannabis* (DE BELLIS et al., 2000).

Em modelo animal foi demonstrado que repetidas intoxicações agudas com etanol em animais adolescentes levou a prejuízos na neurogênese hipocampal bem como morte celular, o que pode contribuir para a perda do volume hipocampal (MORRIS et al., 2010). Adolescentes com transtornos de uso de álcool tendem a passar por repetidas intoxicações agudas e, devido à maturação do hipocampo continuar durante a adolescência até o início da vida adulta, o consumo precoce de álcool pode alterar alguns aspectos do desenvolvimento hipocampal (DE BELLIS et al., 2000).

Portanto, o remodelamento das regiões encefálicas associadas à motivação e impulsividades durante a fase da adolescência representa um período crítico, visto que o álcool e demais drogas de abuso podem afetar esses sistemas, podendo alterar a sensibilidade a essas drogas durante essa fase bem como influenciar potencialmente a propensão ao seu uso.

1.7 Papel de fatores de transcrição da família do CREB na dependência ao etanol

O CREB, assim como o CREM e o ATF-1, pertencem à superfamília do CREB. Esses fatores de transcrição são constituídos por um domínio central conhecido como KID e que contém o sítio de fosforilação pela PKA e ligação à CBP. O domínio KID é flanqueado por domínios ricos em glutamina designados como Q1 e Q2, que permitem a associação com componentes da maquinaria transcricional. E por fim, um domínio básico de ziper de leucina conhecido como bZIP, localizado na porção C-terminal, responsável pela dimerização com outros membros da família e ligação ao CRE que constitui a região promotora dos genes regulados pelos membros da família. Em geral, as proteínas da família dos bZIP formam dímeros no DNA. Devido ao fato de haver grande semelhança entre os membros da família CREB, especialmente dentro do domínio bZIP, uma vez fosforilados no resíduo de Ser 133, esses fatores podem formar homo- ou heterodímeros, podendo então se ligar,

através da sua porção C-terminal, ao sítio promotor dos genes alvos, o CRE, o qual é composto pela sequência palindrômica (5' TGACGTCA 3') (MAYR e MONTMINY, 2001).

Muitos moduladores apresentam uma sequencia palindrômica perfeita ou aproximada uma vez que vários fatores de transcrição ligam-se no DNA como dímeros, onde provavelmente cada membro é responsável por reconhecer metade do sítio de ligação. Esse complexo, que também necessita da participação da proteína CBP, é então capaz de regular a transcrição gênica de fatores associados à produção de neurotransmissores, neurotrofinas, neuropeptídeos, receptores e fatores de transcrição (MAYR e MONTMINY, 2001). Os demais domínios que compõem os membros da família CREB são responsáveis por facilitar a ligação com os co-ativadores e os demais componentes da maquinaria transcricional.

Existem diferentes isoformas dos fatores CREB e CREM geradas por splicing alternativo, e dependendo do tipo celular, podem-se encontrar diferentes composições de complexos (dímeros) bem como prevalência de uma determinada forma (LONZE e GINTY, 2002) (*Figura 4*).

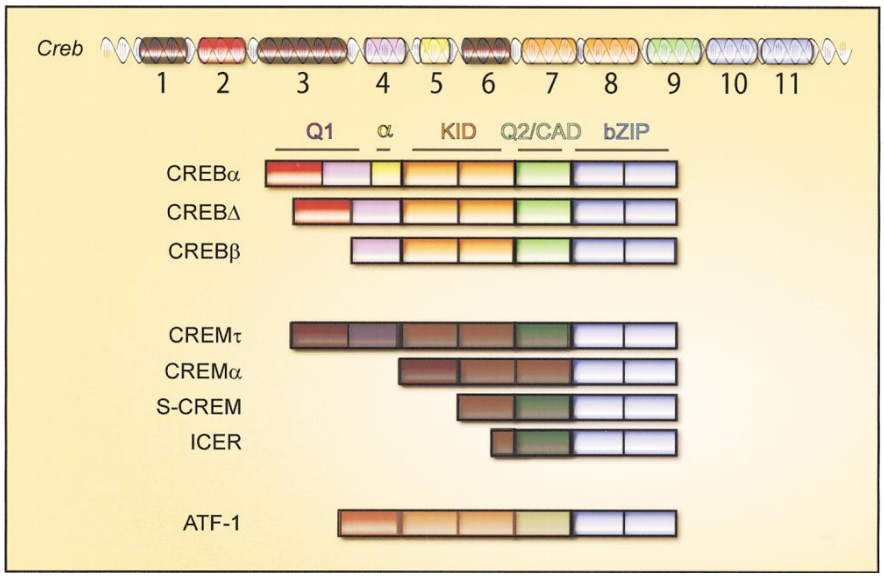


Figura 4. Organização do gene e estrutura dos domínios dos fatores de transcrição da família do CREB. Domínio bZIP: local de dimerização e ligação ao DNA; Domínio KID e α: localização do resíduo Ser 133 e de local de ligação da proteína CBP; Domínios Q1 e Q2/CAD: local de ligação com a maquinaria transcricional.
Fonte: retirado de Lonze e Ginty (2002).

O gene do CREM pode codificar tanto formas ativadoras quanto repressoras da transcrição: ambas possuem os domínios de ligação ao CRE, porém as primeiras podem conter os domínios de ativação, enquanto as últimas, não. Isso se deve ao fato do gene para o CREM possuir duas regiões promotoras conhecidas como P1 e P2 (*Figura 5*). Portanto, o nível de transcrição direcionado ao CRE após ativação pelo AMPc irá variar de acordo com o balanço entre as formas ativadoras e repressoras da transcrição (LATCHMAN, 2004).

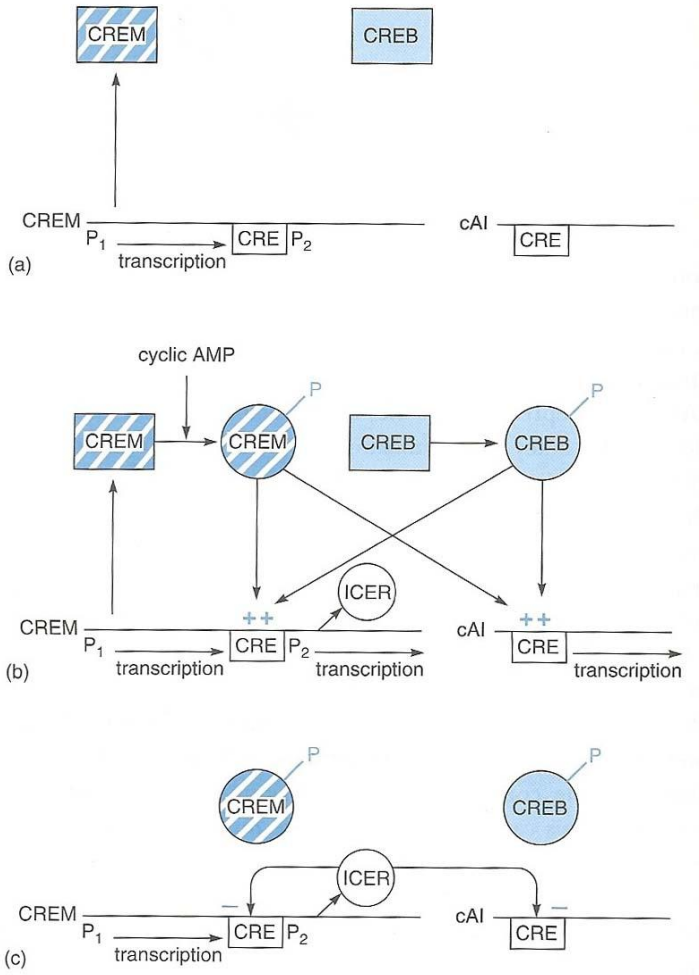


Figura 5. Relação entre os fatores de transcrição CREB e CREM na vigência de um estímulo. a) transcrição do gene CREM a partir do promotor P1 na ausência do AMPc; b) ativação dos fatores CREM e CREB após tratamento com AMPc e posterior ativação dos genes cAI e da região promotora P2 do gene CREM e da produção do ICER; c) repressão da transcrição induzida por CREM e CREB após ligação dos ICERs ao sítio CRE dos genes CREM e cAI. CREB (proteína de ligação em resposta ao AMPc); CREM (modulador do elemento de resposta ao AMPc); cAI (genes induzidos pelo AMPc); ICER (repressores precoces induzidos pelo AMPc).
Fonte: retirado de Latchman (2004).

A transcrição pelo promotor P1, que não é estimulada pelo AMPc, pode ser gerar diferentes isoformas do CREM por splicing alternativo. Na vigência do estímulo pelo AMPc, os fatores CREB e CREM podem ser ativados por fosforilação e, portanto, promover a transcrição de genes que contêm o sítio CRE nas suas regiões promotoras, incluindo sua própria expressão bem como a de pequenas proteínas chamadas ICERs. As proteínas ICREs contêm um dos domínios de ligação ao DNA e um sítio de fosforilação, porém não apresentam o domínio de ativação. Dessa forma, essas proteínas possuem a capacidade de se ligar ao sítio CRE, reprimindo a ativação transcricional pelas formas ativadoras de CREM e pelo CREB, limitando a sinalização mediada pelo AMPc (LATCHMAN, 2004).

O fator de transcrição CREB é alvo de distintas vias de sinalização (MATTHEWS et al., 1994; IMPEY et al., 1998). Atualmente, sabe-se que além da PKA, tanto a CaMKIV quanto outras quinases ativadas por fatores de crescimento – via Ras/ERK e PI3K/Akt - são capazes de fosforilar o CREB nesse mesmo sítio (Ser133) de forma a regular a transcrição gênica (SHAYWITZ e GREENBERG, 1999; MAYR e MONTMINY, 2001; NESTLER, 2004; RON e JURD, 2005). Alguns trabalhos mostram diferenças quanto à sinalização direcionada ao CREB, sendo a via ERK descrita como responsável pela fase tardia da fosforilação do CREB estimulada pela despolarização, enquanto que a fase inicial seria regulada pela cascata CaMK (WU et al., 2001; IMPEY e GOODMAN, 2001). Por sua vez, a fosforilação no sítio Ser 142 do CREB pela CaMKII, promove a dissociação do dímero de CREB, reduzindo assim a transcrição mediada por esse fator (WU e MCMURRAY, 2001).

Todavia, algumas dúvidas persistem: como um fator de transcrição altamente expresso e modulador de distintas vias de sinalização como é o CREB, pode ao mesmo tempo ser tão específico? Dados da literatura têm levantado a questão se a interação do dímero de CREB ao sítio CRE dos genes seria constitutiva ou se a prévia fosforilação do dímero resultaria nessa interação com o sítio (CARLEZON et al., 2005). A indução de mutações genéticas nos sítios de fosforilação ou no sítio de ligação do CREB ao DNA, bem como deleções no gene de CREB, tem permitido elucidar os mecanismos

de transcrição gênica. Um exemplo desse tipo de alteração foi demonstrado através do estudo da geração de uma forma dominante negativa da proteína que contém uma mutação na serina 133 (substituição da serina por alanina), agindo assim como um antagonista de CREB (conhecida como mCREB). Esse fator mutante, quando presente, foi capaz de formar tanto homodímeros (mCREB-mCREB) como heterodímeros (mCREB-CREB) e de se ligar a sítios CRE disponíveis; porém o recrutamento da proteína acessória CBP/p300, necessária para a transcrição mediada por CREB, foi prejudicado, pois somente a subunidade não mutante pôde ser fosforilada (GONZALES e MONTMINY, 1989; CHRIVIA et al., 1993; KWOK et al., 1994).

Estudos têm mostrado que o CREB é responsável pela modulação de funções como desenvolvimento do SNC, memória, aprendizado, plasticidade neuronal e dependência (LONZE e GINTY, 2002). O aumento na ativação da via AMPc-PKA que ocorre em resposta à administração de drogas de abuso bem como a resultante ativação do CREB parecem mediar vários aspectos da dependência (NESTLER, 2001).

Em relação à dependência ao etanol, estudos em modelo animal têm mostrado a correlação entre os déficits na função do CREB observados na região da amígdala com a preferência e dependência pelo etanol. De maneira geral, esses estudos mostraram que ratos que têm preferência pelo consumo de etanol apresentaram redução nos níveis de CREB, pCREB e ligação CREB/DNA (PANDEY et al., 1999), e que níveis reduzidos de CREB e pCREB na amígdala de ratos estariam associados a comportamento do tipo ansioso (PANDEY et al., 2005). A correlação entre aumento do comportamento ansioso e aumento do consumo de etanol também foi observada em camundongos haplodeficientes para CREB, comparados aos animais selvagens, sugerindo o importante papel deste fator nos comportamentos ansiosos e de consumo de álcool (PANDEY et al., 2005).

Sendo o CREB um fator crucial para o crescimento neuronal, sua expressão e ativação têm papel crítico na remodelação neuroquímica pós-nascimento. Os níveis de pCREB, a forma transcricionalmente ativa do CREB, se mostraram altos no início do desenvolvimento pós-natal, com

declínio durante a transição da adolescência para a fase adulta, tanto no córtex quanto no hipocampo de roedores (TOSCANO et al., 2003).

1.8 Papel do BDNF na dependência ao etanol

O BDNF é uma neurotrofina amplamente distribuída no encéfalo importante no crescimento, sobrevivência e diferenciação neuronal. Esse peptídeo também exerce papel importante na sobrevivência e função de neurônios adultos, aprendizado e memória e plasticidade sináptica (CHAO, 2003; GHITZA et al., 2009). Estudos têm evidenciado seu papel na modulação do sistema dopaminérgico (BOSSE e MATHEWS, 2010), tratamento de doenças neurodegenerativas (DAVIS, 2008), depressão (EISCH et al., 2003), além de ter uma participação importante na regulação de comportamentos associados à dependência (HORGER et al., 1999; HALL et al., 2003; BOLANOS e NESTLER, 2004; MCGOUGH et al., 2004; LOGRIP et al., 2009).

A sinalização mediada pelo BDNF ocorre por meio da sua ligação a receptores TrkB, formando o complexo BDNF-TrkB. Após a ligação ao receptor, ocorre a dimerização dos complexos, levando a auto-fosforilação e recrutamento de proteínas de ancoragem intracelulares. Esse processo pode desencadear a ativação de distintas vias de sinalização como a via da MAPK, a via PLC e a via PI3K (REICHARDT, 2006). A sinalização pela MAPK, pode resultar na ativação de CREB, que por sua vez é capaz de regular BDNF e TrkB (FINKBEINER et al., 1997; MOONAT et al., 2010). Além disso, o BDNF pode exercer sua função por meio da ligação aos receptores p75 modulando processos associados à morte celular e apoptose (CHAO, 2003).

Uma recente revisão abordou a relação entre BDNF e respostas comportamentais, neuroquímicas e neuroadaptativas a drogas de abuso, bem como a relação com o sistema dopaminérgico mesolímbico. Estudos comportamentais envolvendo cocaína mostraram que animais heterozigotos para BDNF apresentaram redução na preferência condicionada de lugar

(HALL et al., 2003), bem como redução na sensibilização locomotora (HORGER et al., 1999).

Muitas evidências indicam a participação do BDNF na regulação de comportamentos associados ao etanol. Estudos com camundongos heterozigotos para BDNF mostraram que esses animais apresentam aumento no consumo, na sensibilização comportamental e na preferência condicionada de lugar ao etanol, quando comparados aos animais selvagens (MCGOUGH et al., 2004), bem como o aumento na expressão de BDNF reduziu o consumo de etanol (JEANBLANC et al., 2006). Esses efeitos devem-se à ação de BDNF sobre os receptores dopaminérgicos e à modulação da plasticidade de neurônios dopaminérgicos presentes na via mesolímbica do sistema de recompensa (JEANBLANC et al., 2006; ANDRESSOO e SAARMA, 2008). Os resultados sugerem que a perda da homeostase do BDNF possa contribuir para o aumento do consumo de etanol. Níveis baixos de BDNF têm sido associados com maior ingestão de etanol (MCGOUGH et al., 2004; PANDEY et al., 2004a; YAN et al., 2005; PRAKASH et al., 2008), enquanto níveis altos deste fator são observados em animais que apresentaram baixa ingestão (MCGOUGH et al., 2004), sugerindo participação dessa neurotrofina no controle do consumo de etanol.

Logrip et al. (2009) mostraram que a exposição aguda ao etanol foi capaz de aumentar a expressão de BDNF no estriado dorsal de camundongos. Entretanto, após 6 semanas de consumo diário, ocorreu perda da capacidade do etanol em induzir a expressão do BDNF no córtex, que é a principal fonte de BDNF para o estriado, sugerindo que esta via protetora tornou-se não responsiva. A partir dessas observações iniciais, acredita-se que o consumo crônico de etanol é capaz de desregular a homeostase do BDNF, resultando na perda do efeito protetor vinculado a essa neurotrofina.

A administração de etanol aumenta a expressão de BDNF via RACK1, uma proteína de ancoragem, que ao ser translocada para o núcleo, promove a expressão de diversos genes, incluindo o BDNF (YAKA et al., 2003). Em estudo conduzido por McGough, et al. (2004), foi demonstrada a participação

de RACK1 no aumento da expressão de BDNF, por meio da injeção dessa proteína no estriado de camundongos, resultando na redução do consumo e da sensibilização comportamental ao etanol. Dessa forma, sugere-se a participação da via RACK1-BDNF regulando negativamente os efeitos induzidos pelo etanol.

A redução nos níveis plasmáticos de BDNF foi verificada em indivíduos dependentes de álcool, bem como nos indivíduos com histórico de alcoolismo familiar, sugerindo novamente que essa neurotrofina possa ter papel no desenvolvimento da dependência ao etanol (JOE et al., 2007).

1.9 Justificativa

As questões abordadas anteriormente mostram como neuroadaptações decorrentes da exposição repetida a drogas de abuso podem explicar a longevidade das alterações comportamentais associadas à dependência. Essa questão aborda a relevância do estudo de fatores de transcrição envolvidos na plasticidade neuronal em resposta a drogas de abuso, o que poderia auxiliar na compreensão das neuroadaptações que permeiam a dependência (NESTLER, 2001; HERDEGEN e LEAH, 1998). Além disso, sendo as estruturas do sistema límbico alvo da sensibilização comportamental e também da modulação durante o período do desenvolvimento da adolescência, o modelo de sensibilização seria uma ferramenta útil para se determinar se a vulnerabilidade à dependência apresentada pelos adolescentes envolveria sensibilidade diferencial ao fator de transcrição CREB, o qual está envolvido na neuroplasticidade neuronal correlacionado à dependência ao álcool.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Usando a sensibilização comportamental como modelo de neuroadaptação, a proposta deste trabalho foi estudar possíveis alterações na ativação do CREB, assim como nos níveis de BDNF no CPF e HPC de camundongos tratados com etanol durante a adolescência e vida adulta.

2.2 Objetivos específicos

- Determinação do efeito da administração aguda de etanol sobre:

    - Atividade locomotora

    - Alcoolemia

    - Ativação temporal do CREB no CPF e no HPC de camundongos Swiss machos adultos

    - Caracterização dos dímeros de CREB

- Determinação dos efeitos da administração aguda e repetida de etanol em camundongos Swiss machos adolescentes e adultos sobre:

    - Atividade locomotora

    - Alcoolemia

    - Ativação de CREB no CPF e HPC

    - Razão entre os níveis proteicos de pCREB/CREB no CPF e HPC

    - Imunorreatividade de pCREB no CPFm

    - Níveis de BDNF no CPF e HPC

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos Swiss Webster machos na fase adolescente [Data pós-nascimento (DPN)=26-28 dias] e início da fase adulta (DPN=56-58 dias) do desenvolvimento foram obtidos do Biotério de Camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério de Farmacologia Comportamental do ICB-USP. Os animais foram alojados num total de 5 animais por gaiola, sob temperatura controlada (22 ± 1 °C), ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acesas às 6 h) e água e comida *ad libitum.*

O protocolo delineado abaixo está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA).

3.2 Drogas/Tratamento

Os animais receberam injeções intraperitoniais (i.p.) de solução de cloreto de sódio a 0,9% - solução salina ou de solução de etanol (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 20% (v/v) diluída em solução salina, na dose de 2,0 g/kg. A dose escolhida foi baseada em trabalhos prévios que mostram que esta é uma dose estimulante locomotora (MASUR e BOERNGEN, 1980; CAMARINI et al., 1995; 2000a,b; FARIA et al., 2008). As injeções foram efetuadas no período da manhã e para evitar efeitos circadianos no comportamento dos camundongos, as observações de todos os animais foram realizadas sempre no período entre 8 h e 12 h, com os grupos sendo tratados de forma alternada, ou seja, a cada rodada de campo aberto (n=4 animais/rodada) procuramos colocar 2 animais de cada tratamento, evitando que um grupo inteiro fosse exposto ao campo aberto no final do período de observação.

3.3 Registro da atividade geral de camundongos em campo aberto

O campo aberto consiste em uma arena com parede de polipropileno de formato cilíndrico, com 50 cm de altura, e uma base circular de madeira, com 40 cm de diâmetro e 2 cm de altura, que se encaixa de forma justa, podendo corpo e base serem separados para limpeza. O aparato descrito acima foi construído baseado no modelo sugerido por Broadhurst (1960).

A atividade geral dos animais foi avaliada por meio do sistema de captação de imagens EthoVision (Noldus Information Technology) no qual é retirada uma foto do campo aberto a partir da qual é delineada uma arena virtual subdividida em duas regiões: uma central e uma periférica. Após o delineamento da arena, foi realizada a calibração da mesma para 40 cm de diâmetro. O tipo de captação utilizada foi baseado no sistema de subtração, que consiste na geração de contraste entre a cor branca da pelagem do animal e o interior do campo aberto de cor azul. Esse contraste permite distinguir o animal do aparato e, portanto, visualizá-lo como um objeto em movimento. Após o delineamento do campo aberto, o processo de filmagem pode ser realizado.

Os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p) de salina ou etanol (2,0 g/kg), e após 5 min foram colocados individualmente no centro da arena e observados durante o período de 10 min. Foi registrada a distância total percorrida. Após a captura da imagem, o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool 5%, antes do próximo animal a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo animal anterior.

3.4 Alcoolemia

Imediatamente após os testes comportamentais, os animais (*n=5-6* animais por grupo) foram decapitados para a coleta de sangue, aproximadamente 0,5 ml, o qual foi armazenado na presença de solução de heparina 1%, para posterior determinação da concentração de etanol no sangue. Em um frasco de vidro de 10 ml, uma alíquota de 0,5 ml de sangue

foi adicionada a 1 ml de uma solução de 0,6 g/L de n-butanol (padrão interno). O frasco foi selado e incubado por 30 min a 70 °C. Em seguida uma alíquota de 0,25 ml do vapor foi retirada ("headspace procedure") e analisada por cromatografia gasosa (Agilent, Palo Alto, CA, EUA) com um detector de ionização de chama. Essa análise foi realizada no Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo Dr. Mauricio Yonamine.

3.5 Extração e determinação da concentração de proteínas nucleares

O método utilizado foi descrito por Rong e Baudry (1996) e adaptado para obtenção de proteínas nucleares de tecido nervoso de camundongo. As estruturas encefálicas como CPF e HPC foram descongeladas e homogeneizadas (aproximadamente 100 mg de tecido/mL) em homogeneizadores de vidro contendo 300 µL de tampão de lise *(HEPES pH 7,9 10 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL, beta-gliceraldeído 10 mM e NaF 50 mM)* e incubadas em gelo durante 10 min. Posteriormente, foi feita a adição de 7,5 µL de NP-40 10% em cada tubo, seguido de agitação vigorosa por 30 s em vórtex e centrifugação a 15.000 g por 30 s a 4 °C. Após esse procedimento, o precipitado foi ressuspendido em 70 µL de tampão de extração *(HEPES pH 7,9 20 mM; Glicerol 25%; $MgCl_2$ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL, beta-gliceraldeído 10 mM e NaF 50 mM)* e incubado 20 min em gelo, seguido de centrifugação a 15.000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi então recolhido e estocado a -80 °C.

A concentração de proteínas nucleares solubilizadas foi obtida por meio do método de Bradford (1976), que envolve a adição de um corante ácido à solução de proteínas e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em uma leitora de microplacas. A comparação com uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA) forneceu a concentração de proteínas presentes nas amostras. Nesse método,

variações na coloração do corante ocorrem em resposta às distintas concentrações proteicas presentes nas amostras avaliadas.

3.6 Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA) para o fator de transcrição CREB

Essa técnica tem como objetivo caracterizar as interações DNA/proteína, e tem sido amplamente aplicada no estudo de fatores de transcrição. Esse ensaio se baseia no fato de que o complexo DNA/proteína formado, quando submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante, migra mais lentamente (banda de retardo), do que a sonda livre (sequência do oligonucleotídeo consenso para o CREB). O EMSA é conduzido por meio da incubação de proteínas obtidas do extrato nuclear com uma seqüência de nucleotídeos específica para o fator de transcrição CREB, sendo esta previamente marcada com γ-^{32}P ATP pela T_4 polinucleotídeo quinase. Os produtos da reação são submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante, este é posteriormente seco e exposto a um filme de autoradiografia para visualização das bandas formadas. Foi considerada como ativação do CREB a ligação deste fator de transcrição ao sítio CRE.

3.6.1 Marcação da Sonda (^{32}P-CREB)

A sequência do oligonucleotídeo consenso para o CREB (5'- AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG - 3') (Promega) foi marcada com a adição de γ-^{32}P ATP numa solução contendo 1 μL de Tampão T_4 quinase (10X), 5 μl água deionizada, 2 μL (3,5 pmol) do respectivo oligonucletídeo, 1 μL de T_4 quinase (1 U/μL) e 1 μL de γ-^{32}P ATP (3 Ci/mmol) totalizando 10 μL de volume de reação. Essa solução foi incubada a 37 °C durante 10 min sob agitação constante.

Para a retirada do excesso de γ-^{32}P ATP foi utilizada uma coluna Microspin G-25 (GE Healthcare Life Sciences, Fairfield, CT, EUA) contendo resina sephadex G-25 que foi previamente encaixada em um microtubo e colocada em uma microcentrífuga por 1 min a 3.000 rpm. Após centrifugação, o eluato foi recolhido e a atividade da sonda marcada foi determinada por adição de 1 μL dessa solução obtida a um recipiente contendo líquido de cintilação e posterior leitura em um contador para emissão β.

3.6.2 Reação de ligação e migração eletroforética

Extratos nucleares (15 μg/15 μL) referentes às regiões CPF e HPC foram incubados com 4 μL de tampão de ligação 5X *($MgCl_2$ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 250 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly dIdC 0,25 μg/μL; glicerol 20%)* por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado às amostras 1 μL da sonda ^{32}P-CREB (20.000 cpm/μl) e os tubos foram incubados por 30 min à temperatura ambiente. O complexo DNA/CREB (20 μL totais) foi aplicado em gel de poliacrilamida não-desnaturante 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5 : 1)] e a eletroforese foi realizada na presença do tampão de corrida TBE 0,5X *(Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 1 mM)* durante 2 h a 150 V. Ao final da corrida, o gel foi transferido para papel de filtro (aproximadamente 3 mm de espessura), seco e exposto ao filme autorradiográfico a -80 ˚C por aproximadamente 3 dias.

Após o período de exposição, os filmes foram submetidos ao processo de revelação com solução reveladora (Kodak, GBX) por 1 min, seguido da solução de ácido acético (2%) por 30 s e posteriormente da solução fixadora (Kodak, GBX) por 1,5 min e lavagem em água corrente. As autorradiografias foram escaneadas e quantificadas por densidade óptica pelo programa Image J (NIH).

Os valores obtidos (unidades arbitrárias) foram expressos como porcentagem de aumento ou diminuição da ligação DNA/CREB em relação

ao grupo controle (equivalente a 100% de ligação), sendo considerada a média ± erro padrão para cada amostra.

Para demonstrar a especificidade da ligação DNA/CREB descrita acima, foram realizados ensaios de competição por meio da incubação das amostras de CPF e HPC na presença ou ausência de excesso molar (5, 10, 15, 20X) de oligonucleotídeo frio dupla-fita (sonda não marcada radioativamente) específico (CREB) e não-específico (NF-kB: 5´-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3´) anteriormente à adição da sonda. Como controle positivo do CREB, utilizamos a extrato nuclear específico (A-673; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, EUA).

Com o intuito de se verificar a composição do complexo DNA/CREB, foi adicionado anticorpo específico à reação. A adição do anticorpo pode produzir diversos efeitos: se o anticorpo se ligar a uma proteína que não esteja envolvida na formação do complexo, não será visualizada nenhuma mudança no perfil da banda. Por sua vez, o reconhecimento da proteína, que participa do complexo DNA/CREB, pelo anticorpo, pode levar à redução na intensidade da banda inicial ou mesmo no retardo da mobilidade eletroforética (Supershift), por bloqueio da formação do complexo DNA/CREB ou por formar o complexo DNA/CREB/ANTICORPO, respectivamente. Para esse ensaio foram utilizadas amostras do CPF e HPC, as quais foram incubadas na presença ou ausência dos anticorpos anti-pCREB (Millipore, Billerica, MA, EUA; reconhece resíduo de Ser 133 fosforilado;), anti-CREB-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc; reconhece porção C-terminal) e anti-CREM-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), nas concentrações de 1:5, 1:10 e 1:20. Os anticorpos citados acima foram adicionados juntamente com a sonda ^{32}P-CREB.

3.7 Ensaio de Western Blot

A técnica tem como princípio detectar proteínas presentes em homogenato ou extrato de tecido biológico por meio da interação com anticorpos específicos, pelo princípio da ligação antígeno-anticorpo. Com o

intuito de quantificar os níveis proteicos de CREB e pCREB, além de verificar se os resultados obtidos pelo ensaio de EMSA eram devidos a diferenças na quantidade de CREB e pCREB presentes nas amostras estudadas, extratos proteicos nucleares do CPF e HPC foram solubilizados em tampão de amostra *(Tris base 0,125 M; SDS 4%; glicerol 20% v/v; DTT 0,2 M; azul de bromofenol 0,02%; pH 6,8)* na concentração desejada de 10 µg/15µL por poço, e fervidos por 5 min a 95 ˚C. As frações proteicas foram separadas em gel de SDS-poliacrilamida 12% *[Acrilamida/Bisacrilamida (29:1), SDS 10%]*, o qual foi submetido à eletroforese em tampão de corrida *(Tris Base 25 mM; Glicina 0,192 M; SDS 0,1%)* por 1 h a 100 V. As proteínas presentes no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose imersa em tampão de transferência *(Tris base 25 mM; glicina 192 mM; metanol 10%)* por 1 h a 110 V. Com o intuito de verificar a eficiência do procedimento de transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau *(Ponceau-S 0,5%; ácido tricloro acético 5%)*. Após a retirada da solução corante, as membranas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente sob agitação constante em solução de TBS *(Tris base 10 mM; NaCl 150 mM)*, acrescida de 5% de leite desnatado e 0,05% de Tween® 20, com o intuito de se bloquear as ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram lavadas em solução de TTBS *(TBS; Tween® 20 0,05%)* e incubadas com o anticorpo primário anti-CREB-1 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc; reconhece a porção de aminoácidos 254-327 de origem humana e portanto detecta CREB-1A, CREB-1B, CREM e ATF-1) ou anti-pCREB 1:750 (Millipore; reconhece a forma fosforilada do CREB no resíduo de Ser 133) diluídos em TTBS acrescido de leite desnatado 3%, *overnight* a 4 °C, sob agitação constante. Após essa etapa, as membranas foram lavadas com TTBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra e conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, Baltimore Pike, PA, EUA) por 1 h à temperatura ambiente e sob agitação constante. Finalmente, as membranas forma lavadas em TTBS e reveladas com substrato quimioluminescente (ECL) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA). Para tanto, foi realizado banho das membranas em ECL por 1 min e exposição das mesmas ao filme sensível a ECL (Thermo Fisher

Scientific) nos tempos adequados para cada anticorpo. Para verificar se não houve variação na quantidade de proteína aplicada no gel, foi feita a detecção de α-tubulina. Para tanto, as membranas foram inicialmente submetidas ao banho com solução "stripping" *(ácido acético 5%)* por 10 min, seguido da lavagem por 3X/10 min em TTBS sob agitação constante. Posteriormente seguiu-se o bloqueio em TTBS acrescido de leite desnatado 5% e posterior incubação com anticorpo anti-camundongo monoclonal α-tubulina 1:10.000 (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) seguido da incubação com anticorpo secundário anti-camundongo produzido em carneiro e conjugado à peroxidase 1:6000 (GE Healthcare Life Sciences).

As autorradiografias foram escaneadas e quantificadas por densidade óptica pelo programa Image J (NIH). A análise dos níveis de CREB e pCREB foi feita a partir da normalização dos valores obtidos de cada banda pela sua respectiva leitura para α-tubulina. Posteriormente, foi obtido o valor da relação pCREB/CREB (unidades arbitrárias) os quais foram expressos como porcentagem de aumento em relação ao grupo controle (equivalente a 100% de ligação), sendo considerada a média ± erro padrão (n=5) por grupo.

3.8 Avaliação dos níveis de BDNF por ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay)

O protocolo de extração de proteínas foi adaptado de Szapacs et al. (2004). Amostras provenientes do CPF e HPC, previamente pesadas (mg), foram homogeneizadas com sonicador em 2 etapas: em 1 ml de tampão de lise *(100 mM PIPES (pH 7), 500 mM NaCl, 0,2% Triton X-100, 0,1% NaN_3, 2% BSA, 2 mM EDTA.Na_2.2H2O, 200 µM PMSF, 10 µM leupetina, 1 µM antipaína e 1 µM pepstatina)* por cerca de 15 s, seguido da adição de mais 3 ml de tampão de lise e sonicadas por mais 15 s. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi submetido à quantificação proteica pelo método descrito por Rong e Baudry (1996) e armazenado a -80 °C.

Os níveis de BDNF foram avaliados através do kit BDNF E_{max}® ImmunoAssay System (Promega Corporation, Madison, Viscousin, USA), de acordo com as especificações do fabricante. Primeiramente, uma microplaca foi sensibilizada com anticorpo monoclonal anti-BDNF (1:1000) diluído em tampão carbonato *(25 mM $NaHCO_3$, 25 mM Na_2CO_3, pH 9,7)*. Após as lavagens necessárias com tampão de lavagem TTBS *(20 mM Trizma pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05% Tween® 20)* entre as etapas de incubação e a adição das amostras provenientes do CPF (1:4) e da curva padrão de BDNF (1:2000), ambos em duplicata, adicionou-se 100 µL/poço de anticorpo policlonal para BDNF (1:500). Por fim, foi adicionado anticorpo secundário anti-IgY (1:200) conjugado à enzima HRP (*horse radish peroxidase*) e após período de incubação foram aplicados 100 µL/poço do substrato da reação TMB One (tetrametilbenzidina). A reação foi interrompida com a adição de 100 µL/poço de HCl 1N, na mesma ordem em que o substrato foi adicionado e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 450 nm.

A análise dos níveis de BDNF foi feita a partir da normalização dos valores de leitura referente à cada amostra pela quantidade de proteína/poço aplicada. Para tanto, foi obtida a concentração proteica de cada amostra pelo método de Bradford, descrito no item 2.5. A quantidade de BDNF (ng de BDNF/mg de proteína total) foi expressa como média ± erro padrão (n=5 a 6) por grupo e comparada à curva padrão de BDNF (0 - 500 pg de BDNF/ml).

3.9 Imunorreatividade de pCREB no CPFm

Após o período de 3 h da última injeção de salina ou etanol administrada aos animais submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental, os animais foram profundamente anestesiados com solução de hidrato de cloral 35% (i.p.), seguido da perfusão transcardíaca. O animal anestesiado teve o coração exposto e a aorta descendente fechada para posterior inserção da agulha na região do ventrículo esquerdo, que possui coloração mais clara comparado ao órgão como um todo. Primeiramente, o animal recebeu solução salina com o objetivo de retirar o

máximo possível de volume de sangue, seguido da transfusão de 300 mL de solução de fixador adicionado de tetraborato de sódio - Bórax (contendo paraformaldeído 4%) para a fixação do tecido. Após esse procedimento, os animais foram decapitados para remoção dos encéfalos, os quais foram rapidamente inseridos em tubos estéreis contendo solução Bórax adicionada de sacarose (20%), e mantidos por 2 h. Após esse período, foi realizada a troca da solução para outra contendo tampão fosfato salina (PBS) livre de RNAse adicionada de sacarose (20%), na qual os encéfalos ficaram imersos até o momento do corte ao micrótomo de congelamento. Nos dois dias consecutivos foi realizado o corte dos encéfalos na espessura de 30 µm. Os cortes foram então coletados em tubos estéreis contendo solução Anti-Freeze RNAse Free, totalizando 5 séries/animal, e mantidos a -20 °C até o momento do uso.

Para o ensaio de imunorreatividade, os cortes foram lavados em tampão potássio-fosfato de sódio 0,02 M (KPBS) para remoção da solução *anti-freeze* por 30 min e tratados com 0,3% de peróxido de hidrogênio (LabSynth, Diadema, São Paulo, Brasil) durante 15 min para neutralização da peroxidase endógena e novamente lavados em KPBS para serem incubados no anticorpo primário anti-pCREB (1:30.000, Upstate, Billerica, MA, USA), policlonal, gerado em coelho, diluído em KPBS, 3% de soro normal de cabra e 0,3% de Triton X-100 por 24 h à temperatura ambiente. Após esse período, o tecido foi lavado em KPBS e incubado em anticorpo secundário biotinilado gerado em cabra contra coelho (1:800, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), lavados em KPBS e a seguir incubados no complexo avidina-biotina (1:33, Kit Elite; Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EUA) por 1 h. Em seguida, os cortes foram lavados em KPBS e em tampão acetato de sódio 0,2 M e submetidos à reação de peroxidase composta por solução de tampão acetato de sódio, o cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich Corp) a 0,02%, sulfato de níquel a 2,5% e de peróxido de hidrogênio a 0,003%. A reação foi finalizada com lavagens em tampão acetato seguida de lavagens em KPBS. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos em estufa a 37 ºC por pelo menos 18 h, desidratados em concentrações crescentes de álcool

etílico, seguido de xilol, e cobertos com lamínulas usando D.P.X. (Aldrich, Milwaukee – EUA) como meio de montagem.

A análise dos dados foi feita a partir da determinação de uma área de contagem (mm^2) posicionada no centro da região anatômica de interesse: PrL e MO (50 mm^2). As imagens correspondem a um aumento de 5x e 10x, e os valores foram expressos como a média de núcleos/mm^2 ± erro padrão (n=4 a 6) de um n=3 níveis/grupo.

3.10 Análise estatística

O teste "t" de Student foi utilizado para avaliação da atividade locomotora após tratamento agudo com etanol (Experimento I). Foi usada a ANOVA-3 vias para medidas repetidas (idade X tratamento X tempo), sendo considerado o fator "tempo" como medida repetida, para avaliar os dados referentes ao "Desenvolvimento da Sensibilização Comportamental". Os dados obtidos dos dias de habituação 1 e 2 foram avaliados por uma ANOVA-2 vias para medidas repetidas (tratamento X tempo), sendo considerado o fator "tempo" novamente como medida repetida.

A ANOVA-2 vias foi utilizada para a análise dos resultados provenientes da alcoolemia, ELISA para BDNF e imuno-histoquímica para pCREB. A ANOVA-1 via foi utilizada para comparar as diferenças na alcoolemia, ativação do CREB proveniente dos estudos de cinética de ação do etanol e no ensaio de Western Blot para CREB e pCREB. Após a análise dos dados pela ANOVA, foi usado o teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparação entre os grupos, quando necessário. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão. Foi considerada significante a probabilidade associada a $p < 0,05$.

3.11 Delineamento experimental

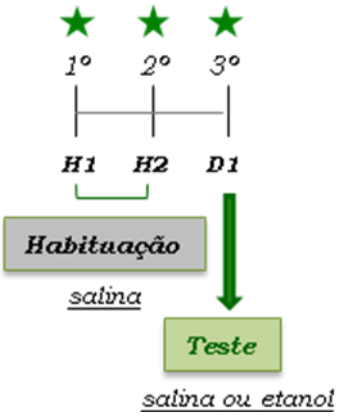
3.11.1 Experimento I – Efeitos da administração aguda de etanol na atividade locomotora e avaliação temporal da ativação do CREB no CPF e HPC de camundongos machos adultos

Para esse ensaio, foram utilizados animais adultos. Após o período de 1 semana de habituação no biotério, os animais foram divididos em 5 grupos iguais designados segundo o tempo no qual, após uma única dose de etanol (grupo experimental Et), esses seriam submetidos à eutanásia. Dessa forma, foram constituídos os grupos nomeados da seguinte forma: 1h, 3h, 6h e 24h (com 12 animais/ grupo). O grupo controle foi designado como S, conforme Tabela 1.

Nos dois primeiros dias de experimento, designados como Habituação 1 (H1) e Habituação 2 (H2), os animais receberam uma injeção de salina e, após 5 min, foram expostos ao campo aberto durante 10 min com intuito de se obter a locomoção basal desses animais, bem como de se reduzir a novidade em relação ao aparato experimental. No terceiro dia, nomeado como dia Teste, os animais receberam uma injeção de salina ou etanol e após 5 min foram expostos ao campo aberto por 10 min.

Posteriormente, os animais tratados com etanol foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical 1, 3, 6 e 24 h após a injeção, o encéfalo foi retirado e as estruturas CPF e HPC foram dissecadas e rapidamente armazenadas a -80 °C para serem posteriormente utilizadas nos ensaios de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA) para o fator de transcrição CREB. Os animais do grupo controle foram submetidos à eutanásia 1 h após a injeção salina. A figura 6 representa o desenho experimental do ensaio agudo com etanol.

O mesmo protocolo foi utilizado para animais destinados à dosagem de etanol no sangue.



★ Dias em que foi avaliada a atividade locomotora em campo aberto

Figura 6. Desenho experimental para se avaliar os efeitos do tratamento agudo com etanol sobre a atividade locomotora.

Tabela 1 - Grupos experimentais e tratamentos realizados no Experimento I. Os animais foram expostos ao campo aberto e ao tratamento por 3 dias. Os grupos estão separados de acordo com o tempo em que os animais foram eutanasiados após uma única injeção aguda com etanol (2,0 g/kg). Os animais ADL foram submetidos ao mesmo protocolo, porém sacrificados somente 3 h após a injeção de etanol com o intuito de se complementar o estudo da composição do dímero de CREB. AD (camundongos adultos); ADL (camundongos adolescentes).

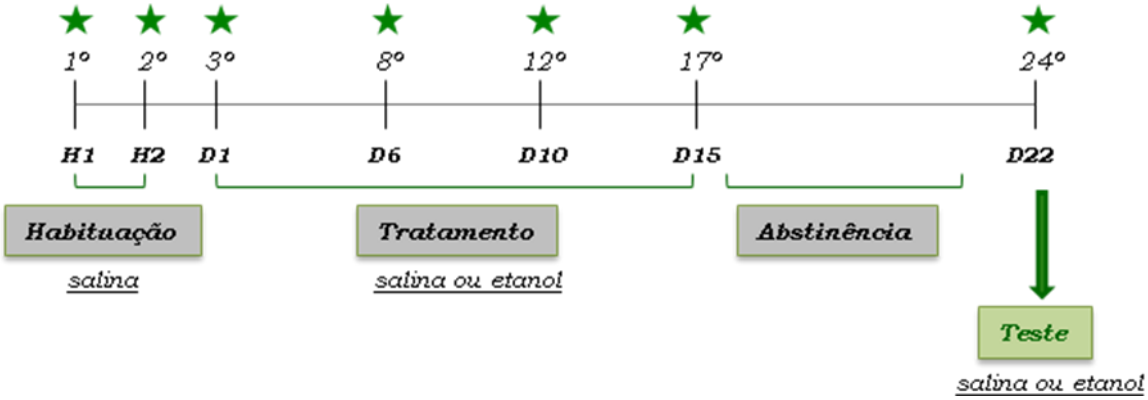
Experimento I – Administração aguda de etanol				
Grupo experimental	**Idade**	**Tempo de tratamento**	**Teste**	**Intervalo entre Teste e a eutanásia**
S	AD	3 dias	salina	1 h
1h	AD	3 dias	etanol	1 h
3h	AD/ ADL	3 dias	etanol	3 h
6h	AD	3 dias	etanol	6 h
24h	AD	3 dias	etanol	24 h

3.11.2 Experimento II – Efeitos da administração aguda e repetida de etanol sobre a atividade locomotora, a ativação do CREB, razão entre níveis proteicos de pCREB/CREB, imunorreatividade de pCREB e níveis de BDNF no CPF e HPC de camundongos machos adolescentes e adultos

3.11.2.1 Sensibilização Comportamental

Para esse estudo, camundongos na fase adolescente (DPN=26-28 dias) e adulta (DPN=56-58 dias) do desenvolvimento foram divididos em 3 grupos: S-S (grupo controle), S-Et (grupo etanol agudo) e Et-Et (grupo etanol repetido). Nos dois primeiros dias de habituação (H1 e H2), todos os animais receberam injeções de salina e a atividade locomotora foi registrada por 10 min. A partir de então, os animais foram tratados com salina (S-) ou etanol (Et-) durante 15 dias consecutivos (D1 - D15) e a atividade locomotora foi registrada nos dias D1, D6, D10 e D15. Após uma semana de abstinência (D22), os animais receberam uma injeção de salina ou etanol, nas mesmas doses utilizadas na primeira fase de tratamento, formando os grupos: controle, o qual recebeu uma injeção de salina (S-S), e os grupos "etanol agudo" (S-Et) e "etanol repetido" (Et-Et), os quais receberam uma injeção de etanol. A atividade locomotora dos animais foi registrada 5 min após a injeção de salina ou etanol durante 10 min nos dias mencionados. Em camundongos adultos, esse protocolo de sensibilização tem sido amplamente utilizado por nosso grupo (CAMARINI et al., 1995, 2000a,b; FARIA et al., 2008). Três horas após a última injeção, os animais foram submetidos à eutanásia, os encéfalos foram retirados e as estruturas CPF e HPC foram dissecadas para os ensaios bioquímicos ou fixadas para os ensaios imuno-histoquímicos. O experimento comportamental foi replicado diversas vezes para os ensaios de EMSA, Western Blotting, de ELISA, e para os ensaios imuno-histoquímicos. A figura 7 descreve o protocolo experimental. O esquema do tratamento encontra-se descrito na tabela 2.

Grupos separados de animais foram tratados segundo o mesmo protocolo para a dosagem de etanol no sangue.



★ Dias em que foi avaliada a atividade locomotora em campo aberto

Figura 7. Desenho experimental para se avaliar os efeitos do tratamento repetido com etanol sobre a atividade locomotora.

Tabela 2 - Grupos experimentais e tratamentos realizados no Experimento II, cujo objetivo foi observar o efeito agudo e repetido de etanol no período total de 24 dias de tratamento. Os grupos estão separados de acordo com a idade e o tratamento ao qual foram submetidos. Os animais foram eutanaziados 3 h após o dia Teste (D22) em que receberam uma injeção de salina (2,0 g/kg) ou de etanol (2,0 g/kg). AD (camundongos adultos); ADL (camundongos adolescentes). S-S (grupo controle); S-Et (grupo agudo); Et-Et (grupo crônico).

Experimento II – Administração aguda e repetida de etanol					
Grupo experimental	**Idade**	**Tempo de tratamento**	**Tratamento**	**Teste**	**Intervalo entre Teste e eutanásia**
S-S	ADL	22 dias	salina	salina	3 h
S-Et	ADL	22 dias	salina	etanol	3 h
Et-Et	ADL	22 dias	etanol	etanol	3 h
S-S	AD	22 dias	salina	salina	3 h
S-Et	AD	22 dias	salina	etanol	3 h
Et-Et	AD	22 dias	etanol	etanol	3 h

É importante ressaltar que os animais que compõem os grupos referentes à fase adolescente, ao final do protocolo, se encontravam na fase adulta (DPN de aproximadamente 52 dias).

4 RESULTADOS

4.1 Experimento I – Efeitos da administração aguda de etanol na atividade locomotora e avaliação temporal da ativação do CREB no CPF e HPC de camundongos machos adultos

4.1.1 Atividade locomotora

A *Figura 8* corresponde à atividade locomotora obtida após administração de salina (S) ou etanol (Et) (2,0 g/kg). Nos dois primeiros dias (H1 e H2), em que os animais receberam uma única injeção de salina, foi possível observar efeito da habituação, sendo a média obtida no dia H2 menor que no H1 [$F_{(1,25)} = 14,2$; $p < 0,001$) mostrando ter diminuído o efeito da novidade ao aparato experimental. No dia Teste, no qual os grupos receberam salina ou etanol, os animais Et apresentaram maior atividade locomotora quando comparados ao grupo S (t=2,49; p<0,05). Após o teste comportamental, os animais foram submetidos à eutanásia em diferentes tempos para o estudo da ativação do CREB.

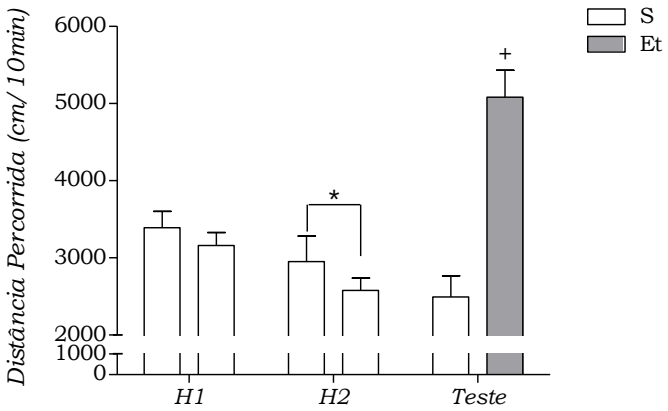


Figura 8. Efeito do tratamento agudo com etanol (2,0 g/kg) sobre a locomoção total de camundongos adultos (n=19). Os dados das habituações H1 e H2 foram analisados pela ANOVA-2 vias para medidas repetidas: (*) H2 < H1, $p < 0,05$. Para o dia Teste foi utilizado o teste t-Student; +$p < 0,05$, em relação ao grupo S. Os dados são expressos como média ± erro padrão.

4.1.2 Alcoolemia

Como demonstrado na *Figura 9*, a alcoolemia de animais eutanasiados 1 h após a injeção de etanol foi de 1,04 ± 0,18 g/L. Entretanto, nos tempos subseqüentes de 3, 6 e 8 h não foi mais detectado etanol no sangue dos animais, mostrando o *clearance* sanguíneo do etanol. Essa dosagem foi feita para comprovar que o etanol não estava mais presente após 3 h da administração da droga.

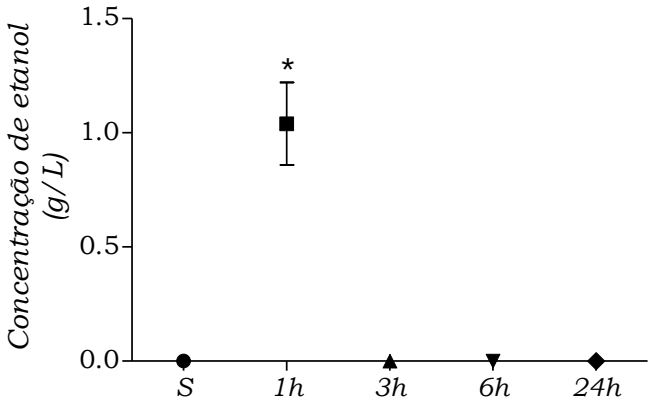


Figura 9. Dosagem temporal da alcoolemia em camundongos adultos. Amostras de sangue (n=5/tempo) obtidas após tratamento agudo com etanol. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. *p < 0,05 em relação ao grupo controle (S) (ANOVA-1 via, seguido de Newman-Keuls).

4.1.3 Caracterização do Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (Eletrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA) para o fator de transcrição CREB

Tanto no CPF quanto no HPC de camundongos adolescentes e adultos, expostos a uma única dose de etanol (2,0 g/kg), foi verificada a presença de duas bandas. A caracterização das bandas foi realizada com o aumento da concentração de oligonucleotídeo de CREB não marcado radioativamente (oligo frio). A inibição gradativa destas bandas mostrou que ambas correspondem a dímeros de CREB e foram designadas como Bandas 1 e 2.

Verificou-se ainda a presença de uma banda não específica (NE), a qual não foi deslocada na presença de excesso de oligo frio.

A especificidade da interação da seqüência consenso de DNA/CREB foi confirmada após incubação das amostras com sonda de NF-kB (20x), na qual não ocorreu inibição das Bandas 1 ou 2 *(Figuras 10 e 11)*.

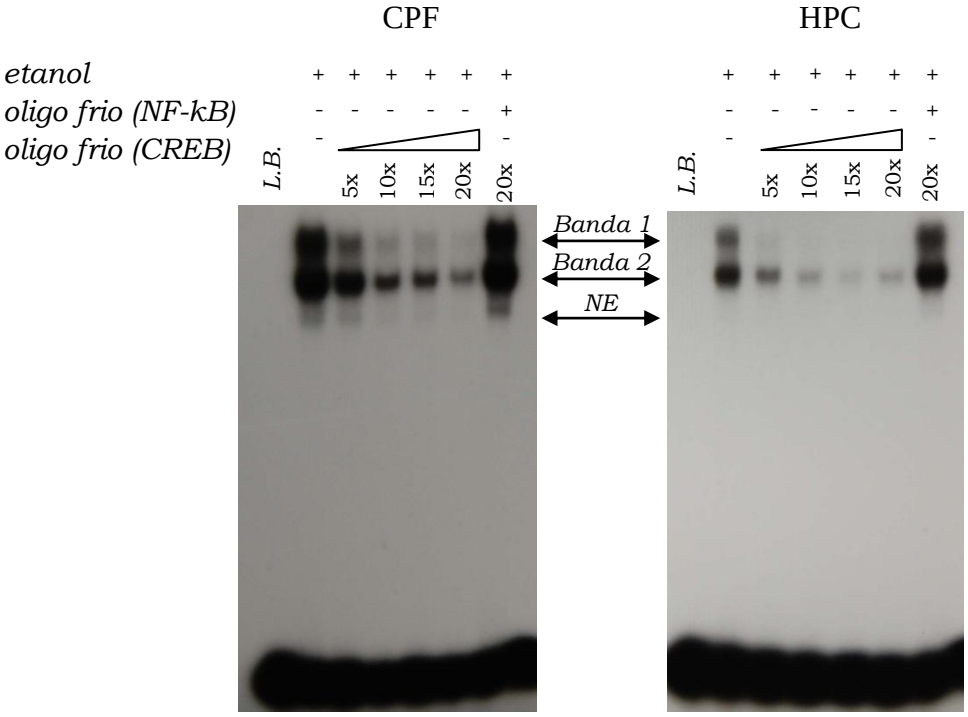


Figura 10. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de competição no Córtex pré-frontal (CPF) e Hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes. Extratos nucleares (15 µg) do CPF e HPC de animais tratados com uma injeção i.p. aguda de etanol (2,0 g/kg) e eutanasiados 3 h depois. O ensaio de competição foi conduzido na ausência (-) ou presença (+) de excesso molar (5 a 20x) de oligonucleotídeo dupla-fita não marcado (oligo frio), específico (CREB) ou não específico (NF-kB) (20x). A posição dos complexos DNA/CREB, designados como Banda 1 e 2, e da sonda livre estão indicados pelas setas. L.B. (Loading buffer).

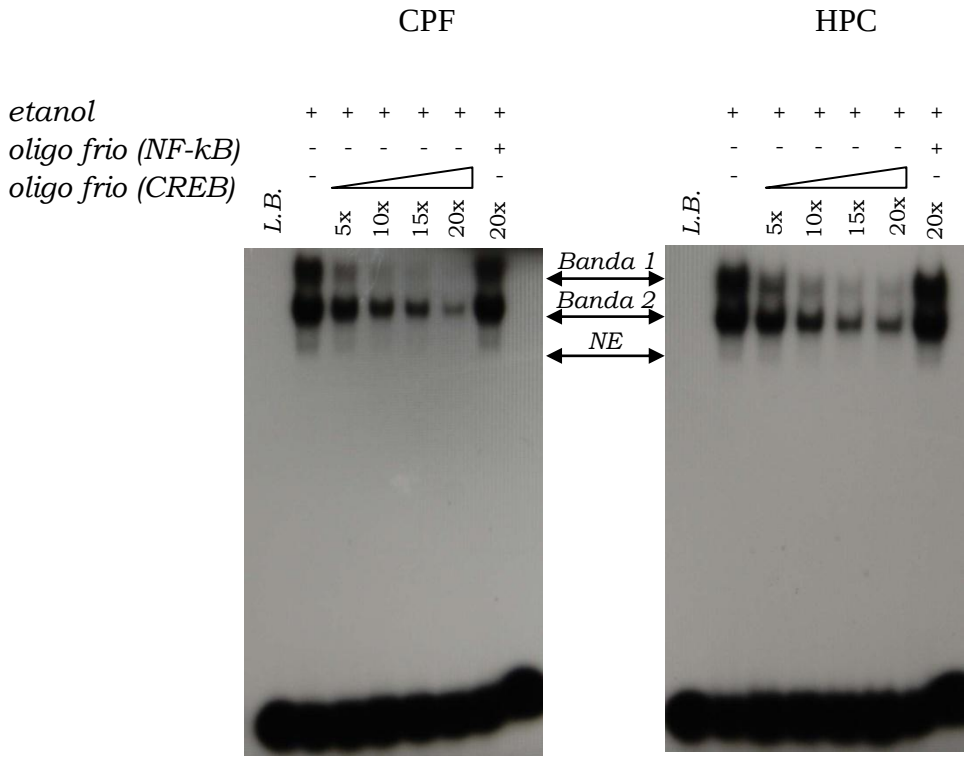


Figura 11. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de competição no Córtex pré-frontal (CPF) e Hipocampo (HPC) de camundongos adultos. Extratos nucleares (15 µg) do CPF e HPC de animais tratados com uma injeção i.p. aguda de etanol (2,0 g/kg) e eutanasiados 3 h depois. O ensaio de competição foi conduzido na ausência (-) ou presença (+) de excesso molar (5 a 20x) de oligonucleotídeo dupla-fita não marcado (oligo frio), específico (CREB) ou não específico (NF-kB) (20x). A posição dos complexos DNA/CREB, designados como Banda 1 e 2, e da sonda livre estão indicados pelas setas. L.B. (Loading buffer).

Os anticorpos utilizados no ensaio são descritos como capazes de identificar proteínas da família CREB, como CREM, ATF-1, CREB e pCREB (CREB na sua forma fosforilada). Com o intuito de elucidar a composição do dímero de CREB que compõe os complexos DNA/CREB induzidos pelo etanol, amostras de CPF e HPC foram incubadas na presença de anti-pCREB, além de anti-CREB-1 e/ou anti-CREM-1.

No CPF de ADL e AD, a incubação das amostras com anti-pCREB levou ao retardo da mobilidade eletroforética (supershift) da Banda 2, o qual se sobrepôs à Banda 1, para todas as diluições testadas. Na presença de anti-CREB-1, ocorreu supershift da Banda 2 e provavelmente, supershift da

Banda 1 visto que é possível notar não somente a redução na intensidade da banda na posição 1, bem como a presença de uma terceira banda designada como Banda 3, que sugere-se ser o supershift da Banda 1. A incubação com anti-CREM-1, levou à redução na intensidade da Banda 2, sem alteração aparente na Banda 1. Na presença concomitante de anti-CREB-1 e anti-CREM-1, nota-se supershift da Banda 2, bem como sugere-se supershift da Banda 1, visto que houve tanto redução na intensidade da banda na posição 1 como o aparecimento de uma terceira banda, designada como Banda 3 *(Figura 12* e *Figura 13).*

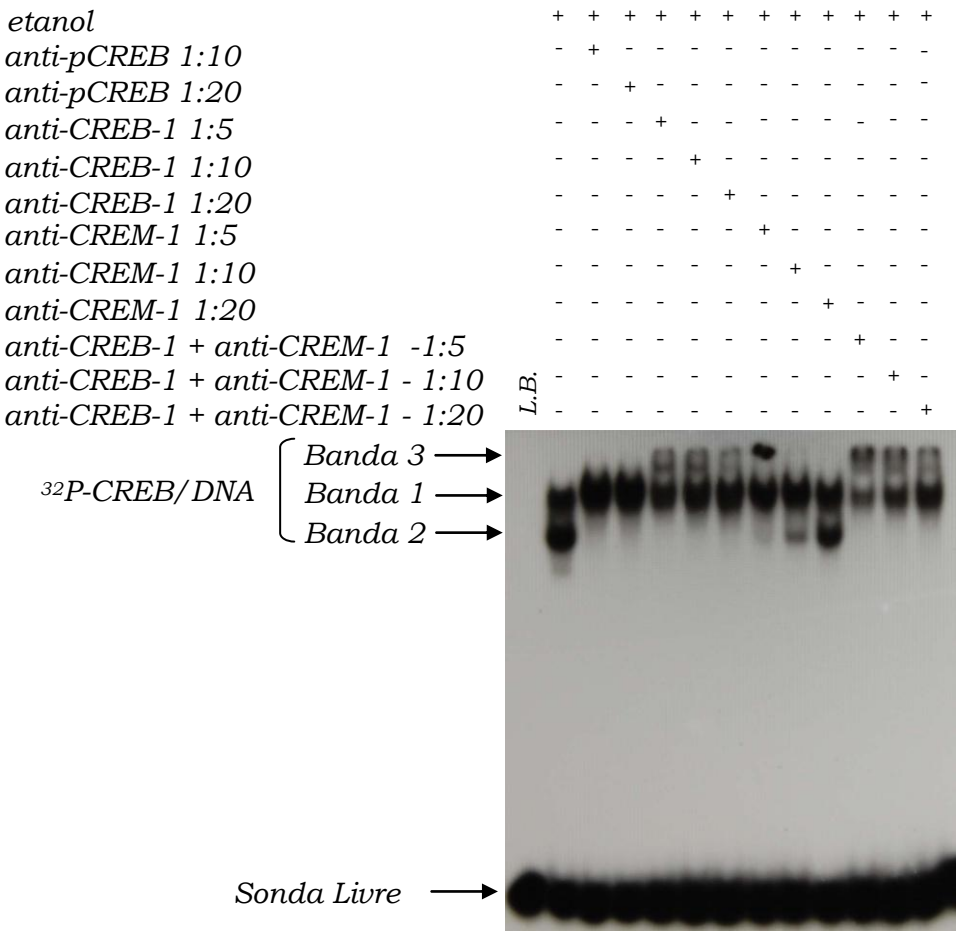


Figura 12. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de supershift no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adolescentes. Extratos nucleares (15 µg) do CPF de animais tratados com uma injeção i.p. aguda de etanol (2,0 g/kg) e eutanasiados 3 h depois. O ensaio de supershift foi feito na ausência (-) ou na presença (+) de anticorpo anti-pCREB (1:10 e 1:20), anti-CREB-1 (1:5; 1:10 e 1:20) e/ou, anti-CREM-1 (1:5; 1:10 e 1:20). A posição dos complexos DNA/CREB, designados como Bandas 1 e 2, e da sonda livre estão indicados pelas setas. L.B. (Loading buffer).

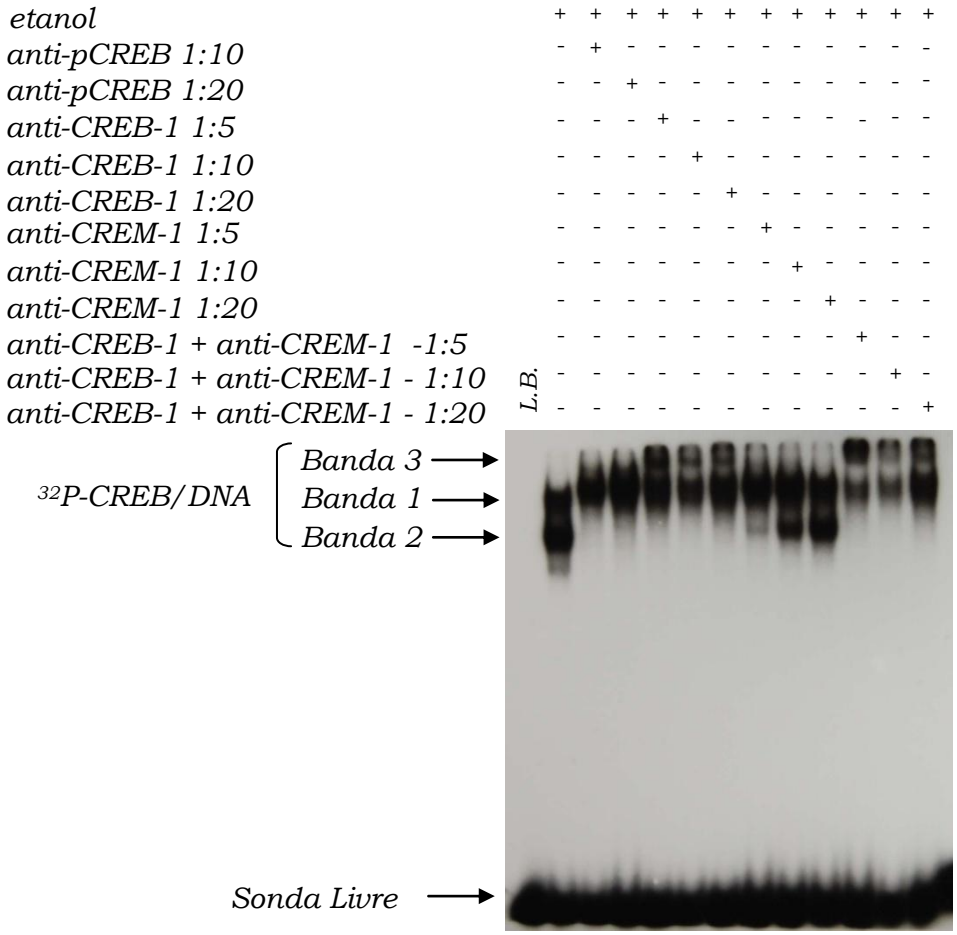


Figura 13. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de supershift no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adultos. Extratos nucleares (15 µg) do CPF de animais tratados com uma injeção i.p. aguda de etanol (2,0 g/kg) e eutanasiados 3 h depois. O ensaio de supershift foi feito na ausência (-) ou na presença (+) de anticorpo anti-pCREB (1:10 e 1:20), anti-CREB-1 (1:5; 1:10 e 1:20) e/ou, anti-CREM-1 (1:5; 1:10 e 1:20). A posição dos complexos DNA/CREB, designados como Bandas 1 e 2, e da sonda livre estão indicados pelas setas. L.B. (Loading buffer).

O perfil dos dímeros no HPC de ADL e AD é semelhante ao observado no CPF. Novamente, a incubação das amostras com anti-pCREB levou ao retardo da mobilidade eletroforética (supershift) da Banda 2, para todas as diluições testadas, sobrepondo-se à Banda 1. A presença de anti-CREB-1 levou ao supershift da Banda 2 e provavelmente, supershift da Banda 1, visto que foi possível notar não somente a redução na intensidade da banda na posição 1, bem como a presença de uma terceira banda designada como Banda 3, que sugere-se ser o supershift da Banda 1.

A incubação com anti-CREM-1, levou à redução na intensidade da Banda 2, sem alteração aparente na Banda 1 e a incubação desse anticorpo concomitantemente a presença de anti-CREB-1 levou ao supershift da Banda 2, bem como sugere supershift da Banda 1 que poderia ser visualizada tanto pela redução na intensidade da banda na posição 1, sugerindo deslocamento da mesma dessa posição inicial, bem como o aparecimento de uma terceira banda, designada como Banda 3 *(Figura 12* e *Figura 13).*

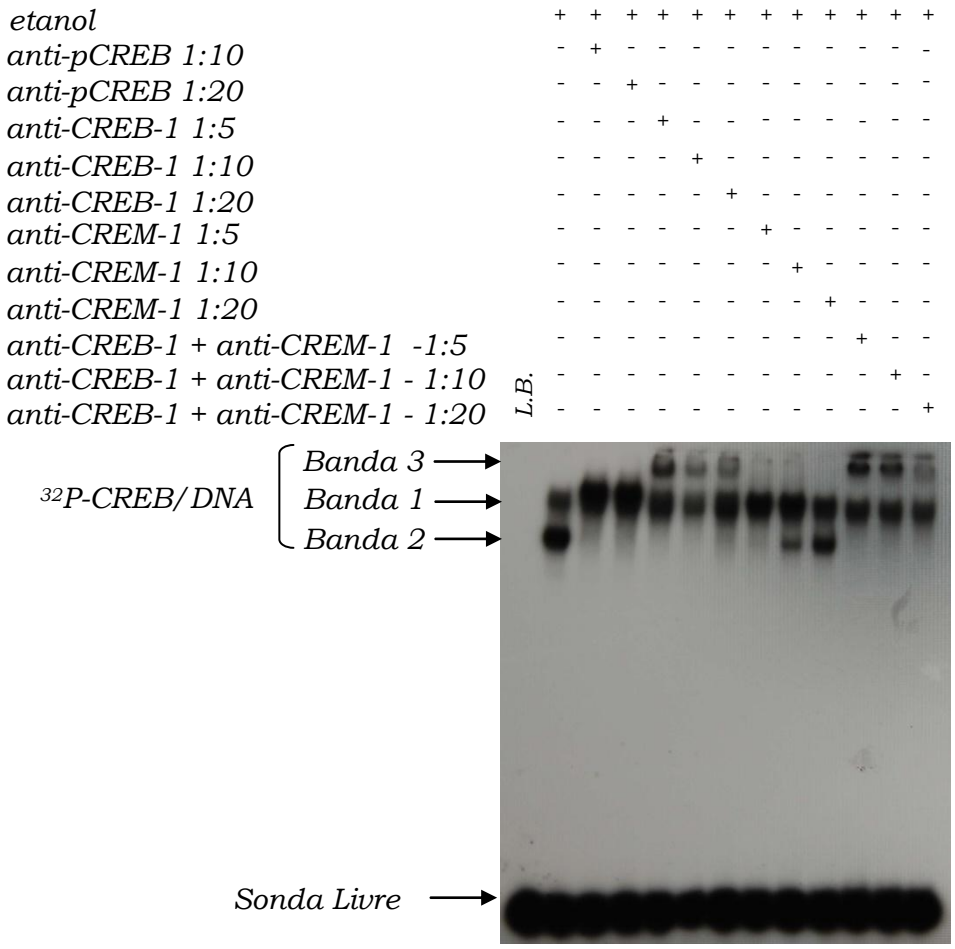


Figura 14. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de supershift no Hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes. Extratos nucleares (15 µg) do HPC de animais tratados com uma injeção i.p. aguda de etanol (2,0 g/kg) e eutanasiados 3 h depois. O ensaio de supershift foi feito na ausência (-) ou na presença (+) de anticorpo anti-pCREB (1:10 e 1:20), anti-CREB-1 (1:5; 1:10 e 1:20) e/ou, anti-CREM-1 (1:5; 1:10 e 1:20). A posição dos complexos DNA/CREB, designados como Bandas 1 e 2, e da sonda livre estão indicados pelas setas. L.B. (Loading buffer).

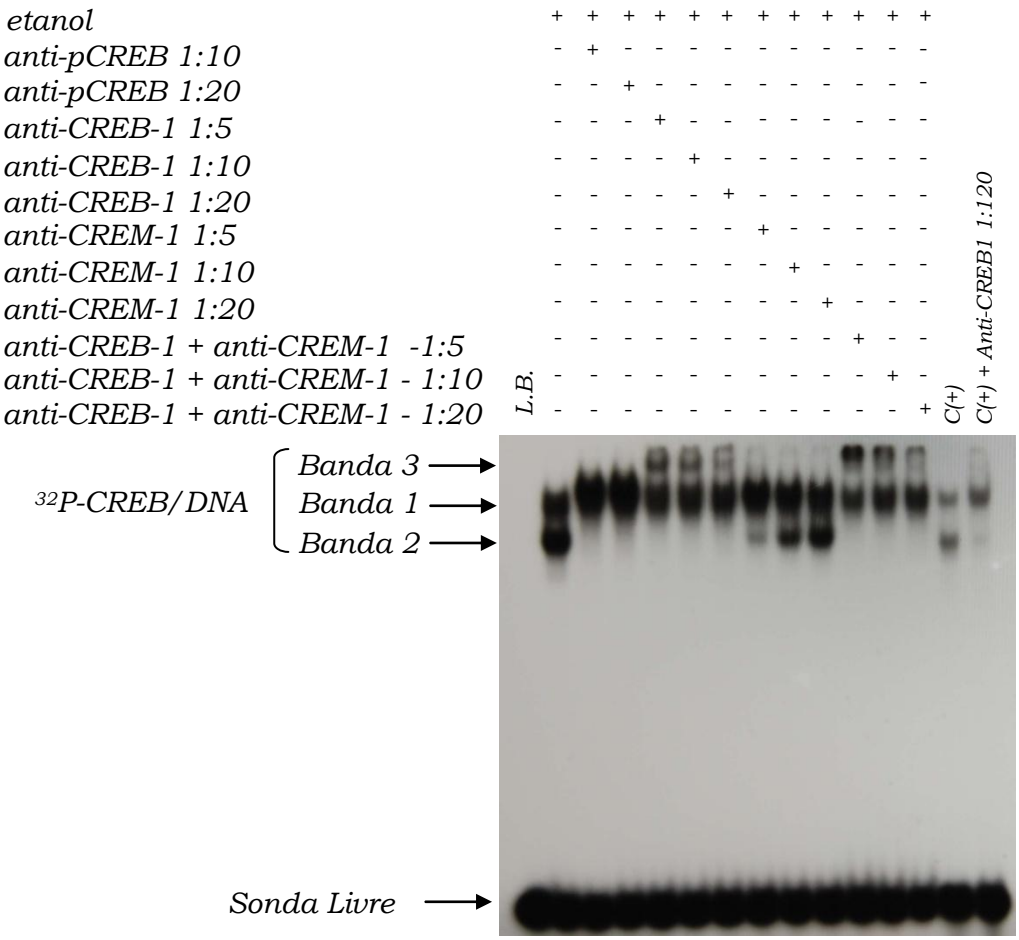


Figura 15. Caracterização da ligação DNA/CREB por meio do ensaio de supershift no Hipocampo (HPC) de camundongos adultos. Extratos nucleares (15 µg) do HPC de animais tratados com uma injeção i.p. aguda de etanol (2,0 g/kg) e eutanasiados 3 h depois. O ensaio de supershift foi feito na ausência (-) ou na presença (+) de anticorpo anti-pCREB (1:10 e 1:20), anti-CREB-1 (1:5; 1:10 e 1:20) e/ou, anti-CREM-1 (1:5; 1:10 e 1:20). A posição dos complexos DNA/CREB, designados como Bandas 1 e 2, e da sonda livre estão indicados pelas setas. Aplicação de 15 µg de extrato específico (A-673, Santa Cruz) como controle positivo da interação DNA/CREB, bem como a incubação do mesmo na presença de anti-CREB-1 1:5. L.B. (Loading buffer).

O padrão das bandas provenientes do CPF e HPC mostrou perfil semelhante ao Controle Positivo (A-673, Santa Cruz), com a presença de complexos DNA/CREB de tamanho semelhante aos encontrados nas estruturas estudadas *(Figura 15)*, bem como ocorreu deslocamento da Banda 2, referente ao extrato do controle positivo, na presença de anti-CREB-1 (1:5).

4.1.4 Avaliação temporal da ativação do CREB após tratamento agudo com etanol

Uma vez definidas as bandas a serem mensuradas, foi avaliado o efeito temporal da administração aguda de etanol sobre a ativação do CREB no CPF e no HPC. Quatro animais por grupo foram escolhidos randomicamente para o ensaio de EMSA. Os animais sofreram eutanásia nos tempos 1, 3, 6 e 24 h após a injeção i.p. de salina ou etanol.

Como pode ser observado na *Figura 16*-**A.**, o perfil temporal da ativação do CREB induzido pelo etanol no CPF foi semelhante para as Bandas 1 e 2. Assim, podemos observar pela análise dos resultados que ocorreu diminuição dessa interação nos tempos de 1, 3 e 6 h após uma única dose de etanol nas duas bandas (Banda 1: [$F_{(4,15)} = 45,65$, $p < 0,001$]; Banda 2: [$F_{(4,15)} = 22,07$, $p < 0,001$], comparado ao grupo S (grupo controle) *(Figura 16*–***B.)***. No tempo de 24 h após a injeção de etanol, a atividade do CREB voltou aos níveis semelhantes ao grupo controle (S).

Em relação ao HPC (*Figura 17*-**A.**), o perfil temporal da ativação do CREB para Banda 1 mostrou tendência ao aumento nos tempos 1 h e 3 h, com redução significante em 6 h e retorno aos níveis basais 24 h depois da injeção de etanol [$F_{(4,15)} = 8,89$; $p < 0,01$]. Em relação à Banda 2, foi observado aumento significante na ligação DNA/CREB nos tempos de 1 h e 3 h [$F_{(4,15)} = 8,01$; $p < 0,05$] quando comparado ao seu grupo controle (S) (*Figura 17*–**B.**).

Baseado no resultado obtido nas regiões do CPF e HPC foi escolhido o tempo de 3 h após a injeção aguda de etanol no qual foi observado respectivamente, diminuição e aumento na ativação de CREB, para estudar o efeito do tratamento repetido com etanol na modulação desse fator de transcrição.

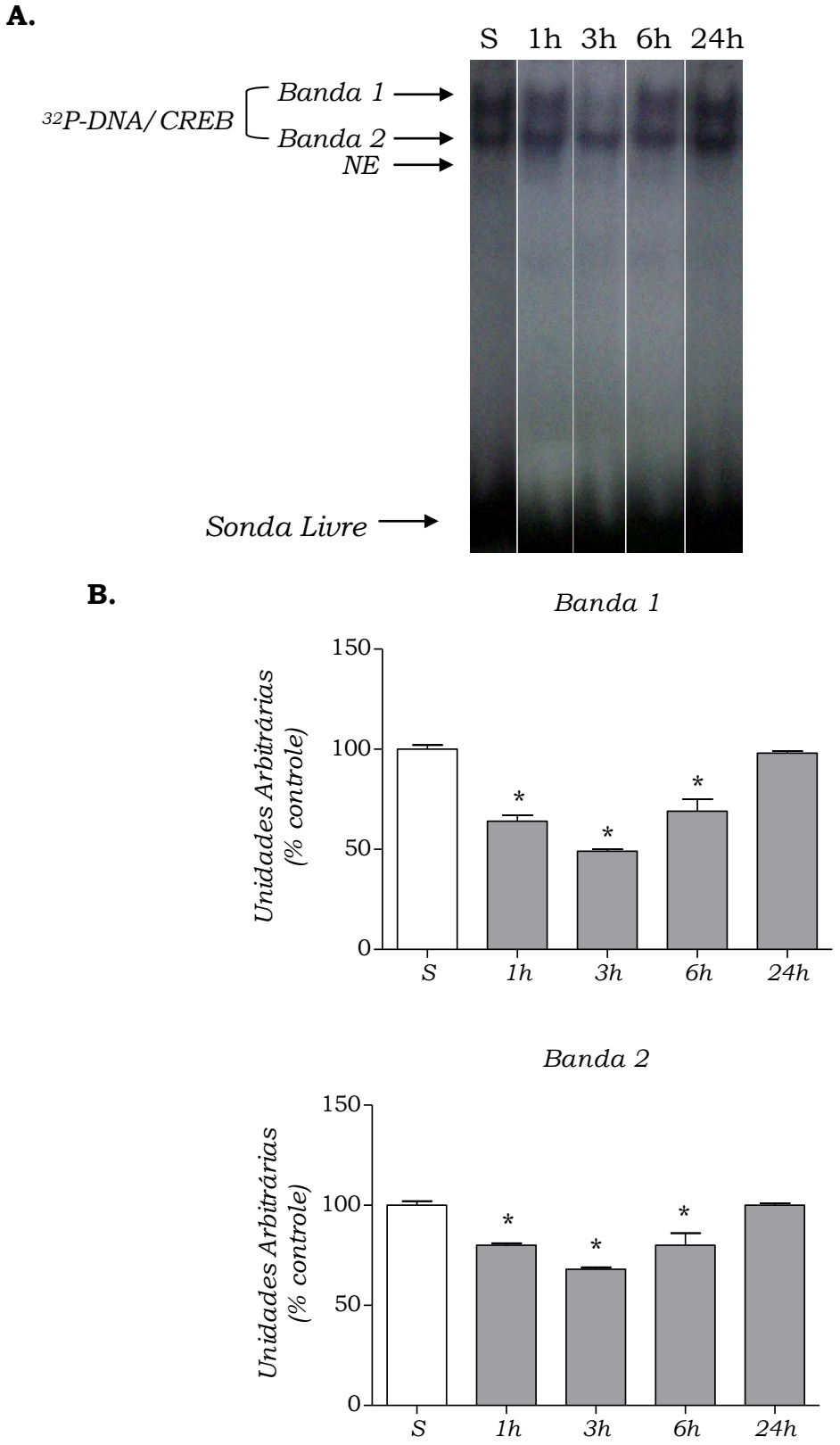
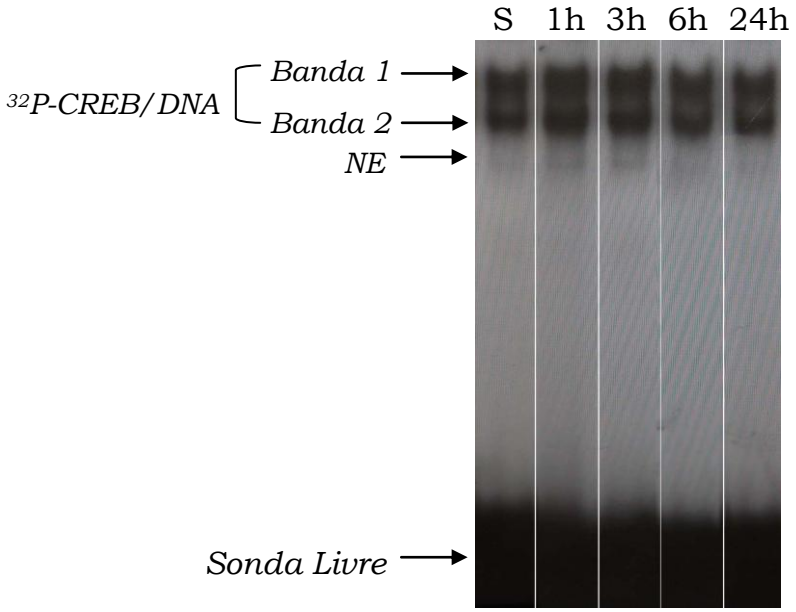


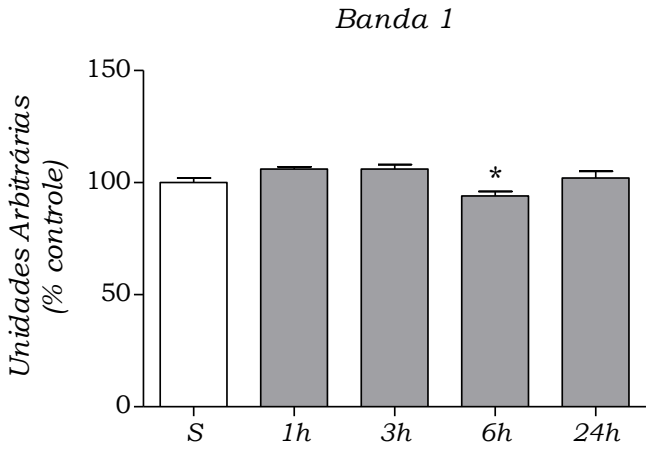
Figura 16. **A.** Avaliação temporal da ativação do CREB no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adultos. Extratos nucleares (15 µg) do CPF de animais eutanasiados 1, 3, 6, e 24 h após uma injeção i.p. aguda de etanol (2,0

g/kg). A posição dos complexos DNA/CREB, designados como Banda 1 e 2, e da sonda livre estão indicados pelas setas. **B.** Análise densitométrica das Bandas 1 e 2. Os dados correspondem às médias das porcentagens em relação ao controle ± erro padrão (n=4) de um único experimento. *p < 0,01 em relação ao grupo controle (S) de cada complexo (ANOVA-1 via, seguido de Newman-Keuls).

A.



B.



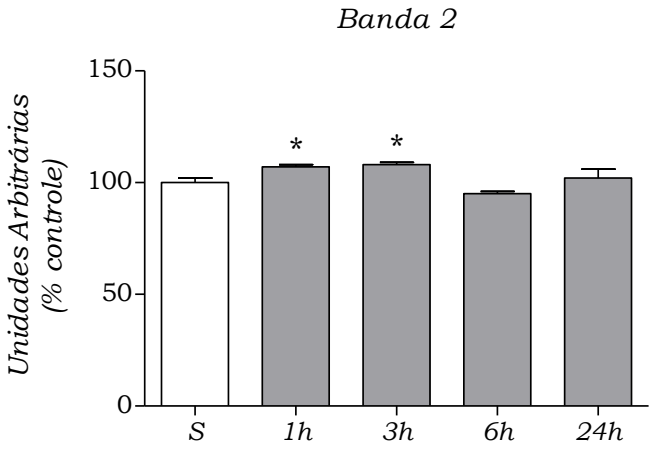


Figura 17. **A.** Avaliação temporal da ativação do CREB no Hipocampo (HPC) de camundongos adultos. Extratos nucleares (15 µg) do HPC de animais eutanasiados 1, 3, 6, e 24 h após uma injeção i.p. aguda de etanol (2,0 g/kg). A posição dos complexos DNA/CREB, designados como Banda 1 e 2, e da sonda livre estão indicados pelas setas. **B.** Análise densitométrica das Bandas 1 e 2. Os dados correspondem às médias das porcentagens em relação ao controle ± erro padrão (n=4) de um único experimento. *$p < 0,05$ em relação ao grupo controle (S) de ambas as bandas (ANOVA-1 via, seguido de Newman-Keuls).

4.2 Experimento II – Efeitos da administração aguda e repetida de etanol sobre a atividade locomotora, a ativação do CREB, razão entre níveis proteicos de pCREB/CREB, imunorreatividade de pCREB e níveis de BDNF no CPF e HPC de camundongos machos adolescentes e adultos

4.2.1 Atividade locomotora

A análise da locomoção nos dois primeiros dias de habituação (H1 e H2) por meio da ANOVA-2 vias para medidas repetidas (idade x tempo) mostrou o efeito da habituação ao campo aberto para ambas as idades, sendo a média obtida no dia H2 significativamente menor em relação ao dia H1 [$F_{(1,94)} = 104,81$; $p < 0,01$]. Além disso, não houve diferenças ontogênicas no perfil de locomoção como mostrou o fator de interação idade x tempo [$F_{(1,94)} = 0,13$; $p > 0,05$].

A ANOVA-3 vias para medidas repetidas (idade x tratamento x tempo) mostrou haver diferenças significantes entre as idades e os dias de tratamento estudados (*Figura 18*). A análise do fator tratamento [$F_{(2,90)}$ = 66,84; $p < 0,01$] mostrou aumento significante da atividade locomotora dos animais tratados repetidamente com etanol comparados aos demais grupos. A interação idade x tratamento [$F_{(2,90)}$ = 3,88; $p < 0,05$] revelou que animais AD apresentam maior atividade locomotora quando comparados aos ADL. Ao se analisar a interação dos fatores idade x tratamento x tempo [$F_{(6,270)}$ = 3,32; $p < 0,05$] foi verificado que os animais AD tratados repetidamente com etanol desenvolveram sensibilização da atividade locomotora a partir da segunda exposição ao campo aberto (D6), ao contrário dos animais ADL que não exibiram sensibilização.

No dia D22 de tratamento, um dos grupos tratados repetidamente com salina, recebeu salina enquanto o outro grupo salina recebeu etanol, formando os grupos S-S (controle) e S-Et (agudo). Por sua vez, o grupo tratado repetidamente com etanol, recebeu etanol, formando o grupo Et-Et (crônico). A avaliação pela ANOVA-2 vias mostrou haver efeito da idade [$F_{(1,90)}$ = 33,06; $p < 0,01$], do tratamento [$F_{(1,90)}$ = 44,55; $p < 0,01$], bem como a interação idade x tratamento [$F_{(1,90)}$ = 16,11; $p < 0,01$]. A análise *a posteriori* revelou que os animais AD do grupo Et-Et (crônico) apresentaram atividade locomotora maior do que seus respectivos grupos S-S (controle) e S-Et (agudo), sugerindo expressão da sensibilização. Os animais ADL do grupo Et-Et (crônico), por sua vez, apresentaram atividade locomotora menor do que seu respectivo grupo S-Et (agudo), mas não quanto ao grupo S-S (controle).

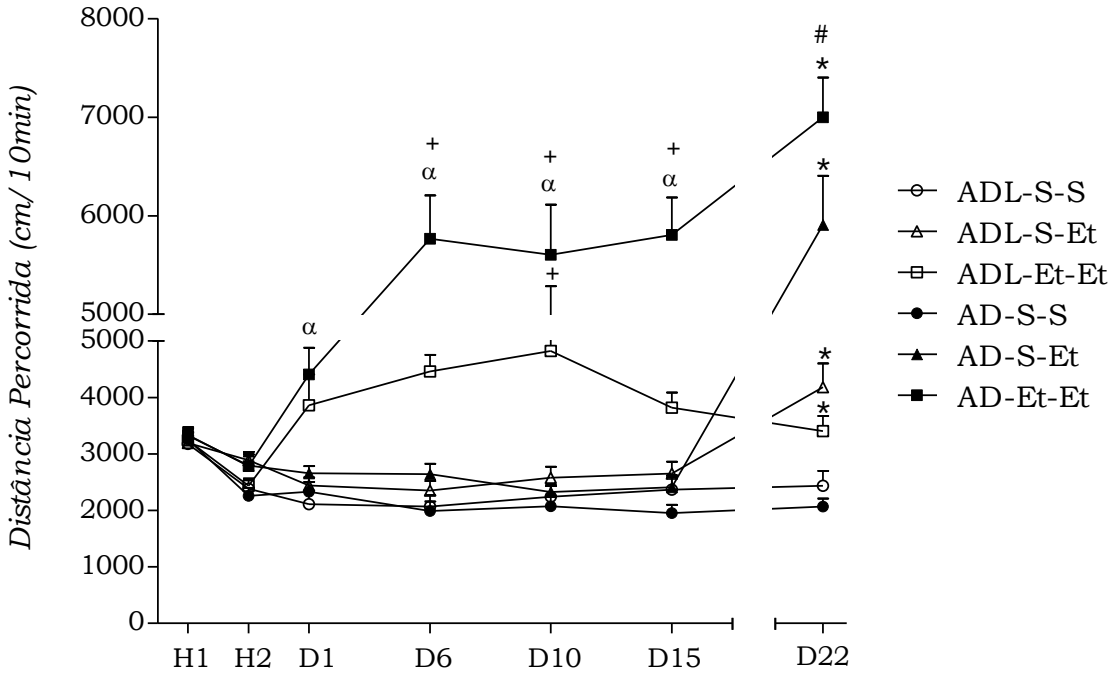


Figura 18. Efeitos da administração diária e repetida (D1 a D15) de etanol (2,0 g/kg) sobre a atividade locomotora de camundongos machos ADL e AD (n=14 a 17). Os dados foram analisados pela ANOVA-3 vias e os dados estão expressos em média ± erro padrão. +p < 0,01 em relação ao seu respectivo D1; αp < 0,05 em relação ao grupo ADL-Et-Et. Expressão da Sensibilização Comportamental (D22) após desafio com etanol seguido de uma semana de abstinência. Os dados foram analisados pela ANOVA–2 vias e estão expressos como média ± erro padrão. *p < 0,01, em relação ao seu respectivo grupo controle (S-S); #p < 0,05, em relação ao seu respectivo grupo agudo. AD S-S (adulto controle); AD S-Et (adulto etanol agudo); AD Et-Et (adulto etanol crônico); ADL S-S (adolescente controle), ADL S-Et (adolescente etanol agudo), ADL Et-Et (adolescente etanol crônico).

4.2.2 Alcoolemia

A análise dos dados proveniente de amostras de sangue de animais ADL e AD no dia D22, submetidos ao protocolo de Expressão da Sensibilização Comportamental (*Figura 19*) e à eutanásia 15 min depois da última injeção, mostraram não haver diferenças significantes quanto à concentração de etanol entre os grupos ADL Et-Et (1,5 ± 0,3) e AD Et-Et (2,0 ± 0,2).

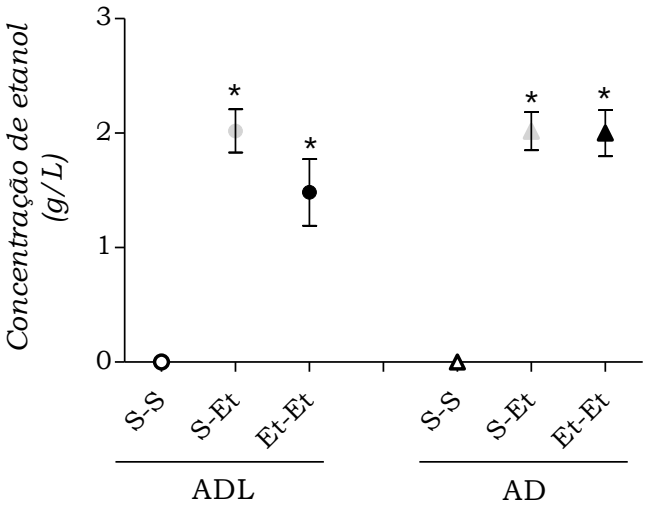


Figura 19. Alcoolemia de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD) no dia D22, após a última injeção de etanol (n=6). Os dados estão expressos como média ± erro padrão. *p < 0,001 em relação aos seus respectivos grupos controle (S-S) (ANOVA-2 vias, seguido de Newman-Keuls).

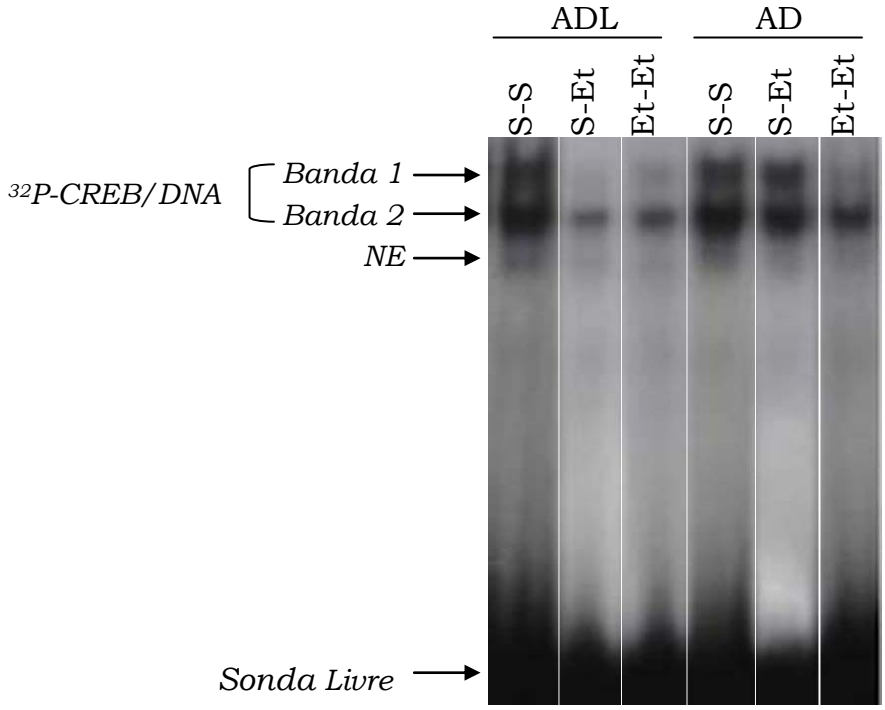
4.2.3 Ativação do CREB no CPF e HPC

A análise da Banda 1 referente ao CPF mostrou haver diferenças quanto à idade [$F_{(1,12)}$ = 72,60; p < 0,01] e ao tratamento [$F_{(2,12)}$ = 93,68; p < 0,01], bem como a interação idade x tratamento [$F_{(2,12)}$ = 34,35; p < 0,01] (Figura 20-**A.**). Observou-se que os tratamentos agudo e repetido com etanol levaram à diminuição da ativação do CREB nos grupos de animais ADL comparados ao seu respectivo grupo S-S e dos animais AD do grupo Et-Et em relação ao seu grupo controle S-S, sendo essa diminuição mais pronunciada nos animais do grupo ADL (Figura 20-**B.**). Além disso, animais ADL dos grupos S-Et e Et-Et apresentaram diminuição mais proeminente dessa ligação quando comparado aos respectivos grupos de AD.

Em relação à Banda 2, os resultados foram semelhantes aos da Banda 1, mostrando novamente haver diferenças quanto à idade [$F_{(1,12)}$ = 88,48; p < 0,01] e ao tratamento [$F_{(2,12)}$ = 103,99; p < 0,01], bem como a interação idade x tratamento [$F_{(2,12)}$ = 33,88; p < 0,01] (*Figura 20*-**B.**). Além das diferenças descritas anteriormente, os animais ADL do grupo Et-Et apresentaram diferença significante em relação ao seu respectivo grupo S-Et.

No HPC, tanto o tratamento agudo quanto repetido com etanol levaram à redução da ativação do CREB nos animais ADL e AD referentes às Bandas 1 e 2, evidenciando o efeito da idade [Banda 1: $F_{(1,12)} = 24,34$; $p < 0,001$; Banda 2: $F_{(1,12)} = 12,28$; $p < 0,01$], do tratamento [Banda 1: $F_{(1,12)} = 53,07$; $p < 0,001$; Banda 2: $F_{(1,12)} = 59,34$; $p < 0,001$], bem como interação entre esses dois fatores [Banda 1: $F_{(1,12)} = 6$; $p < 0,05$; Banda 2: $F_{(1,12)} = 6,65$; $p < 0,05$] (*Figura 21*-**A.**). No entanto, ao contrário do que foi observado no CPF, a redução da ativação do CREB após o tratamento com etanol, foi mais pronunciada nos AD quando comparados aos ADL submetidos ao mesmo tratamento, para ambas as bandas mensuradas. Nos animais ADL a análise das duas bandas, sugere a recuperação na ligação DNA/CREB após tratamento crônico quando comparado ao seu respectivo grupo agudo (*Figura 21*-**B.**).

A.



B.

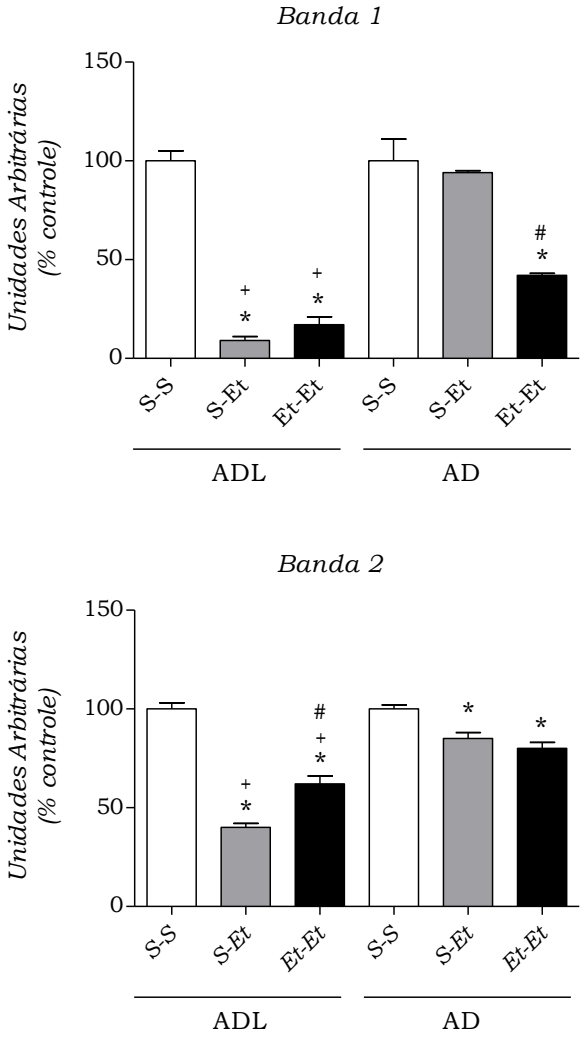
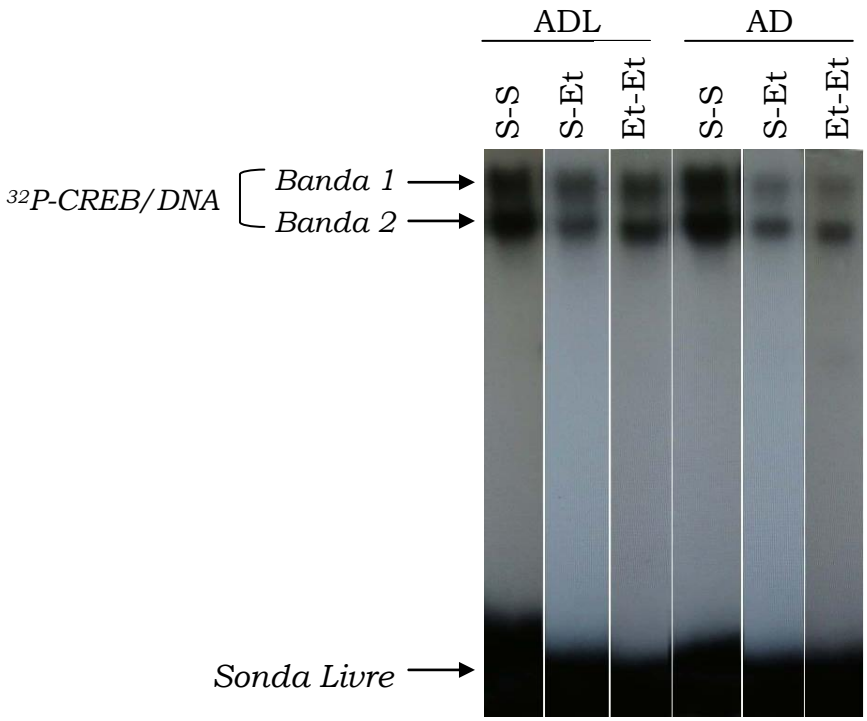
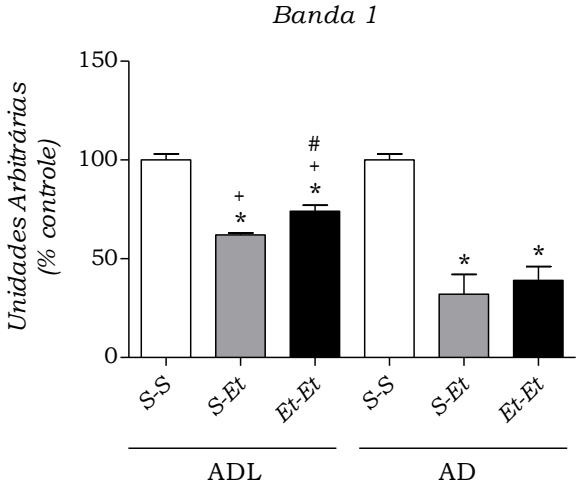


Figura 20. **A.** Efeito do tratamento agudo e repetido com etanol (2,0 g/kg) sobre a ativação do CREB no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD). Extrato nuclear (15 µg) do CPF de animais (n=11 a 18) submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental; S-S (grupo controle), S-Et (grupo etanol agudo) e Et-Et (grupo etanol crônico). A posição dos complexos DNA/CREB, designados como Banda 1 e 2, e da sonda livre estão indicados pelas setas. **B.** Análise densitométrica das Bandas 1 e 2. Os dados correspondem às médias das porcentagens em relação ao grupo controle referente a cada idade ± erro padrão (n=4) de um único experimento. *p < 0,01 em relação ao seu respectivo grupo S-S; +p < 0,01 em relação respectivo grupo de tratamento dos animais adultos; #p < 0,01 em relação ao seu respectivo grupo S-Et (ANOVA-2 vias, seguido de Newman-Keuls).

A.


ADL
AD
S-S
S-Et
Et-Et
S-S
S-Et
Et-Et
32P-CREB/DNA
Banda 1
Banda 2
Sonda Livre

B.


Banda 1
Unidades Arbitrárias
(% controle)
150
100
50
0
+
*
#
+
*
*
*
S-S
S-Et
Et-Et
S-S
S-Et
Et-Et
ADL
AD

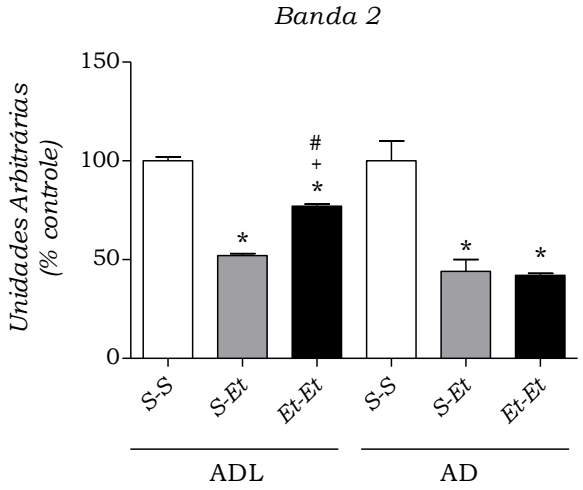


Figura 21. **A.** Efeito do tratamento agudo e repetido com etanol (2,0 g/kg) sobre a ativação do CREB no Hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD). Extrato nuclear (15 µg) do HPC de animais (n=11 a 18) submetidos ao protocolo da Sensibilização Comportamental; S-S (grupo controle), S-Et (grupo etanol agudo) e Et-Et (grupo etanol crônico). A posição dos complexos DNA/CREB, designados como Banda 1 e 2, e da sonda livre estão indicados pelas setas. **B.** Análise densitométrica das Bandas 1 e 2. Os dados correspondem às médias das porcentagens em relação ao grupo controle referente a cada idade ± erro padrão (n=4) de um único experimento. *$p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo S-S, +$p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo de tratamento dos animais adultos, #$p < 0,01$ em relação ao seu respectivo grupo S-Et (ANOVA-2 vias, seguido de Newman-Keuls).

4.2.4 Razão entre níveis proteicos de pCREB/CREB no CPF e HPC

A análise dos dados mostrou haver efeito do tratamento [$F_{(2,12)} = 5,75$; $p < 0,05$]. A *Figura 22* referente à razão pCREB/CREB na região do CPF de ADL mostrou que o tratamento agudo (S-Et) com etanol levou ao aumento nos níveis de pCREB quando comparado ao seu respectivo grupo controle (S-S). Os AD, por sua vez, apresentaram tendência ao aumento após tratamento com etanol.

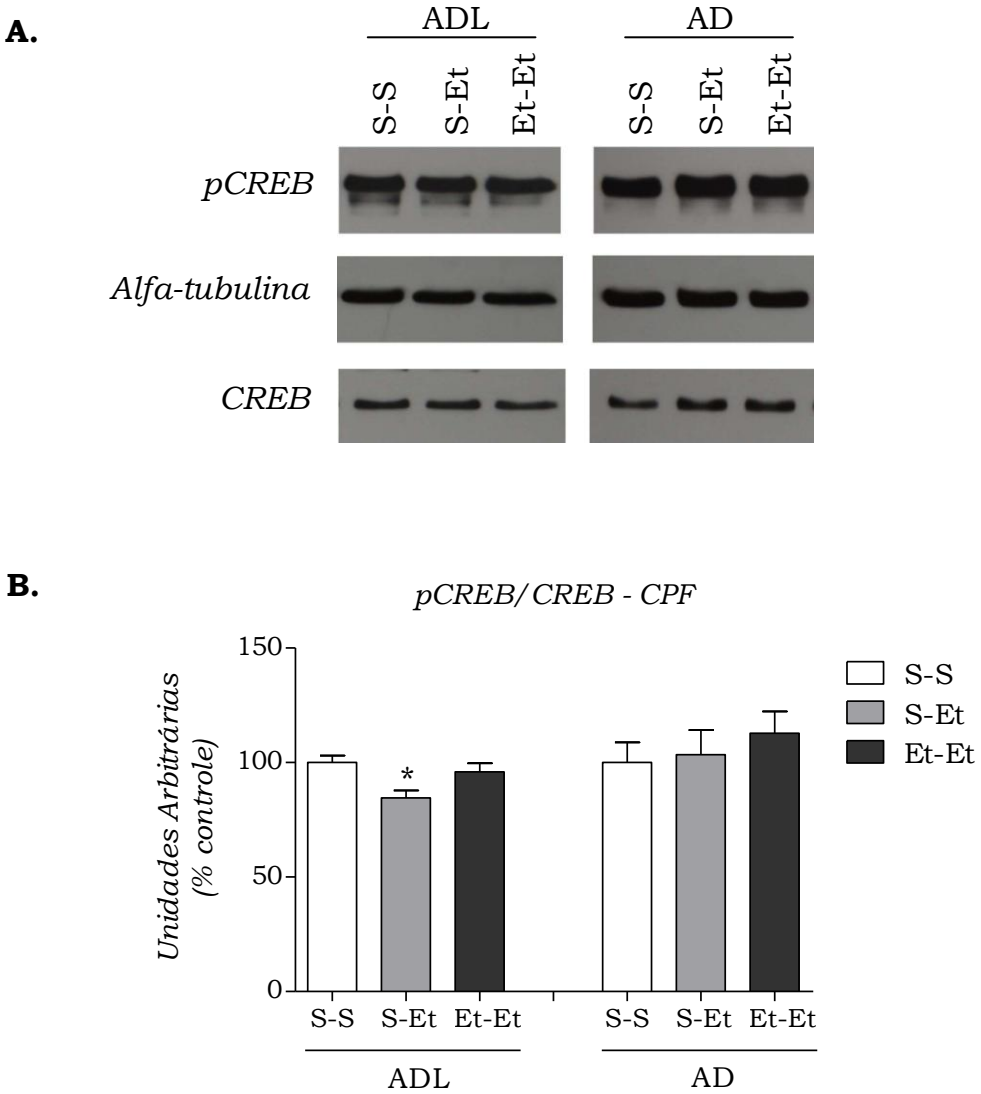


Figura 22. **A.** Determinação da razão proteica pCREB/CREB no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD), submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental. S-S (grupo controle), S-Et (grupo agudo) e Et-Et (grupo crônico). **B.** Análise densitométrica das bandas. Os dados correspondem às médias das porcentagens em relação ao grupo controle referente a cada idade ± erro padrão (n=5) de um único experimento. $*p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo S-S (ANOVA-1 via seguido de Newman-Keuls).

Em relação aos níveis proteicos de pCREB/CREB no HPC, observou-se que o tratamento agudo com etanol levou à diminuição nos níveis de pCREB nos AD, quando comparado aos seu respectivo grupos controle (S-S) (*Figura 23*). Nos animais ADL não houve diferença significante.

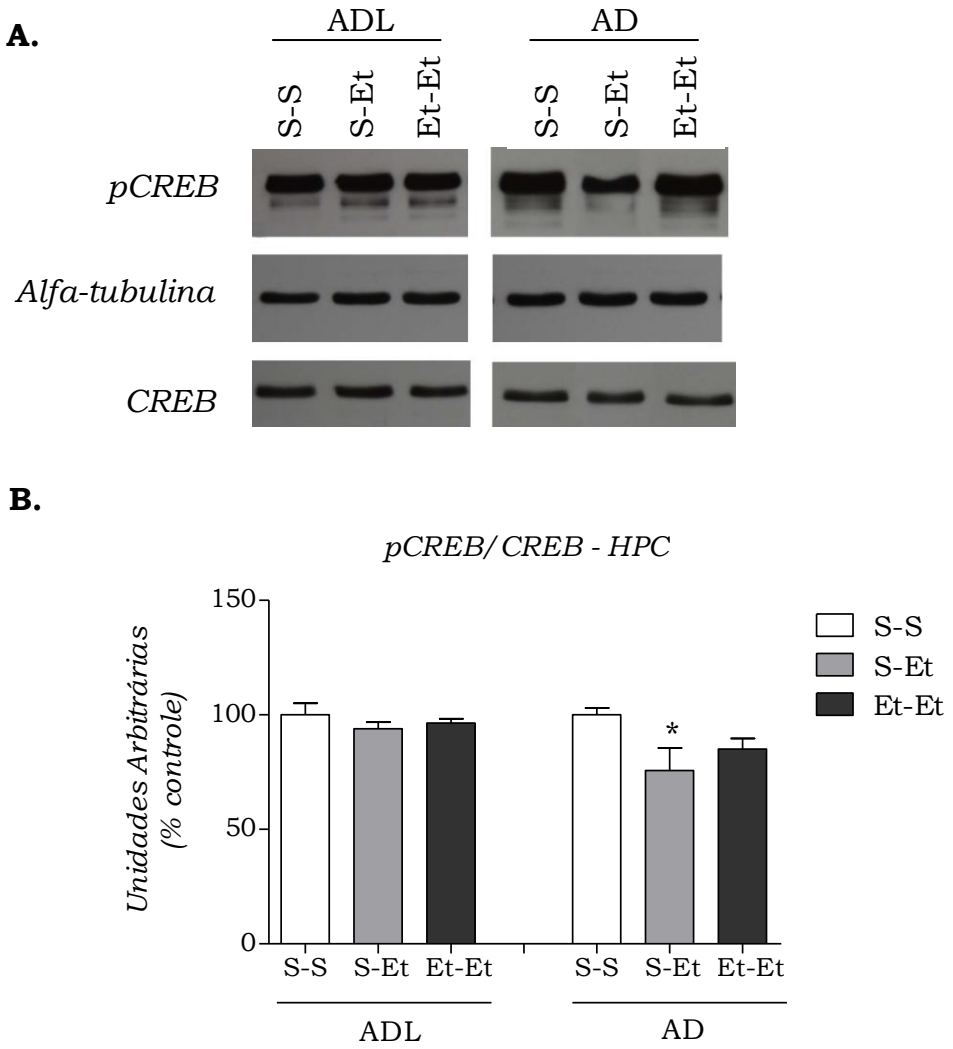


Figura 23. **A.** Determinação dos níveis de pCREB/CREB no Hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD), submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental. S-S (grupo controle), S-Et (grupo agudo) e Et-Et (grupo crônico). **B.** Análise densitométrica das bandas. Os dados correspondem às médias das porcentagens em relação ao grupo controle referente a cada idade ± erro padrão (n=5) de um único experimento. $*p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo S-S (ANOVA-1 via seguido de Newman-Keuls).

4.2.5 Imunorreatividade de pCREB no CPFm

As diferenças ontogênicas encontradas na ativação do CREB na região do CPF, pelo método de EMSA, forneceu subsídios para a avaliação da marcação do CREB na sua forma fosforilada nas sub-regiões do CPF, por meio da técnica de imuno-histoquímica.

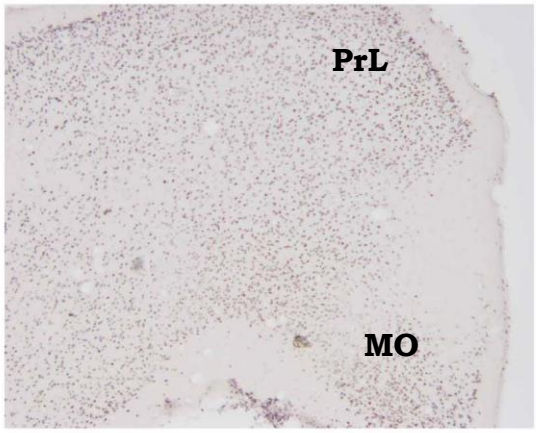
A análise dos núcleos marcados na região do Córtex pré-límbico (PrL), após ensaio com anticorpo específico para pCREB (*Figura 24*), mostrou haver diferenças quanto ao tratamento [$F_{(1,29)} = 5,67$; $p < 0,05$], idade [$F_{(2,29)} = 72,21$; $p < 0,01$], bem como a interação entre esses dois fatores [$F_{(2,29)} = 3,97$; $p < 0,05$]. A análise da relação de núcleos marcados/área (mm^2) (*Figura 24*) permitiu observar que tanto animais ADL quanto AD apresentaram diminuição nos níveis de pCREB na região pré-límbica após dose aguda de etanol e aumento após tratamento contínuo. Além disso, foram encontrados níveis maiores de pCREB nos animais ADL S-S quando comparados aos AD S-S.

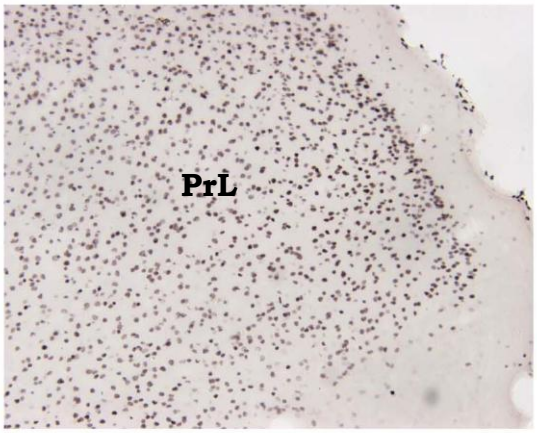
Em relação à região do Córtex medial orbital (MO), foi observada diminuição nos níveis de pCREB após tratamento agudo em ADL e AD, sendo que nesse último não foi possível observar nenhum núcleo marcado. O tratamento repetido com etanol, por sua vez, suprimiu os níveis de pCREB em ambas as idades (*Figura 24*).

ADL

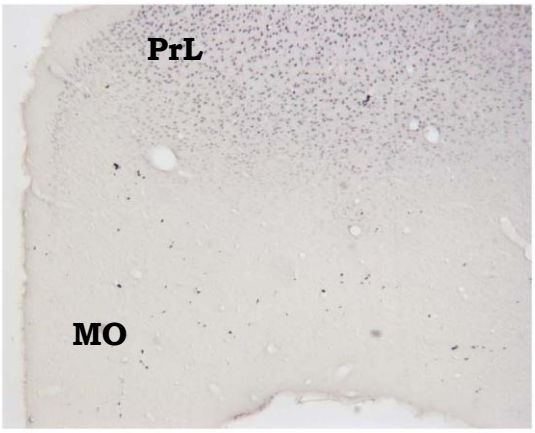
5x **10x**

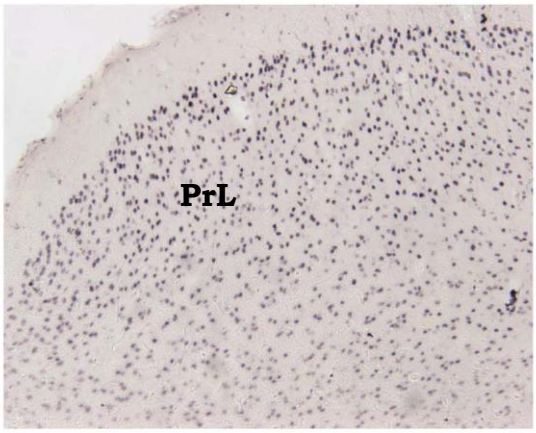
S-S



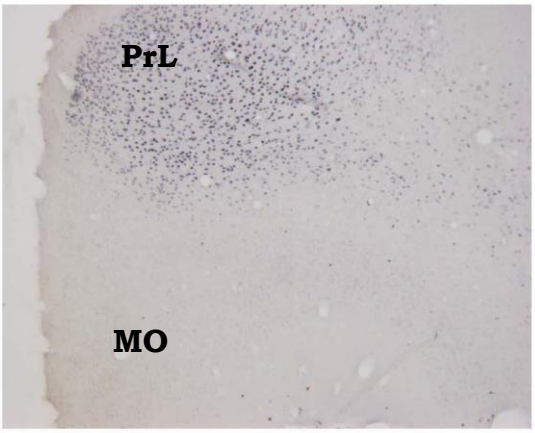


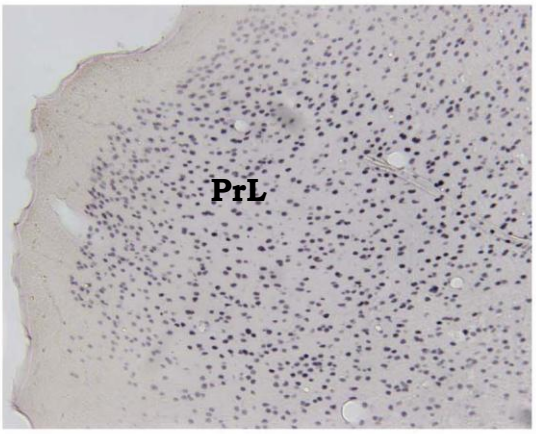
S-Et





Et-Et

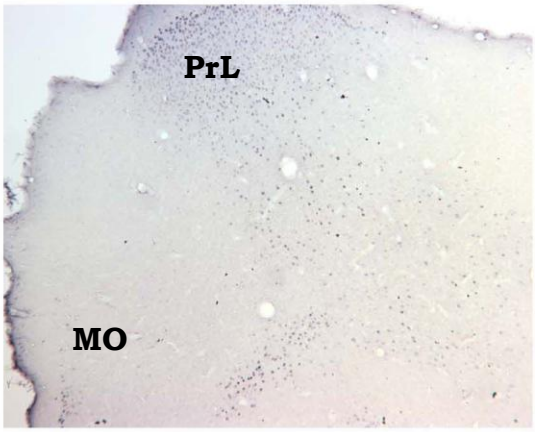


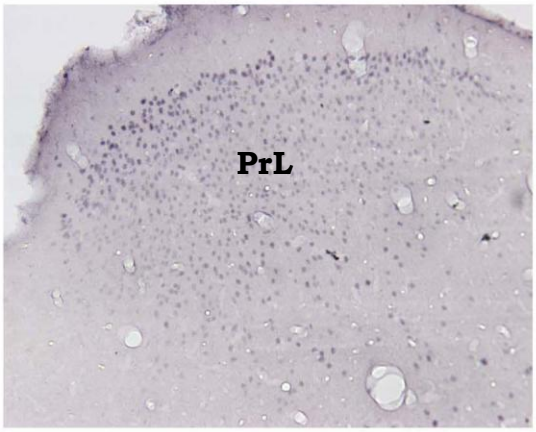


AD

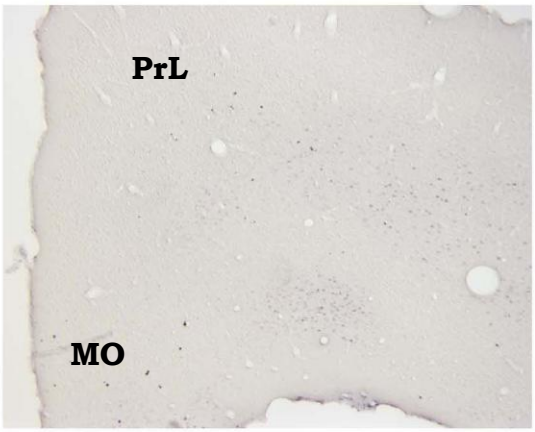
5x **10x**

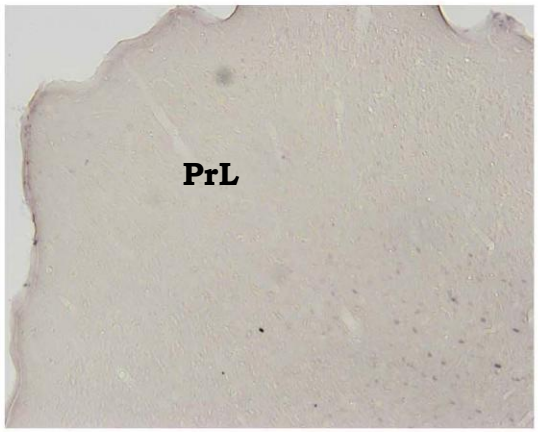
S-S



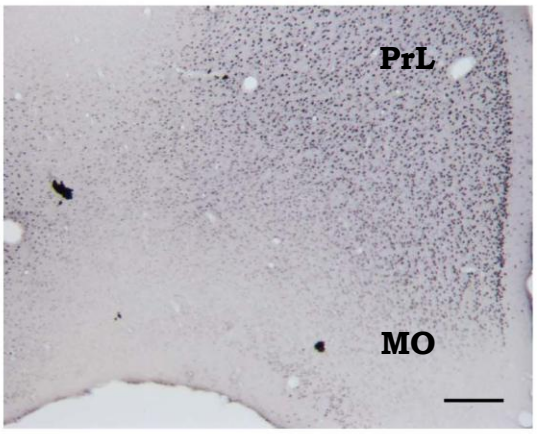


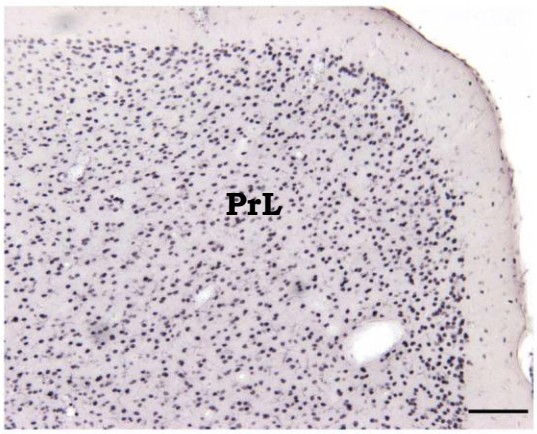
S-Et





Et-Et





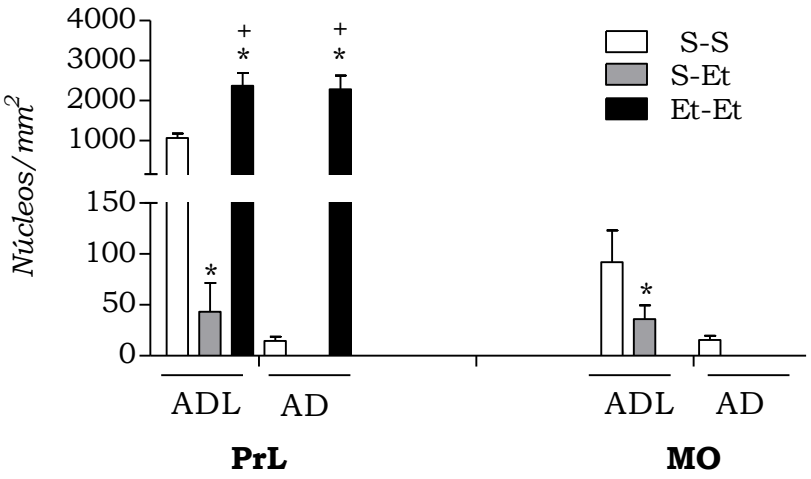


Figura 24. Imunorreatividade do fator de transcrição CREB na sua forma fosforilada no córtex pré-límbico (PrL) e medial orbital (MO) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD) submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental. Fotomicrografias de campo claro (2,8 mm com referência ao Bregma) nos aumentos de 5x e 10x dos grupos S-S (controle salina), S-Et (etanol agudo) e Et-Et (etanol crônico). Gráfico de contagem de núcleos/mm^2 ± erro padrão e n=3 áreas/grupo. PrL, Córtex pré-límbico; MO, Córtex medial orbital. *p < 0,01 comparado aos seus respectivos grupo S-S; +p < 0,01 em relação ao seu respectivo grupo S-Et (ANOVA-2 vias seguido de Newman-Keuls). Barra: 5x - 400 µm, 10x – 200 µm.

4.2.6 Níveis de BDNF avaliados por ELISA no CPF e no HPC

A *Figura 25* mostra os níveis de BDNF (ng/mg de proteína) no CPF após tratamento com salina, etanol agudo ou etanol repetido em camundongos ADL e AD.

A ANOVA-2 vias mostrou haver somente efeito do tratamento [$F_{(2,27)}$ = 16,83; p < 0,001]. A administração aguda (S-Et) e repetida (Et-Et) de etanol aumentou os níveis de BDNF nos animais ADL e AD, quando comparados aos seus respectivos grupos controle (S-S). No entanto, foi verificada diminuição dos níveis de BDNF no grupo Et-Et em relação ao S-Et de ADL.

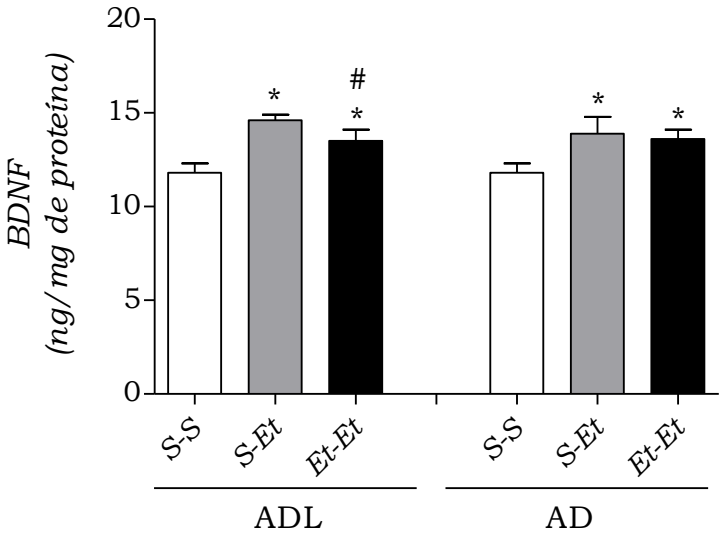


Figura 25. Determinação dos níveis de BDNF no Córtex pré-frontal (CPF) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD), submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental. S-S (grupo controle), S-Et (grupo agudo) e Et-Et (grupo crônico). *p < 0,05 em relação ao seu respectivo grupo S-S; #p < 0,05 em relação ao seu respectivo grupo S-Et (ANOVA-2 vias seguido de Newman-Keuls).

A *Figura 26* mostra os níveis de BDNF (ng/mg de proteína) no HPC de camundongos ADL e AD tratados com salina (S-S), etanol agudo (S-Et) ou etanol repetido (Et-Et).

A ANOVA-2 vias mostrou haver efeito da idade [$F_{(1,26)}$ = 8,17; p < 0,01], do tratamento [$F_{(2,26)}$ = 4,13; p < 0,05], bem como a interação idade x tratamento [$F_{(2,26)}$ = 9,70; p < 0,01]. Somente a administração repetida (Et-Et) de etanol aumentou os níveis de BDNF nos animais AD, quando comparados ao seu respectivo grupo controle (S-S) e agudo (S-Et). Nos animais ADL não foi possível observar diferenças significantes após tratamento com etanol.

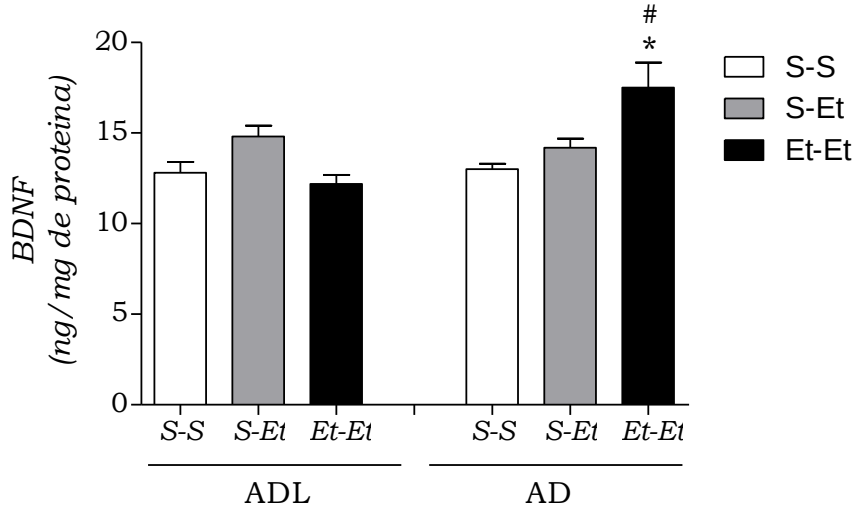


Figura 26. Determinação dos níveis de BDNF no Hipocampo (HPC) de camundongos adolescentes (ADL) e adultos (AD), submetidos ao protocolo de Sensibilização Comportamental. S-S (grupo controle), S-Et (grupo agudo) e Et-Et (grupo crônico). *$p < 0,01$ em relação ao seu respectivo grupo S-S; #$p < 0,01$ em relação ao seu respectivo grupo S-Et (ANOVA-2 vias seguido de Newman-Keuls).

O resumo dos resultados obtidos no presente relatório encontra-se descritos na Tabela 3:

Tabela 3 - Resumo dos resultados obtidos em relação ao respectivo controle

		CPF		**HPC**	
		ADL	AD	ADL	AD
AGUDO	DNA/CREB	↓↓↓	↓	↓↓	↓↓
	BDNF	↑	↑	NA	NA
	pCREB (CPFm)	↓↓↓	↓		
	pCREB/CREB	↓	NA	NA	↓
CRÔNICO	DNA/CREB	↓↓	↓	↓	↓↓
	BDNF	↓	NA	NA	↑
	pCREB (CPFm)	↑	↑↑↑		
	pCREB/CREB	NA	NA	NA	NA

5 DISCUSSÃO

O presente estudo confirmou dados anteriores observados na literatura (MASUR e BOERNGEN, 1980; CAMARINI et al., 1995, 2000a,b), de que a administração repetida de baixas doses de etanol (2,0 g/kg) induz o desenvolvimento da sensibilização locomotora em camundongos AD.

Os resultados referentes ao tratamento crônico com etanol (2,0 g/kg) confirmam a hipótese inicial, bem como corroboram dados da literatura, de que existem diferenças ontogênicas quanto ao parâmetro locomotor, no qual os animais tratados durante o período da adolescência não desenvolveram sensibilização locomotora (FARIA et al., 2008) enquanto os animais tratados durante a fase adulta desenvolveram (MASUR e BOERNGEN, 1980; MASUR e SANTOS, 1988; CAMARINI et al., 1995, 2000a,b). O efeito de sensibilização em animais ADL foi demonstrado somente com a administração de doses mais altas de etanol (2,5 g/kg) (STEVENSON et al., 2008). Dados de nosso laboratório corroboram os resultados de Stevenson et al. (2008), onde foi observado aumento gradual da locomoção em animais AD (com doses entre 1,8 e 2,4 g/kg) e um aumento evidente apenas na dose mais alta nos ADL. A literatura tem mostrado que roedores adolescentes são mais ou menos sensíveis do que os adultos ao etanol, dependendo do comportamento avaliado. Tem sido proposto que essa diferença quanto à sensibilidade, poderia delinear a propensão ao consumo de etanol durante a adolescência, levando ao alcoolismo na vida adulta (SPEAR e VARLINSKAYA, 2005).

Estudos conduzidos em animais adolescentes têm evidenciado que estes apresentam menor sensibilidade a efeitos aversivos induzidos pelo etanol (prejuízo motor, ansiedade, prejuízo social, sedação e ressaca), os quais normalmente limitariam o consumo, bem como maior sensibilidade à facilitação social e estimulação do consumo (VARLINSKAYA e SPEAR, 2002). O consumo de doses cada vez maiores, nos sentido de obter os efeitos prazerosos induzidos pelo etanol, poderia aumentar a propensão ao consumo e o desenvolvimento mais acelerado da dependência, como observado em seres humanos (CLARK et al., 1998). Esse fato intensifica a

idéia de que indivíduos adolescentes apresentam intensificação no comportamento de procura por sensações recompensadoras.

No dia do desafio com etanol (D22), após uma semana de abstinência do tratamento com salina ou etanol realizado por 15 dias consecutivos, foi possível observar diferenças na locomoção dos animais AD submetidos ao tratamento repetido quando comparados ao seu respectivo grupo agudo. Entretanto, os ADL tratados repetidamente com etanol (grupo Et-Et) não apresentaram diferenças na atividade locomotora quando comparados ao seu grupo agudo (grupo S-Et). Por outro lado, partindo da prerrogativa de que os ADL desenvolvem tolerância condicionada, como já demonstrado em nosso laboratório (FARIA et al., 2008), se compararmos os dados do grupo ADL tratado repetidamente com etanol (3404,2 ± 267,6 cm) com seu respectivo grupo agudo (4181,8 ± 421,1 cm), pelo teste t-Student, é possível verificar redução da atividade locomotora, sugerindo tolerância aos efeitos estimulantes de baixas doses de etanol (2,0 g/kg). O desenvolvimento de tolerância pode sugerir que animais ADL necessitem maior quantidade da droga para atingir os efeitos excitatórios desejáveis, comparados aos AD.

As diferenças ontogênicas relativas à resposta aos efeitos estimulantes de baixas doses de etanol, também corroboram dados da literatura que mostram a baixa sensibilidade dos indivíduos adolescentes aos efeitos agudos e crônicos de drogas de abuso como cocaína, anfetamina e nicotina (SPEAR e BRICK, 1979; LAVIOLA et al., 1995; ADRIANI et al., 1998; BOLANOS et al., 1998; LAVIOLA et al., 2001). De fato, animais ADL tratados com anfetamina mostraram um perfil de sensibilização característico, no qual apresentaram sensibilização aos efeitos positivos (recompensa) e tolerância aos efeitos aversivos, quando comparados ao grupo AD (TIRELLI et al., 2003).

A sensibilização comportamental é proposta como um dos mecanismos adjacentes à dependência, visto que efeitos recompensadores e estimulação locomotora parecem ser dependentes, pelo menos em parte, da ativação do sistema dopaminérgico mesolímbico. Em relação ao etanol, tem sido observado que a administração aguda ou repetida dessa substância leva ao aumento da neurotransmissão dopaminérgica (DI CHIARA e IMPERATO,

1985, 1988), bem como parece envolver a supersensibilidade das respostas mediadas por receptores do tipo D1 (ROBINSON e BERRIDGE, 2001). No presente estudo verificamos a sensibilização locomotora de animais AD, mas não dos animais ADL tratados repetidamente com etanol. Essa sensibilização parece ser mediada principalmente pela ação da DA nos receptores do tipo D1, visto que a intervenção farmacológica por meio da administração de antagonista D1, em animais AD, preveniu esse fenômeno (CAMARINI et al., 2010).

Alterações no desenvolvimento mesocorticolímbico podem ter relevância funcional para o adolescente, visto que essas regiões compõem parte do circuito envolvido com processos de recompensa a drogas, atribuindo valor apetitivo ou saliência do incentivo ao estímulo apresentado, traduzindo estímulo motivacional em comportamentos adaptativos, e integrando sistemas sensoriais e motores para facilitar a resposta. É descrito na literatura, tanto em humanos como em animais, o aumento na expressão seguido pela redução de receptores dopaminérgicos durante a adolescência. Essas alterações foram observadas na região do NAc (estriado ventral), no qual foi verificado aumento na expressão de receptores do tipo D1 (SPEAR, 2000). Visto que o NAc é conhecido como uma região de interface entre os sistemas motores e límbicos, ele pode influenciar os processamentos corticais. Segundo modelo proposto por Casey et al. (2008), a adolescência é caracterizada pelo desenvolvimento tardio do CPF, sendo o NAc, primeiramente modelado, o que pode ser relacionado ao aumento dos comportamentos de risco e motivação, com baixa capacidade de controle da tomada de decisões.

Evidências sugerem que a ação dopaminérgica no CPFm exerceria efeito antagônico sobre o NAc, ou seja, enquanto a DA no NAc está positivamente correlacionada com a resposta comportamental (atividade locomotora), no CPFm essa correlação seria negativa. Isso se deve a estudos em que o bloqueio da atividade dopaminérgica no CPFm resultou na facilitação da atividade dopaminérgica no NAc e no aumento da resposta comportamental. Além disso, sugere-se que a presença de DA no CPFm exerceria feedback negativo, reduzindo resposta aos efeitos aversivos

(estresse) bem como a recompensa a estímulos naturais (TZSCHENTKE e SCHMIDT, 2000). Levando-se em consideração que o CPF está sob intensa maturação no período da adolescência, sugere-se que a ausência da sensibilização nos animais ADL possa estar vinculada, em parte, à ação repressora da transmissão dopaminérgica no CPF sobre o NAc, que é característica dessa fase do desenvolvimento, diminuindo assim o efeito de recompensa de baixas doses de etanol.

Tem sido proposto na literatura que a disfunção cortical seria responsável tanto pela impulsividade quanto pelo alto risco de dependência a drogas de abuso. Visto que projeções glutamatérgicas provindas do CPF ao NAc e AVTM influenciam a liberação de DA, disparos neuronais e processos de neuroplasticidade no NAc, sugere-se que o CPF esteja envolvido com a representação, execução e a inibição dos comportamentos motivacionais. O comprometimento do CPF ou das suas eferências ao NAc poderia alterar uma variedade de representações de opções de impulsos motivacionais, alterar o padrão de resposta de grupos neuronais do NAc quanto ao sinal de "disparo" induzido pelo influxo de DA, resultando numa grande possibilidade de aprovação de impulsos motivacionais específicos e/ou prejudicar processos neuroplásticos no NAc que poderiam normalmente diminuir o vigor de impulsos motivacionais ditos inapropriados por experiências prévias. Dessa forma, o prejuízo na capacidade do CPF exercer sua função poderia levar ao aumento da probabilidade na execução de impulsos motivacionais inapropriados, tido clinicamente como impulsividade, Portanto, esse prejuízo quanto à inibição do sistema motivacional na presença de motivação robusta, poderia aumentar a impulsividade e o risco de dependência. Além disso, alterações na neuroplasticidade durante a adolescência associadas a essa condição poderiam intensificar a vulnerabilidade à dependência (CHAMBERS; TAYLOR; POTENZA, 2003).

Alterações na circuitaria motivacional durante a adolescência poderiam promover comportamentos de busca e processos motivacionais associados ao incentivo, sugerindo que a experimentação na adolescência bem como a vulnerabilidade a drogas psicotrópicas envolve diferenças na

atividade e sensibilização do sistema dopaminérgico (CHAMBERS; TAYLOR; POTENZA, 2003).

O comprometimento do CPF ou das aferências enviadas ao NAc poderia alterar o padrão de disparo de grupos neuronais no NAc relacionados à motivação e alterar o padrão de resposta quanto ao sinal de ação ("executar uma ação") induzido pelo influxo de DA, resultando numa grande possibilidade de aprovação de motivações particulares e/ou prejudicar processos neuroplásticos no NAc que normalmente diminuiriam a intensidade das forças motivacionais consideradas inapropriadas por experiência prévia. Assim, o prejuízo no sistema de inibição do circuito motivacional, na presença de forte estímulo motivacional, pode frequentemente aumentar a impulsividade e o risco de distúrbios relacionados a drogas de abuso. Mudanças no desenvolvimento neural durante a adolescência poderiam gerar intensificação da vulnerabilidade à adição (CHAMBERS; TAYLOR; POTENZA, 2003). Uma vez que a inibição controlada da motivação seja importante para o direcionamento de ações que sejam essenciais para a sobrevivência do indivíduo, o processo de maturação encefálica que ocorre na adolescência poderia reduzir essa capacidade de interrupção de ações desnecessárias, maximizando as motivações associadas ao sistema dopaminérgico, aumentando ações moduladas pela impulsividade.

O CPF é proeminentemente remodelado durante a adolescência em várias espécies, com declínio de seu volume. Ocorre substancial eliminação de sinapses, provavelmente glutamatérgicas. Em contrapartida, as aferências dopaminérgicas ao CPF atingem picos de aumento na adolescência, tanto em primatas como em ratos. São observados aumentos tanto aumento na densidade de fibras dopaminérgicas como nas concentrações de dopamina (LEWIS, 1997; KALSBEEK et al., 1988; LESLIE et al., 1991). O aumento na densidade de receptores dopaminérgicos do tipo D1 e na liberação de DA no CPF tem sido associado a uma redução na sinalização dopaminérgica no Nac (TZSCHENTKE e SCHMIDT, 2000). Portanto, as alterações neuroquímicas e neuroanatômicas no CPF durante a adolescência podem alterar as repostas locomotoras às drogas de abuso.

Neste sentido, os resultados do presente estudo sugerem que a menor sensibilidade dos animais ADL aos efeitos estimulantes do etanol pode ser resultado das mudanças acima descritas.

Em relação ao circuito motivacional secundário (descrito na introdução) foi verificada sua influência nas respostas mediadas pelo sistema motivacional primário vinculado ao sistema dopaminérgico. O HPC, responsável pela representação contextual de um estímulo, ao identificar um estímulo como "novo", o compara ao contexto ambiental por meio de memórias passadas. A informação resultante desse processo pode ser codificada em estímulo motivacional pela regulação por parte do HPC da amplitude ou impacto da descarga de DA no NAc ou pela influência direta na atividade neuronal no NAc, visto que lesões hipocampais alteram a quantidade de DA liberada no NAc e no CPF, bem como respostas comportamentais a ambientes novos (LIPSKA et al., 1992; LIPSKA e WEINBERGER, 1995).

A tolerância aos efeitos estimulantes do etanol, observada entre os ADL, é um fenômeno dependente de condicionamento/aprendizagem, ou seja, dependente da associação dos efeitos da droga com o ambiente, uma vez que dados do laboratório (FARIA et al., 2008) mostraram que os ADL tratados com etanol, não expostos ao campo aberto, sensibilizaram. Dessa forma, a tolerância observada parece recrutar a participação de neurônios hipocampais.

Em relação aos estudos neuroquímicos, a utilização do método de EMSA teve como principal objetivo analisar a modulação de fatores de transcrição, como o CREB, que são um grupo de proteínas capazes de se ligar a sequências nucleotídicas específicas presentes nas regiões promotoras de alguns genes a fim de modular a transcrição gênica.

A análise dos géis de competição e supershift confirma que as Bandas 1 e 2 são específicas para o CREB, bem como sugere composição distinta dos dímeros que compõe cada banda. Frente a incubação das amostras com os anticorpos analisados e em vista do perfil de deslocamento e intensidade das bandas observadas, sugere-se que a Banda 1 seja um homodímero composto pelo elemento CREB, enquanto que a Banda 2 parece ser um

heterodímero composto por CREB e CREM, além de estarem fosforilados. Nesse sentido acredita-se que tenha sido possível observar CREB tanto na sua forma fosforilada quanto não fosforilada.

A administração aguda de etanol (Experimento I) induziu alterações na modulação do CREB ao longo do tempo, efeito observado tanto na Banda 1 quanto na Banda 2. Verificou-se uma redução marcante na ativação desse fator de transcrição no CPF. No HPC, foi verificado um efeito diferencial, com aumento na atividade deste fator de transcrição mais relacionado à Banda 2 nos intervalos de 1-3 horas e uma diminuição na Banda 1 no tempo de 6 horas após a injeção de etanol.

É conhecido que alguns genes podem ou não ser ativados pelo CREB dependendo, por exemplo, do tipo celular envolvido, da necessidade do requerimento de outros fatores de transcrição e co-fatores, além da viabilidade da cromatina à ativação por esse complexo. O aumento da interação DNA/CREB observada no HPC pode estar correlacionado ao aumento de c-FOS no HPC após tratamento agudo com etanol (NESTLER e AGHAJANIAN, 1997; FARIA et al., 2008). Entretanto, o gene *c-Fos* pode ser modulado por outras vias além da PKA-CREB (HERDEGEN e LEAH, 1998) e a quantidade de neurônios que contêm c-FOS não é necessariamente correlacionada com o aumento na fosforilação de CREB (TURGEON et al., 1997). Além disso, esse aumento no HPC pode estar associado à capacidade das drogas de abuso em alterar, mesmo quando administradas agudamente, processos de modulação de aprendizagem e memória, segundo a hipótese de que a dependência envolve processos de aprendizagem associados à recompensa (HYMAN et al., 2006) e que a ativação de CREB nesses sítios de motivação pode delinear traços da dependência observados na clínica.

A análise da ativação do CREB proveniente do estudo crônico com etanol mostrou que animais ADL e AD tratados previamente com salina apresentaram diminuição na ligação DNA/CREB após desafio com etanol tanto no CPF quanto no HPC. Entretanto, notou-se uma sensibilidade diferencial aos efeitos induzidos pelo etanol agudo entre ADL e AD, dependentes da região encefálica, em que animais ADL apresentaram

diminuição mais pronunciada na ativação do CREB no CPF, enquanto nos animais AD essa redução foi maior no HPC.

Após tratamento repetido com etanol, o perfil de ligação nas estruturas estudadas foi semelhante para ambas as idades. Animais ADL, os quais não desenvolveram sensibilização comportamental aos efeitos estimulantes de baixas doses de etanol, apresentaram um efeito de recuperação na ligação DNA/CREB no CPF e no HPC quando comparado ao seu respectivo grupo agudo (S-Et), porém esse efeito foi maior no HPC. Ao contrário do perfil observado para os ADL, os animais AD, os quais sensibilizaram aos efeitos estimulantes do etanol, apresentaram níveis de ligação DNA/CREB semelhantes ao do seu respectivo grupo agudo tratado previamente com salina, sendo essa ligação maior na região do CPF quando comparado ao HPC.

A utilização do método de Western blot teve como principal objetivo analisar os níveis proteicos de pCREB e CREB afim de validar os dados obtidos no ensaio de EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Em razão da hipótese incial de que as diferenças na ativação do CREB estariam associadas à redução na quantidade de pCREB e CREB disponíveis, foi utilizada a ANOVA de 1 via para cada idade. Após a análise dos níveis de CREB na sua forma não-ativa (CREB) e ativa (forma fosforilada – pCREB) pelo método de Western blot, verificou-se que o perfil de resposta desse fator de transcrição no CPF e HPC foi semelhante ao encontrado no ensaio de EMSA. Foi encontrada diferença significante apenas no grupo agudo em relação ao seu respectivo grupo controle, no CPF de ADL. Em relação ao HPC, essa redução nos níveis de pCREB foi maior e significante nos animais AD. Após tratamento repetido com etanol foi observada tendência à recuperação nos níveis de pCREB no CPF dos animais ADL e no HPC dos animais AD, semelhante ao observado na ligação DNA/CREB.

O pareamento entre os resultados obtidos pelos métodos de EMSA e de Western blot mostrou haver uma tendência a complementaridade quanto à resposta mostrada pelos dois ensaios para o fator de transcrição CREB. Ambas as técnicas permitem obter uma avaliação quantitativa do CREB tanto na sua forma dimérica e fosforilada mostrada pelo EMSA quanto na

quantidade total de proteína disponível na forma não-ativa (CREB) e ativa (pCREB). Dessa forma, pudemos hipotetizar que a redução na quantidade de CREB na sua forma dimérica e fosforilada, observada por meio do ensaio de EMSA, principalmente no CPF de animais ADL e no HPC dos animais AD, após tratamento agudo e crônico com etanol, pode ser devido à tendência à redução na quantidade de pCREB disponível demonstrado pelo ensaio de Western blot.

É importante ressaltar que a resposta comportamental diferencial entre camundongos ADL e AD tratados repetidamente com etanol parece estar correlacionada com a diferença na ativação do CREB entre CPF e HPC desses animais, e não a diferenças na metabolização do etanol, visto que não foram observadas diferenças entre as idades nos níveis plasmáticos de etanol.

Essa resposta diferencial, dependente da estrutura estudada, também foi observada em estudos prévios que mostraram que animais ADL, os quais não sensibilizaram aos efeitos estimulantes de baixas doses de etanol, apresentaram diminuição nos níveis de c-FOS no CPF e aumento no HPC, ao contrário dos animais AD sensibilizados, que apresentaram níveis mais altos no CPF e redução no HPC (FARIA et al., 2008). Pelo fato dos genes "imediatos" *c-Fos* e *Egr-1* serem regulados pelo CREB, e diante da relação positiva entre os níveis dos produtos desses genes e a ativação do CREB observada nos animais tratados repetidamente com etanol, sugere-se a participação do CREB na modulação de c-FOS no modelo neuroadaptativo utilizado. Esses dados corroboram dados da literatura, no qual foi observada diminuição da ligação DNA/CREB no estriado de ratos e em células granulares do cerebelo após tratamento repetido com etanol (YANG et al., 1998a,b). De fato, o tratamento repetido com etanol é capaz de diminuir a atividade da adenilil ciclase (AC), proteína kinase A (PKA) e proteína Gs (estimulatórias da via do AMPc), alem de aumentar a expressão de proteínas Gi (inibitórias da via do AMPc) bem como sua função no cérebro de ratos (VALVERIUS et al., 1989). Sendo a sinalização pelo AMPc-PKA uma das vias para fosforilação do CREB e portanto um dos passos para a sua ativação

como modulador da transcrição gênica, a redução na atividade dos fatores envolvidos nessa via poderia levar à redução na atividade do CREB.

Embora tenham sido utilizadas baixas doses de etanol, a diminuição da interação DNA/CREB no CPF dos animais ADL tratados repetidamente com etanol poderia estar associada a mudanças nas funções cognitivas desses animais. Dados da literatura mostraram que o etanol é capaz de reduzir os disparos neuronais do CPF *in vivo* (TU et al., 2007), afetando diversos comportamentos e respostas associadas com a função desses neurônios, como aprendizado, processamento de informações, memória de trabalho e detecção de erros, tanto em humanos como em roedores (MELCHIOR et al., 1993; MOSELHY et al., 2001; RIDDERINKHOF et al., 2002). Nos processos de atenção e memória de ratos, o CREB parece ter papel importante já que sua supressão funcional no CPFm leva à diminuição no desempenho desses animais nos testes de atenção (PAINE et al., 2009).

O presente estudo sugere que o etanol poderia dessensibilizar a via AMPc-PKA no CPF, levando à inibição da translocação de PKA do citosol para o núcleo celular, e portanto, diminuindo a ativação do CREB, ou seja, sua ligação à sequência CRE. Durante a adolescência, o CPF ainda encontra-se em processo de maturação. Esse processo é caracterizado pelo aumento da transmissão dopaminérgica associada ao aumento na densidade de receptores dopaminérgicos do tipo D1 e na liberação de DA nessa região, o que poderia intensificar a sinalização pela via dopaminérgica resultando na redução da atividade locomotora. Tem-se proposto que o aumento de DA no CPFm, reduz a sinalização dopaminérgica no NAc e consequentemente a atividade locomotora (TZSCHENTKE e SCHMIDT, 2000). É importante salientar que níveis diminuídos de CREB em algumas regiões encefálicas têm sido associados com aumento de consumo de etanol (PANDEY et al., 2005).

Um dos passos para modulação gênica mediada pelo CREB envolve a sua fosforilação no resíduo de Ser 133. Em relação à modulação de pCREB na região do PrL, o qual está associado a processos cognitivos e emocionais e que recebe dentre outras regiões, aferências provenientes da AVTM, animais ADL previamente tratados com salina e desafiados com etanol apresentaram

redução significante nos níveis de pCREB, porém com recuperação após tratamento repetido, apesar da diferença em relação ao seu respectivo grupo controle ser discreta. A hipótese sugerida para se explicar essa modulação, levando-se em consideração a presença dos fatores de transcrição CREB e CREM na composição dos dímeros de CREB no CPF e da interação entre eles, é de que agudamente, o etanol poderia levar a modulação da via do AMPc resultando na ativação dos fatores de transcrição CREB e CREM. Estes por sua vez, induziriam a produção das ICERs (repressores precoces induzidos pelo AMPc) as quais exerceriam uma regulação (feedback) negativa sobre a produção de CREB e CREM, reduzindo sua produção e fosforilação o que explica a redução nos níveis de pCREB encontrados. O etanol administrado repetidamente faria com que a célula perdesse a capacidade de desfosforilar esse fator de transcrição, aumentando os níveis de pCREB livres na célula. Apesar de o aumento nos níveis de pCREB observado após tratamento repetido com etanol, a ligação ao DNA (sequência CRE) estava reduzida. Isso pode ser explicado pelo fato das ICERs inibirem o CRE (ver *Figura 5*). Comparado aos animais ADL, os animais AD, apresentaram diminuição mais proeminente na quantidade de núcleos marcados para pCREB no PrL quando comparado ao seu respectivo grupo controle, após tratamento repetido com etanol. No entanto ao analisarmos a ligação DNA/CREB, por meio do método de EMSA, essa alteração foi mais discreta. Nesse sentido, levanta-se a hipótese de os ADL serem mais sensíveis a produção e/ou modulação das ICERs. Essa hipótese necessita ser investigada.

A região do MO, localizada na adjacência do córtex PrL, não apresentou modulação importante na marcação de pCREB tanto em ADL quanto em AD, frente ao tratamento repetido com etanol. Análises anatômicas que utilizaram como ferramenta injeções do traçador retrógrado fluorogold, mostraram que a região do MO envia eferências para todas as regiões do Córtex medial (AGm, AC, PrL e IL), porém com maior densidade para as regiões não límbicas (AGm e AC) (HOOVER e VERTES, 2007), o que explicaria em parte sua baixa responsividade ao tratamento com etanol.

Com relação à modulação gênica, sendo o gene do BDNF regulado pelo CREB (FINKBEINER et al., 1997), uma das hipóteses levantadas é a de que o prejuízo na ligação DNA/CREB, observada no presente trabalho, poderia resultar em alteração nos níveis de BDNF. O BDNF foi investigado devido à conhecida participação dessa proteína em comportamentos que permeiam a dependência a drogas de abuso (HALL et al., 2003; HORGER et al., 1999) incluindo o etanol (MCGOUGH et al., 2004; JEANBLANC et al., 2006). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram aumento dos níveis de BDNF no CPF de animais ADL e AD após uma injeção aguda de etanol. Entretanto, ocorreu uma redução na capacidade do etanol em aumentar os níveis de BDNF após administração repetida em ADL quando comparado ao seu grupo agudo (S-Et), mas esta ainda permaneceu elevada em relação ao seu grupo controle. Entretanto, nos AD, os níveis de BDNF se mantiveram altos independentemente do tratamento agudo ou repetido. Em relação ao HPC, foi observado aumento nos níveis de BDNF de animais AD após tratamento repetido com etanol. Nos animais ADL, não foi possível observar diferenças entre os tratamentos. Entretanto, uma análise estatística pelo teste t-Student mostrou que ADL-Et-Et (12,2 ± 0,5 ng/mg de proteína) apresentaram redução nos níveis de BDNF quando comparado ao seu grupo ADL-S-Et (14,8 ± 0,6 ng/mg de proteína). Dado o papel desta neurotrofina no controle do consumo de etanol, em que baixos níveis de BDNF têm sido associados ao aumento no consumo de etanol (MCGOUGH et al., 2004; PANDEY et al., 2004a,b; YAN et al., 2005; PRAKASH et al., 2008), os dados do presente estudo sugerem que a redução desta neurotrofina após tratamento repetido possa promover maior vulnerabilidade e aumento de consumo de etanol entre adolescentes com uma experiência prévia com a droga. Entretanto, ao comparar os dados do CREB com os níveis de BDNF observados nos animais ADL, em que foi observada redução na ativação de CREB e aumento dos níveis de BDNF após tratamento agudo e repetido com etanol a modulação do BDNF parece não estar associada ao CREB nas condições experimentais aplicadas no presente trabalho. Dados da literatura têm mostrado que o BDNF possui em torno de 7 regiões promotoras, podendo ser modulado por outros fatores de transcrição, como por exemplo,

o NF-kB, visto que a sinalização BDNF-p75 está relacionada à morte celular e apoptose, e quando ativada, pode resultar na modulação da expressão de NF-kB (CHAO, 2003). Dessa maneira, sugere-se a participação de outros fatores de transcrição na modulação de BDNF no modelo experimental utilizado.

Entretanto, apesar dos dados discrepantes em relação à modulação gênica do BDNF pelo CREB, os resultados obtidos neste estudo – diminuição de CREB e atenuação de BDNF após tratamento repetido com etanol no CPF de ADL – sugerem uma correlação destas alterações com maior consumo de etanol pelos ADL, comparados aos AD, como tem sido descrito na literatura (PASCUAL et al., 2009).

6 CONCLUSÕES

O presente projeto revelou os seguintes resultados:

- animais ADL não desenvolveram sensibilização aos efeitos estimulantes induzidos por uma dose baixa (2,0 g/kg) de etanol;

- a administração aguda e repetida de etanol diminuiu a interação DNA/CREB em ADL e AD, porém de forma mais pronunciada no CPF de ADL;

- a administração aguda de etanol reduziu os níveis proteicos de pCREB no CPF de animais ADL e no HPC de animais AD;

- os níveis basais de pCREB no PrL apresentaram-se mais altos em camundongos ADL comparados aos AD;

- a administração aguda de etanol diminuiu os níveis de pCREB no PrL de camundongos ADL e AD, enquanto a administração repetida aumentou a marcação;

- a administração aguda de etanol diminuiu os níveis de BDNF no CPF de camundongos ADL e AD. Comparado com a administração aguda, a administração repetida reduziu esses níveis em camundongos ADL, mas não em AD; no CPF e no HPC, a administração repetida levou ao aumento significativo de BDNF em AD;

Levando-se em consideração os dados levantados pela literatura, sugere-se o seguinte cenário: animais ADL quando expostos à administração repetida com etanol, desenvolvem tolerância locomotora (FARIA et al., 2008) ou não sensibilizam. Essa resposta, evidenciada pela redução na atividade locomotora, poderia refletir no fato de que o etanol na dose testada (doses baixas) estaria sendo menos recompensador para o animal e consequentemente, ele estaria mais suscetível ao aumento no consumo de etanol para potencializar a recompensa. Neuroquimicamente foi evidenciado que esses animais apresentaram redução na ativação do fator de transcrição CREB, bem como redução nos níveis de BDNF no Córtex pré-frontal. Essas observações corroboram com dados da literatura que tem mostrado que

níveis reduzidos de CREB na amígdala (PANDEY et al., 2005)e de BDNF no estriado dorsolateral (LOGRIP et al., 2009) tem sido associados ao aumento no consumo de etanol. Portanto, esse perfil neuroplástico observado poderia resultar na propensão ao desenvolvimento da dependência. Comparado aos adolescentes, a sensibilização apresentada pelos animais adultos poderia ser correlacionada com a redução em menor proporção na ativação de CREB no Córtex pré-frontal, porém sem alteração nos níveis de BDNF. Essa sensibilização que tem sido associada ao processo motivacional da saliência do incentivo, faria com que o animal "queira" mais a droga, mantendo assim o consumo de etanol mesmo após o período de abstinência (dados do Laboratório referente ao projeto de Doutorado de Priscila Carrara-Nascimento).

De fato, a maturação do SNC durante a adolescência é um fator importante para explicar a diversidade comportamental e neuroquímica encontrada nos dados apresentados nesse trabalho. A literatura tem mostrado que a região do Córtex pré-frontal passa por profundas modificações durante a adolescência, com diminuição do volume da área, modulação das sinapses que é caracterizada pelo aumento de aferências dopaminérgicas a essa região. Além disso, é descrita a redução gradual dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 no estriado de roedores até a fase adulta (SEEMAN et al., 1987). Dados provenientes de estudos realizados em ratos tratados agudamente com etanol mostraram que animais ADL apresentaram tolerância aos efeitos agudos do etanol, sugerindo, portanto, maior suscetibilidade de seu SNC em responder rapidamente a baixas doses de etanol com modulações compensatórias (VARLINSKAYA e SPEAR, 2006). Além disso, ratos jovens apresentam redução na sensibilidade aos efeitos aversivos induzidos pelo etanol, como pode ser aferido por meio das medidas de ataxia e sedação (menores nos ADL) e também maior consumo de etanol (g de etanol/kg) quando comparados aos AD (SPEAR e VARLINSKAYA, 2005).

As questões levantadas sobre a vulnerabilidade dos indivíduos adolescentes à dependência ao etanol poderiam contribuir para o delineamento de programas preventivos. Em relação ao comportamento de

risco na adolescência, pesquisas poderiam ser direcionadas ao desenvolvimento de contextos que promovam comportamentos de risco mais seguros, do que promover a eliminação do mesmo visto ser esse importante para a transição para a vida adulta. Dessa forma, o indivíduo adolescente poderia vivenciar estímulos novos e atrativos, porém sem vinculá-los às drogas, como por exemplo, a participação em programas de esportes radicais e desafios. Outro fator importante é a questão de fatores estressores exacerbarem a baixa sensibilidade de indivíduos adolescentes aos efeitos aversivos induzidos pelo etanol, elevando o comportamento ansioso, o que poderia direcionar ao consumo de álcool. Nesse sentido, se realça a importância da prevenção ou redução de fatores estressantes no contexto da adolescência, bem como aumentar a capacidade desses indivíduos em lidar com essas questões. E finalmente, advertir os adolescentes sobre a questão da menor sensibilidade aos efeitos tóxicos/aversivos ao etanol serem um sinal de vulnerabilidade quanto ao desenvolvimento de problemas relacionados à dependência.

Faz-se necessária uma mudança de idéias para que esses indivíduos reconheçam que a grande vulnerabilidade ao abuso reside frequentemente naqueles indivíduos que são relativamente resistentes aos efeitos deletérios associados ao álcool.

O presente estudo mostrou de forma clara a existência de diferenças comportamentais e moleculares entre animais ADL e AD na presença do etanol, droga de abuso legalizada para consumo no Brasil. A utilização da sensibilização comportamental permitiu mostrar que para animais ADL, baixas doses de etanol parecem ser menos recompensadoras, podendo induzir ao aumento do consumo para se obter algum efeito positivo. Portanto, o presente trabalho contribui para a construção do conhecimento sobre a plasticidade diferencial e dependente da idade do fator de transcrição CREB frente ao tratamento repetido com etanol. Outra questão relevante desta Tese foi a possibilidade de se caracterizar o dímero de CREB, como dois complexos de composição distintas, provavelmente um homodímero e um heterodímero, frente ao estímulo com etanol.

Dessa forma, estudos envolvendo modelos de dependência poderiam contribuir na elucidação da plasticidade molecular associada às mudanças comportamentais e neurais estáveis, permitindo assim o desenvolvimento de modelos animais cada vez mais sofisticados.

REFERÊNCIAS[1]

ADRIANI, W. et al. Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. **Behav. Neurosci.**, v. 112, p. 1152-1166, 1998.

AIZENSTEIN, M. L. et al. Repeated amphetamine and fencamfamine and reciprocal cross-sensitization. **Neuropsychopharmacology**, v. 3, n. 4, p. 283-290, 1990.

ALLEN, G. V. et al. Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. J. Comp. Neurol., v. 311, p. 1-16, 1991.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 3rd ed. Washington., DC: APA, 1987.

ANDRESSOO, J.O.; SAARMA, M. Signalling mechanisms underlying development and maintenance of dopamine neurons. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 18, n. 3, p. 297-306, 2008.

ASHER, O. et al. Ethanol stimulates cAMP-responsive element (CRE)-mediated transcription via CRE-binding protein and cAMP-dependent protein kinase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 301, n. 1, p. 66-70, 2002.

ASYYED, A. Ethanol activates cAMP response element-mediated gene expression in select regions of the mouse brain. **Brain Res.**, v. 1106, p. 63-71, 2006.

BADDIANI, A.; OATES, M. M; ROBINSON, T. E. Modulation of morphine sensitization in the rat by contextual stimuli. **Psychopharmacology (Berl.)**, v.151, n. 2-3, p. 273-282, 2000.

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

BLACK, Y. D.; MACLAREN, F. R.; NAYDENOV, A. V.; CARLEZON, W. A. JR.; BAXTER, M. G.; KONRADI, C. Altered attention and prefrontal cortex

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

gene expression in rats after binge-like exposure to cocaine during adolescence. J. Neurosci., v. 26, n. 38, p. 9656-9665, 2006.

BOLANOS, C. A.; NESTLER, E. J. Neurotrophic mechanisms in drug addiction. **Neuromolecular Med.**, v. 5, p. 69-83, 2004.

BOLANOS, C. A. et al. Subsensitivity to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. **Dev. Brain Res.**, v. 111, p. 25-33, 1998.

BOSSE, K.E.; MATHEWS, T.A. Ethanol-induced increases in extracellular dopamine are blunted in brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice. Neurosci. Lett.**, v.** 489, n. 3, p. 172-176, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of proteins dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschr. Psychosom. Méd.**, v. 1, p. 63-69, 1960.

BURNS, L.H.; ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Differential effects of excitotoxic lesions of the basolateral amygdala, ventral subiculum and medial prefrontal cortex on responding with conditioned reinforcement and locomotor activity potentiated by intra-accumbens infusions of D-amphetamine. **Behav. Brain Res.**, v.55, p. 167–183, 1993.

CAMARINI, R.; MARCOURAKIS, T.; TEODOROV, E.; YONAMINE, M.; CALIL, H. M. Ethanol-induced sensitization depends preferentially on D1 rather than D2 dopamine receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 98, n. 2, p. 173-180, 2010.

CAMARINI, R. et al. MK-801 blocks the development of behavioral sensitization to the 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, p. 303-309, 2000b.

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

CARLEZON, W. A. et al. The many faces of CREB. Trends Neurosci**.**, v. 28, p. 436-445, 2005.

CASEY, B. J.; GETZ, S.; GALVAN, A. The adolescent brain. **Dev. Rev.**, v. 28, n. 1, p. 62–77, 2008.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS: SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil**: Estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005. São Paulo: Páginas & Letras Editora e Gráfica Ltda., 2006. 468p.

CHAMBERS, R. A.; TAYLOR, J. R.; POTENZA, M. N. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. **Am. J. Psychiatry.**, v. 160, n. 6, p. 1041-1052, 2003.

CHAO, M.V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point formany signalling pathways. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 4, p. 299–309, 2003.

CHRIVIA, J. C. et al. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. **Nature**, v. **365, p.** 855–859, 1993.

CLARK, D. B. et al. Adolescent versus adult onset and the development of substance use disorders in males. **Drug Alcohol Depend.**, v. 49, n. 2, p. 115-121, 1998.

CONSEJO NACIONAL PARA EL CONTROL DE ESTUPEFACIENTES (CONACE). Ministerio del Interior. 2006. Disponível em <http://www.conacedrogas.cl/inicio/index.php>. Acesso em: 26 abr. 2011.

CONSTANTINESCU, A.; DIAMOND, I.; GORDON, A. S. Ethanol-induced Translocation of cAMP-dependent Protein Kinase to the Nucleus. J. Biol. Chem., v. 274, n. 38, p. 26985-26991, 1999.

CRAWFORD, A. M. et al. Parallel developmental trajectories of sensation seeking and regular substance use in adolescents. **Psychol. Addict. Behav.**, v. 17, n. 3, p. 179-192, 2003.

CREWS, F.T., BOETTIGER, C.A. Impulsivity, Frontal Lobes and Risk for Addiction. **Pharmacol Biochem. Behav.**, v. 93, n. 3, p. 237–247, 2009.

CREWS, F., HODGE, J. H. C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 86, p. 189-199, 2007.

DAMASIO, H.; GRABOWSKI, T.; FRANK, R.; GALABURDA, A.M.; DAMASIO, A.R. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. **Science**, v. 264, n. 5176, p.1102–110, 1994.

DAVIS, M. I. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. **Pharmacol. Ther.**, v. 118, p. 36-57, 2008.

DEGENHARDT, L. et al. Toward a global view of alcohol, tobacco, cannabis, and cocaine use: findings from the WHO World Mental Health Surveys. **PLoS Med.**, v. 5, p. 141, 2008.

DELMONICO, R. L.; HANLEY-PEPTERSON, P.; ENGLANDER, J. Group psychotherapy for persons with traumatic brain injury: management of frustration and substance abuse. J. Head Trauma Rehabil., v. 13, n.6, p. 10-22, 1998.

DEROCHE-GAMONET, V.; BELIN, D.; PIAZZA, P. V. Evidence for Addiction-like Behavior in the Rat. **Science**, v. 305, p. 1014-1017, 2004.

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

DEWIT, D. J. et al. Age first alcohol use: a risk factor for the development of alcohol disorders. **Am. J. Psychiatry,** v. 157, p. 745-750, 2000.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 5274-5278, 1988.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Ethanol preferentially stimulates dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 115, n. 1, p. 131-132, 1985.

DOHRMAN, D. P.; DIAMOND, I.; GORDON, A. S. Ethanol causes translocation of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit to the nucleus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, n. 19, p. 10217-10221, 1996.

DOREMUS, T. L.; BRUNELL, S. C.; RAJENDRAN, P.; SPEAR, L. P. Factors influencing elevated ethanol consumption in adolescent relative to adult rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 29, n. 10, p. 1796–1808, 2005.

EATON, D. K.; KANN, L.; KINCHEN, S.; ROSS, J.; HAWKINS, J.; HARRIS, W. A.; LOWRY, R.; MCMANUS, T.; CHYEN, D.; SHANKLIN, S.; LIM, C.; GRUNBAUM, J. A.; WECHSLER, H. Youth risk behavior surveillance-United States, 2005. **MMWR Surveill Summ.**, v. 55, n. 5, p. 1-108, 2006.

EISCH, A. J. Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. **Biol. Psychiatry.**, v. 54, n. 10, p. 994-1005, 2003.

FADDA, F.; ROSSETI, Z. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. Prog. Neurobiol., v. 56, n. 4, p. 385-431, 1998.

FARIA, R. R.; LIMA RUEDA, A. V.; SAYURI, C.; SOARES, S. L.; MALTA, M. B.; CARRARA-NASCIMENTO, P. F.; et al. Environmental modulation of ethanol-induced locomotor activity: correlation with neuronal activity in distinct brain regions of adolescent and adult Swiss mice. **Brain Res.**, v. 1239, p. 127-140, 2008.

FINCH, D.M. Neurophysiology of converging synaptic inputs from the rat prefrontal cortex, amygdala, midline thalamus, and hippocampal formation onto single neurons of the caudate/putamen and nucleus accumbens. **Hippocampus**, v. 6, p. 495–512, 1996.

FINKBEINER, S. et al. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. **Neuron**, v. 19, p. 1031-1047, 1997.

GABBOTT, P. L. et al. Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. Brain Res., v. 993, p. 59-71, 2003.

GHITZA**, U.E.;** ZHAI, H.**;** WU, P.**;** AIRAVAARA**, M.;** SHAHAM**, Y.** Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: A review. Neurosci Biobehav. Rev., v. 35, n. 2, p.157-171 **, 2009.**

GONZALES, G. A.; MONTMINY, M. R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. **Cell**, v. **59, p.** 675–680, 1989.

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

HALL, F. S. et al. Reduced behavioral effects of cocaine in heterozygous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) knockout mice. **Neuropsychopharmacol.**, v. 28, n. 8, p. 1485-1490, 2003.

HEFNER, K., HOLMES, A. An investigation of the behavioral actions of ethanol across adolescence in mice. **Psychopharmacology**, v. 191, n. 2, p. 311–322, 2007.

HERDEGEN, T., LEAH, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Res. Rev.**, v. 28, p. 370-490, 1998.

HOFFMAN, P. L.; TABAKOFF, B. Ethanol and guanine nucleotide binding proteins: a selective interaction. **FASEB J.**, v. 4, n. 9, p. 2612-2622, 1990.

HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. **Brain Struct. Funct.**, v. 212, p. 149-179, 2007.

HORGER, B. A. et al. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 10, p. 4110-4122, 1999.

HYMAN, S. E. et al. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 29, p. 565-598, 2006.

IMPEY, S.; GOODMAN, R. H. CREB signaling--timing is everything. Sci. STKE, v. 82, p. 1-4, 2001.

IMPEY, S. et al. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca2+ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. **Neuron**, v. 21, n. 4, p. 869-883, 1998.

JEANBLANC, J.; HE, D.Y.; MCGOUGH, N.N.; LOGRIP, M.L.; PHAMLUONG, K.; JANAK, P.H.; RON, D. The dopamine D3 receptor is part of a homeostatic pathway regulating ethanol consumption. J. Neurosci., v. 26, n. 5, p. 1457-1464, 2006.

JENTSCH, J.D.; ROTH, R.H.; TAYLOR, J.R. Role for dopamine in the behavioral functions of the prefrontal corticostriatal system: implications for mental disorders and psychotropic drug action. **Prog. Brain Res.**, v.126, p. 433-453, 2000.

JOE, K.H.; KIM, Y.K.; KIM, T.S.; ROH, S.W.; CHOI, S.W.; KIM, Y.B.; LEE, H.J.; KIM, D.J. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 31, n. 11, p. 1833-1838, 2007.

KALIVAS, P.W.; CHURCHILL, L.; ROMANIDES, A. Involvement of the palladal-thalamocortical circuit in adaptive behavior. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 877, p. 64–70, 1999.

KALSBEEK, A.; VOORN, P.; BUIJS, R. M.; POOL, C. W.; UYLINGS, H. B. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 269, n. 1, p. 58-72, 1988.

KITA, T. et al. Nicotine-induced sensitization to ambulatory stimulant effect produced by daily administration into the ventral tegmental area and the nucleus accumbens in rats. **Life Sci.**, v. 50, n. 8, p. 583-590, 1992.

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

KWOK, R. P. et al. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. **Nature,** v. 370, p. 223-226, 1994.

LANCASTER, F. E. et al. Sex differences in alcohol preference and drinking patterns emerge during the early postpubertal period. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 20, p. 1043-1049, 1996.

LATCHMAN, D. S. **Eukaryotic transcription factors**. 4th ed. UK: Elsevier, 2004. 360 p.

LAVIOLA, G. et al. Striatal dopamine sensitization to D-amphetamine in periadolescent but not in adult rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 68, p. 115-124, 2001.

LAVIOLA, G. et al. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 275, p. 345-357, 1995.

LESLIE, C. A.; ROBERTSON, M. W.; CUTLER, A. J.; BENNETT, J. P. JR. Postnatal development of D1 dopamine receptors in the medial prefrontal cortex, striatum and nucleus accumbens of normal and neonatal 6-hydroxydopamine treated rats: a quantitative autoradiographic analysis. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 62, n. 1, p. 109-114, 1991.

LEWIS, D. A. Development of the prefrontal cortex during adolescence: insights into vulnerable neural circuits in schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 6, p 385-398, 1997.

LI, J.; LI, Y. H.; YUAN, X. R. Changes of phosphorylation of cAMP response element binding protein in rat nucleus accumbens after chronic etanol intake: naloxone reversal. **Acta. Pharmacol. Sin.**, v. 24, p. 930-936, 2003.

LIPSKA, B. K.; WEINBERGER, D. R. Genetic variation in vulnerability to the behavioral effects of neonatal hippocampal damage in rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 92, n. 19, p. 8906-8910, 1995.

LIPSKA, B. K.; JASKIW, G. E.; CHRAPUSTA, S.; KAROUM, F.; WEINBERGER, D. R. Ibotenic acid lesion of the ventral hippocampus differentially affects dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens and prefrontal cortex in the rat. **Brain Res.**, v.585, p.1–6, 1992.

LOGRIP, M. L. et al. Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression. **J. Neurochem.**, v. 109, p. 1459-1468, 2009.

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

LOVINGER, D. M. Communication networks in the brain. **Alcohol. Res. Health**, v.31, n.3, p. 196-214, 2008.

MAILLIARD, W. S.; DIAMOND, I. Recent advances in the neurobiology of alcoholism: the role of adenosine. **Pharmacol. Ther.**, v. 101, n. 1, p. 39-46, 2004.

MASSE, L. C.; TREMBLAY, R. E. Behavior of boys in kindergarten and the onset of substance use during adolescence. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 62–68, 1997.

MASTERMAN, D.L.; CUMMINGS, J.L. Frontal-subcortical circuits: the anatomical basis of executive, social and motivational behaviors. **J. Psychopharmacol.**, v. 11, p. 107–114, 1997.

MASUR, J.; SANTOS, H. M. L. M. Response variability of ethanol-induced locomotor activation in mice. **Psychopharmacology**, v. 96, p. 547-550, 1988.

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

MATTHEWS, R. P. et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. **Mol. Cell Biol.,** v. 14, n. 9, p. 6107-6116, 1994.

MAYR, B.; MONTMINY, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., v. 2, p. 599-609, 2001.

MCGOUGH, N. N. et al. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 10542-10552, 2004.

MELCHIOR, C. L. et al. A low dose of ethanol impairs working memory in mice in a win-shift foraging paradigm. Alcohol, v.10, p. 491-493, 1993.

MELISKA, C. J. et al. Tolerance and sensitization to chronic and subchronic oral caffeine: effects on wheelrunning in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 35, n. 2, p. 477-479, 1990.

MOONAT, S.; STARKMAN, B. G.; SAKHARKAR, A.; PANDEY, S. C. Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. Cell Mol. Life Sci., n.67, n. 1, p. 73-88, 2010.

MORRIS, S. A. et al. Alcohol inhibtion of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in adolescent alcohol abuse model. **Hippocampus**, v. 20, n. 5, p. 596-607, 2010.

MOSELHY, H. F. Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. Alcohol Alcohol, v. 36, p. 357-368, 2001.

NELSON, E. J. et al. Ethanol-induced phosphorylation and potentiation of the activity of type 7 adenylyl cyclase. Involvement of protein kinase C delta. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 7, p. 4552-4560, 2003.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat. Neurosci.**, v.8, n. 11, p. 1445-1449, 2005.

NESTLER, E. J. Molecular mechanisms of drug addiction. **Neuro Pharm.**, v. 47, p. 24-32, 2004.

NESTLER, E. J. Molecular basis in long-term plasticity underlying addiction. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, p. 119-128, 2001.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; SELF, D. W. ΔFosB: a sustained molecular switch for addiction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 11042–11046, 2001.

NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**, v. 278, p. 58-63, 1997.

PAINE, T. A. et al. Attention déficits and hyperactivity following inhibition of cAMP-dependent protein kinase within the medial prefrontal cortex of rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 2143-2155, 2009.

PANDEY, S. C. et al. Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 2762-2773, 2005.

PANDEY, S. C. et al. Partial deletion of the cAMP response element-binding protein gene promotes alcohol-drinking behaviors. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 5022-5030, 2004a.

PANDEY, S. C. The gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein: role in positive and negative affective states of alcohol addiction. **Pharmacol. Ther.**, v. 104, n. 1, p. 47-58, 2004b.

PANDEY, S. C. et al. Potencial role of the gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein in ethanol withdrawal-related anxiety. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 288, p. 866-878, 1999.

PASCUAL, M.; BOIX, J.; FELIPO, V.; GUERRI, C. Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. **J. Neurochem.**, v. 108, n. 4, p. 920-931, 2009.

PHILLIPS, T. J.; SHEN, E. H. Neurochemical bases of locomotion and ethanol stimulant effects. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 39, p. 243-282, 1996.

PIERCE, R. C.; KUMARESAN, V. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 30, n. 2, p. 215-238, 2006.

PRAKASH, A. et al. Innate differences in the expression of brain-derived neurotrophic factor in the regions within the extended amygdala between alcohol preferring and nonpreferring rats. Alcohol Clin. Exp. Res., v. 32, p. 909-920, 2008.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signaling pathways. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 361, p. 1545−1564, 2006.

RENTHAL, W., NESTLER, E. J. Epigenetic mechanisms in drug addiction. **Trens Mol. Med.**, v. 14, n. 8, p. 341-350, 2008.

RIDDERINKHOF, K. R. et al. Alcohol consumption impairs detection of performance errors in mediofrontal cortex. **Science**, v. 298, p. 2209-2211, 2002.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 363, p. 3137-3146, 2008.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Addiction. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 54, p.25-53, 2003.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**, v. 96, p. 103-114, 2001.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. **Addiction**, v. 95, p. 91-117, 2000.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive–sensitization theory of addiction. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 18, p. 247-291, 1993.

RON, D.; JURD, R. The "ups and downs" of signaling cascades in addiction. **Sci. STKE,** v. 309, p. 1-4, 2005.

RONG, Y.; BAUDRY, M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. J. Neurochem**.**, v. 67, p. 662-668, 1996.

ROSS, S.; PESELOW, E. The neurobiology of addictive disorders. Clin. Neuropharmacol., v. 32, n. 5, p. 269-276, 2009.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addict. Biol.**, v. 11, n. 1, 2–38, 2006.

SEEMAN, P. et al. Human brain dopamine receptors in children and aging adults. **Synapse**, v. 1, p. 399–404, 1987.

SEGAL, D. S.; MANDELL, A. J. Long-term administration of d-amphetamine: progressive augmentation of motor activity and stereotypy. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 2, n. 2, p. 249-255, 1974.

SHAHAM, Y.; HOPE, B. T. The role of neuroadaptations in relapse to drug seeking. **Nature Neurosc.**, v. 8, n. 11, p. 1437-1439, 2005.

SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 821-821, 1999.

SHUSTER, L. et al. Sensitization of mice to methylphenidate. **Psychopharmacology (Ber.)**, v. 77, n. 1, p. 31-36, 1982.

SHUSTER, L. et al. Sensitization to cocaine stimulation in mice. **Psychopharmacology (Ber.)**, v. 52, n. 2, p. 185-190, 1977.

SPANAGEL, R. Alcoholism: A systems approach from molecular physiology to addictive behavior. **Physiol. Rev.**, v. 89, p. 649-705, 2009.

SPANAGEL, R.; WEISS, F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. **Trends Neurosci.**, v. 22, n. 11, p. 521-527, 1999.

SPANOS, L. J.; YAMAMOTO, B. K. Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+/-)MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 32, n. 4, p. 835-840, 1989.

SPEAR, L. P.; VARLINSKAYA, E. I. Sensitivity to ethanol and other hedonic stimuli in an animal model of adolescence: implications for prevention science? **Dev. Psychobiol.**, v. 52, n. 3, p. 236-243, 2010.

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

SPEAR, L. P. Adolescent brain development and animal models. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1021, p. 23-26, 2004.

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

SPEAR, L. P.; BRICK, J. Cocaine-induced behavior in the developing rat. **Behav. Neural Biol.**, v. 26, p. 401-415, 1979.

STEVENSON, R. A. et al. Comparison of ethanol locomotor sensitization in adolescent and adult DBA/2J mice. Psychopharmacology (Berl.), v. 197, p. 361-370, 2008.

STRAFELLA, A.P.; PAUS, T.; BARRETT, J.; DAGHER, A. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the human prefrontal cortex induces dopamine release in the caudate nucleus. J. Neurosci., v.21, n. 15, p. 1-4, 2001.

SZAPACS, M. E.; MATHEWS, T. A.; TESSAROLLO, L.; ERNEST LYONS, W.; MAMOUNAS, L. A.; ANDREWS, A. M. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. J. Neurosci. Methods, v. 140, p. 81-92, 2004.

TAYLOR, J.R.; JENTSCH, J.D. Repeated intermittent administration of psychomotor stimulant drugs alters the acquisition of Pavlovian approach behavior in rats: differential effects of cocaine, d-amphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”). **Biol. Psychiatry.**, v. 50, n. 2, p. 137–143, 2001.

TIRELLI, E. et al. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. **Neurosc. Biobehav Rev.**, v. 27, p. 163-178, 2003.

TOSCANO, C. D. et al. Lead exposure alters cyclic-AMP response element binding protein phosphorilation and binding activity in the developing rat brain. **Brain Res. Dev. Brain. Res.**, v. 145, p. 219-228, 2003.

TRUXELL, E.M.; MOLINA, J.C.; SPEAR, N.E. Ethanol intake in the juvenile, adolescent, and adult rat: effects of age and prior exposure to ethanol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 31, n. 5, p. 755–765, 2007.

TU, Y. et al. Ethanol inhibits persistent activity in the prefrontal cortical neurons. **J. Neurosci.**, v. 27, p. 4765-4775, 2007.

TURGEON, S. M. et al. Enhanced CREB phosphorylation and changes in c-Fos and FRA expression in striatum accompany amphetamine sensitization. Brain Res**.**, v. 749, p. 120-126, 1997.

TZSCHENTKE, T. M.; SCHMIDT, W. J. Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. **Crit. Rev. Neurobiol.**, v. 14, n. 2, p. 131-142, 2000.

VALVERIUS, P. et al. Brain forskolin binding in mice dependent on and tolerant to ethanol. **Brain Res.**, v. 503, p. 38-43, 2000.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Ontogeny of acute tolerance to ethanol-induced social inhibition in Sprague-Dawley rats. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 30, p. 1833-1844, 2006.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Acute effects of ethanol on social behavior of adolescent and adult rats: role of familiarity of the test situation. Alcohol. Clin. Exp. Res., v. 26, n. 10, p. 1502-1511, 2002.

VOLKOW, N.D. Addiction reviews. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 1141p. xi-xii, 2008.

VOLKOW, N.D.; LI, T.K. Drugs and alcohol: treating and preventing abuse, addiction and their medical consequences. **Pharmacol. Ther.**, v. 108, n. 1, p. 3-17, 2005.

YAN, Q. S. et al. Different expression of brain-derived neurotrophic factor in the nucleus accumbens of alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) rats. Brain Res., v. 1035, p. 215-218, 2005.

YANG, X.; HORN, K.; WAND, G. S. Chronic ethanol exposure impairs phosphorylation of CREB and CRE-binding activity in rat striatum. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 22, p. 224-232 1998a.

YANG, X. et al. Chronic ethanol administration decreases phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in granule cells of rat cerebellum. J. Neurochem., v. 70, p. 224-232, 1998b.

WAGNER, F.A.; ANTHONY, J.C. From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. **Neuropsychopharmacology**., v. 26, n. 4, p. 479-488, 2002.

WEISSENBORN, R.; ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J. Effects of medial prefrontal or anterior cingulate cortex lesions on responding for cocaine under fixed-ratio and second-order schedules of reinforcement in rats. Psychopharmacology (Berl.), v. 134, n. 3, p. 242-257, 1997.

WHITE, A. M.; SWARTZWELDER, H. S. Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1021, p. 206-220, 2004.

WHITE, F. J.; KALIVAS, P. W. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. **Drug Alcohol Depend.**, v. 51, p. 141-153, 1998.

WINDLE, M. et al. Transitions into underage and problem drinking: Developmental processes and mechanisms between 10 and 15 years of age. **Pediatrics,** v. 121, p. 273-289, 2008.

WISE, R. A. Drive, incentive, and reinforcement: the antecedents and consequences of motivation. **Nebr. Symp. Motiv.**, v. 50, p. 159-195, 2004.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological Review**, v. 94, n. 4, p. 469-492, 1987.

WU, G. Y. et al. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 2808-2813, 2001.

WU, X.; MCMURRAY, C. T. Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 1735–1741, 2001.

YAKA, R.; HE, D.Y.; PHAMLUONG, K.; RON, D. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP(1–38)) enhances N-methyl-D-aspartate receptor function and brain-derived neurotrophic factor expression via RACK1. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 9630–9638, 2003.