

**ANA PAULA NATALINI DE ARAUJO**

**ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES  
DA SENSIBILIZAÇÃO CRUZADA ENTRE ESTRESSE E  
COCAÍNA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP, para obtenção do título de MESTRE em Farmacologia.

Orientador:

Profa. Dra. CLEOPATRA DA SILVA PLANETA

SÃO PAULO  
2001

Candidato(a): Ana Paula Natalini de Araujo.

Título da Dissertação: **Aspectos comportamentais e moleculares da sensibilização cruzada entre estresse e cocaína**

---

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

**1) Examinador(a)** \_\_\_\_\_

**2) Examinador(a)** \_\_\_\_\_

**3) Presidente** \_\_\_\_\_

---

"Meu coração é um almirante louco  
que abandonou a profissão do  
mar  
e que a vai relembrando pouco a  
pouco  
em casa a passear, e passear...

No movimento (eu mesmo me  
desloco  
nesta cadeira, só de o  
imaginar)  
o mar abandonado fica em foco  
nos músculos cansados de parar.

Há saudades nas pernas e nos  
braços.

Há saudades no cérebro por  
fora.

Há grandes raivas feitas de  
cansaço.

Mas - esta é boa! - era do  
coração  
que eu falava... e onde diabo  
estou eu agora  
com almirante em vez de  
sensação?..."

(Fernando Pessoa)

Dedico essa tese

Aos meus pais **Álvaro** e **Magaly**,

pela luta, amor e incentivo que  
me fizeram chegar até aqui.

*(Amo muito vocês...)*

À Profa. **Cleopatra da Silva**  
**Planeta**, pela inestimável  
orientação que possibilitou meu  
crescimento científico e sobretudo  
pela paciência profissional e  
pessoal.

Mais que orientadora: um exemplo  
que procuro seguir...

*(Admiro*

*demais você...)*

Ao Prof. **Cristoforo Scavone**, em reconhecimento à sua orientação, fundamental para a realização desse trabalho e principalmente pela amizade, essencial para o meu crescimento profissional e pessoal.

## AGRADECIMENTOS

Aos Profs. **Roberto DeLucia** e **Moacyr Luiz Aizenstein**, pela presença, carinho, incentivo e críticas sempre oportunas durante a realização desse trabalho.

Aos Profs. **Maria do Carmo Longo**, **José Francisco Fracasso** e **Ricardo Luiz Nunes de Souza**, pelo apoio e dedicação, essenciais para meu crescimento científico e pessoal.

À Sra. **Maria Aparecida Gomes Saraiva Fernandes**, pela ajuda técnica e pessoal sempre constantes.

Aos amigos **Carolina D. Munhoz**, **Ana Elisa Ambrósio**, **Pollyana Gisele**, **Lucília Satomi**, **Júlia Mitsue**, **Keli Cristina** e **Isaías Glezer**, pelo carinho, essencial para meu crescimento pessoal e profissional.

Às Sras. **Elisabete Z. P. Lepera** e **Rosana F. P. Silva**, pelo carinho e dedicação na realização da fase experimental desse trabalho.

Aos Profs. **Rosângela Peccinini**, **José Salvador Lepera** e **Georgino Honorato**, pelo estímulo e amizade sempre presentes.

Às Sras. **Maria Aparecida dos Santos** e **Sandra De Lorenzo**, pela amizade e apoio profissional.

Aos amigos **Marcelo Tadeu Marin**, **Fábio Cardoso Cruz**, **Lucília Lepsch** e **Lílian Gonzalo**, pelo carinho e colaboração na fase experimental desse trabalho.

Ao Prof. **Sandro Roberto Valentini**, pelo gentil empréstimo dos aparelhos utilizados nas técnicas experimentais.

Às Sras. **Selma Rigonati** e **Julieta dos Santos**, pela atenção durante esse período.

À Sra. **Natalina L. Escremin**, pela gentil revisão bibliográfica desse trabalho.

Aos professores, funcionários e pós-graduandos dos **Laboratórios de Imunologia** e **Microbiologia - FCF/UNESP** pelo apoio técnico e pessoal.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 99/01620-3)**, pelo apoio financeiro.

À Deus.



## SUMÁRIO

1. Lista de figuras .....	1
2. Resumo .....	2
3. Abstract .....	3
4. Introdução .....	4
4.1 Aspectos Gerais .....	4
4.2 Cocaína .....	6
4.2.1 Mecanismos moleculares de ação da cocaína .....	6
4.2.2 Sensibilização comportamental induzida por cocaína .....	9
4.3 Estresse .....	12
4.3.1 Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal induzida por estresse .....	12
4.3.2 Sensibilização comportamental cruzada entre estresse e cocaína .....	15
5. Objetivos .....	19
6. Material e Métodos .....	20
6.1 Animais .....	20
6.2 Drogas .....	20
6.3 Exposição aguda ou crônica ao estresse .....	21
6.4 Determinação do peso corpóreo .....	23

6.5 Determinação da atividade locomotora .....	23
6.6 Determinação da concentração da corticosterona plasmática por radioimunoensaio .....	25
6.7 Determinação da atividade da proteína quinase dependente de AMPc .....	27
6.8 Determinação da concentração de proteínas .....	28
7. Delineamento Experimental.....	30
7.1 Alterações nos pesos corpóreos dos animais submetidos ao estresse crônico, previsível ou imprevisível .....	30
7.2 Efeito da exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, na ativação do eixo HPA induzida por imobilização .....	30
7.3 Alteração da atividade locomotora basal induzida pela exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível .....	31
7.4 Efeito da exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, sobre o aumento da atividade locomotora induzido pela administração aguda de cocaína .....	31
7.5 Alteração da atividade da proteína quinase dependente de AMPc induzida pela exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível .....	32
7.6 Análise estatística .....	32
8. Resultados .....	34
8.1 Alterações nos pesos corpóreos dos animais submetidos ao estresse crônico previsível ou imprevisível .....	34

8.2 Efeito da exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, na ativação do eixo HPA induzida por imobilização .....	37
8.3 Alteração da atividade locomotora basal induzida pela exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível .....	40
8.4 Efeito da exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, sobre o aumento da atividade locomotora induzido pela administração aguda de cocaína .....	42
8.5 Alteração da atividade da proteína quinase dependente de AMPc induzida pela exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível .....	45
9. Discussão .....	49
10. Conclusões .....	61
11. Referências Bibliográficas .....	62

## 1. Lista de figuras

Figura 1- Caixa de medida automática da atividade locomotora .....	24
Figura 2- Alterações nos pesos corpóreos dos animais induzidas pela exposição ao estresse crônico, previsível ou imprevisível .....	36
Figura 3- Concentração da corticosterona plasmática após a imobilização dos animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível .....	39
Figura 4- Atividade locomotora dos animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, determinada 24 horas após a última sessão de estresse ...	41
Figura 5- Atividade locomotora acumulada de 40 minutos induzida pelas injeções de salina ou cocaína dos animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível avaliada 24 horas após a última sessão de estresse .....	44
Figura 6- Atividade da PKA no corpo estriado dos animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, avaliada 24 horas após a última exposição ao estresse .....	46
Figura 7- Atividade da PKA no núcleo acumbens dos animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, avaliada 24 horas após a última exposição ao estresse .....	48

## 2. Resumo

Vários estudos clínicos demonstram que existem fatores adicionais ao efeito reforçador primário das drogas que determinam por que alguns indivíduos permanecem usuários ocasionais, enquanto outros progridem para a farmacodependência. Evidências clínicas apontam o estresse como uma variável importante na iniciação, manutenção e recaída ao uso da cocaína ou morfina. Em roedores, a cocaína induz a sensibilização comportamental que se caracteriza pelo aumento progressivo da atividade motora no decorrer do seu uso prolongado. Esse fenômeno é um dos eventos que emergem no decurso temporal das adaptações que levam à farmacodependência. Recentemente foi sugerido que a sensibilização é a gênese do uso compulsivo de drogas. Muitos estudos revelam que o estresse induz a sensibilização comportamental cruzada com os psicostimulantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilização cruzada entre o estresse e a cocaína, bem como os mecanismos neurais subjacentes. Para tanto foram avaliados as concentrações plasmáticas da corticosterona, a atividade locomotora basal e a induzida por cocaína, e a atividade da PKA nos animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível. A exposição ao estresse crônico previsível (EP) aumentou a atividade locomotora basal e a induzida por cocaína. A exposição ao EP aumentou as concentrações basais da corticosterona mas não alterou a atividade da PKA no núcleo acumbens e no corpo estriado. Assim, podemos concluir que a exposição a EP induziu sensibilização comportamental cruzada

à cocaína, sendo que esse efeito não se correlacionou com as alterações na atividade da PKA.

### **3. Abstract**

A potential etiologic factor in substance abuse is stress, and it is possible that chronic exposure to stressful life's events is related to the development of drug dependence and relapse. Behavioral sensitization is defined as an augmentation of a response to a drug during repeated drug exposure. Behavioral sensitization has been shown to occur to the locomotor and reinforcing effects of cocaine, amphetamine and other drugs of abuse. It has been suggested that sensitization is the genesis of compulsive drug use. Converging evidence suggests that exposure to stress induces behavioral sensitization to psychostimulant drugs. The present study investigates behavioral and molecular aspects of the cross-sensitization between stress and cocaine. We evaluated the basal and cocaine-induced locomotor activity, corticosterone plasma levels and protein kinase cAMP-dependent (PKA) activity in animals exposed to acute or chronic predictable and unpredictable stress. Increased basal and cocaine-induced locomotor activity was observed in animals exposed to chronic predictable stress. Chronic predictable stress increased basal corticosterone levels but did not change protein kinase A activity in both accumbens and striatum. In conclusion, predictable stress produced sensitization to locomotor effects of cocaine but this effect did not correlate with changes in PKA activity.

## **4. Introdução**

### **4.1 Aspectos Gerais**

A farmacodependência é um fenômeno complexo com causas e conseqüências fisiológicas, psicológicas e sociais (Nestler & Aghajanian, 1997). Esse fenômeno pode ser conceituado como uma síndrome em que o uso de drogas tem prioridade sobre outros comportamentos mais importantes para o indivíduo antes da sua experiência com as mesmas. Na sua forma extrema a farmacodependência está associada ao uso compulsivo de drogas (Edwards et al., 1981; Jaffe, 1990).

O desenvolvimento da farmacodependência resulta de relações complexas envolvendo o contexto social e psicológico do indivíduo, as propriedades da droga e as vias neuroquímicas (Izenwasser, 1998).

As teorias mais aceitas da farmacodependência enfatizam que a ativação dos sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbico e negroestriatal são fundamentais para as ações de reforço das drogas de abuso (Koob, 1996). O sistema mesocorticolímbico consiste de neurônios dopaminérgicos que se originam na área tegmental ventral (VTA) e terminam em estruturas límbicas, como o núcleo acumbens e o córtex frontal. Os neurônios dopaminérgicos do sistema negroestriatal originam-se na substância negra e terminam no corpo estriado (Cooper et al., 1996).

Assim, vários estudos demonstram que os sistemas dopaminérgicos mesolímbico e negroestriatal são as vias neurais mais importantes na mediação do reforço positivo provocado por opióides, psicostimulantes, etanol, nicotina e canabinóides (Wise, 1990; Koob, 1992; Berridge & Robinson, 1998).

Os efeitos reforçadores agudos da cocaína e anfetamina resultam na auto-administração e no desenvolvimento da farmacodependência (Kalivas & Duffy, 1993). A administração prolongada dessas substâncias, por sua vez, provoca neuroadaptações que se manifestam através da sensibilização comportamental e da tolerância (Vanderschuren & Kalivas, 2000).

Estudos epidemiológicos demonstram que muitos indivíduos experimentam vários tipos de drogas de abuso por períodos variáveis de tempo, mas somente alguns desenvolvem a farmacodependência (O'Brien et al., 1986). Isso sugere que existem fatores adicionais ao efeito reforçador primário das drogas que determinam por que alguns indivíduos permanecem usuários ocasionais, enquanto outros progridem para a farmacodependência (Goeders & Guerrin, 1996).

Um grande desafio na pesquisa dos determinantes da auto-administração de drogas é a demonstração de que eventos ambientais e contextos sociais promoveriam esse comportamento. Evidências clínicas apontam o estresse como uma variável importante na iniciação e manutenção do uso da cocaína e morfina, assim como na recaída à utilização dessas drogas (Gawin, 1991; Shaham & Stewart, 1995; Erb et al., 1996).

Assim, vários estudos clínicos demonstram que indivíduos dependentes freqüentemente citam a exposição a estímulos aversivos e estados negativos de humor como justificativa para a manutenção e recaída ao uso do álcool e de outras drogas de abuso (Bradley et al., 1989; Wallace, 1989).

No mesmo sentido, muitos estudos pré-clínicos apontam a relação entre o estresse e o comportamento da auto-administração de drogas. Esses estudos demonstram que a exposição ao estresse agudo facilita a aquisição da auto-administração dos psicostimulantes, tais como a cocaína (Ramsey & Van Ree, 1993;



Goeders & Guerin, 1994; Miczek & Mutschler, 1996) e a anfetamina (Piazza & Le Moal, 1996), e opióides como a morfina (Shaham & Stewart, 1994; 1995).

Vários estudos também revelam que o estresse agudo reinstala o comportamento da auto-administração da heroína e cocaína após a extinção desse comportamento (Shaham & Stewart, 1994; Erb et al., 1996).

A dependência da cocaína é um dos sérios problemas sociais e de saúde pública. Entre esses problemas incluem-se as doenças infecciosas, criminalidade, violência e exposição neonatal às drogas. A compreensão dos mecanismos relacionados à interação entre a dependência da cocaína e o estresse pode contribuir para o desenvolvimento de medidas de prevenção e tratamento (Izenwasser, 1998).

## **4.2 Cocaína**

### **4.2.1 Mecanismos moleculares de ação da cocaína**

A cocaína é classificada como um agente dopaminérgico de ação indireta. Essa droga liga-se à proteína transportadora da dopamina bloqueando, assim, a recaptação desse neurotransmissor e aumentando sua concentração na fenda sináptica (Cooper et al., 1996).

O mecanismo de ação da cocaína é comprovado em camundongos que não expressam o transportador devido a manipulações genéticas, uma vez que esses animais não apresentam aumento da concentração extra-celular da dopamina após a administração da cocaína (Giros et al., 1996).

A inibição da recaptação da dopamina resulta no aumento da concentração do neurotransmissor na fenda sináptica. A dopamina acumulada na fenda sináptica interage com seus receptores iniciando uma seqüência de eventos que modifica a atividade neural e finalmente a expressão do comportamento.

Os receptores dopaminérgicos pertencem à super-família dos receptores acoplados à proteína-G. Cinco subtipos de receptores dopaminérgicos foram clonados e identificados no sistema nervoso central e denominados D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub>. Esses receptores são agrupados e classificados de acordo com o tipo de proteína-G acoplada. Assim, os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> estão acoplados à proteína-G estimulatória (G<sub>s</sub>) e pertencem à subclasse D<sub>1</sub>. Os receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> estão ligados à proteína-G inibitória (G<sub>i</sub>) e pertencem à subclasse D<sub>2</sub> (Cooper et al., 1996).

As proteínas-G são constituídas por 3 polipeptídeos denominados subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Quando ligada ao nucleotídeo guanidina difosfato (GDP), a subunidade  $\alpha$  forma um heterotrímero inativo com as subunidades  $\beta / \gamma$ , que permanece ligado ao receptor. A estimulação do receptor causa uma alteração conformacional na subunidade  $\alpha$  diminuindo a sua afinidade pelo nucleotídeo GDP que é, então, substituído pelo nucleotídeo guanidina trifosfato (GTP). Uma vez ligada ao GTP, a subunidade  $\alpha$  assume sua forma ativa dissociando-se do receptor e do complexo  $\beta / \gamma$ . Na sua forma ativa, a subunidade  $\alpha$  interage com os efetores. (Cooper et al., 1996).

A subunidade  $\alpha_s$  ativa, enquanto a subunidade  $\alpha_i$  inibe a enzima adenilil ciclase. A adenilil ciclase produz monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) através da hidrólise do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) e liberação do pirofosfato (P-P). Na seqüência dos eventos da transdução dopaminérgica o AMPc é responsável pela ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (Alberts et al., 1994).

A PKA na sua forma inativa é formada por um complexo de quatro subunidades, duas regulatórias e duas catalíticas. Cada subunidade regulatória contém dois sítios para a ligação do AMPc. Assim, quatro moléculas de AMPc ligam-se nas subunidades regulatórias da PKA e induzem alterações conformacionais na enzima. Essas alterações conformacionais provocam a ativação e a liberação das duas subunidades catalíticas da PKA que catalisam a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para resíduos de serina ou treonina das proteínas (Alberts et al., 1994).

A interação da dopamina com os receptores da subclasse D<sub>2</sub>, ligados a G<sub>i</sub>, inibe a adenilil ciclase provocando diminuição das concentrações intracelulares do segundo mensageiro AMPc diminuindo, assim, a atividade da PKA (Nerr, 1995). Enquanto a interação com os receptores da subclasse D<sub>1</sub> induz estimulação da G<sub>s</sub> com conseqüente ativação da PKA (Terwillinger et al., 1991).

A PKA ativada fosforila outras proteínas importantes na atividade intracelular dentre elas o “cAMP binding element” (CREB). CREB fosforilado liga-se a sítios específicos do DNA, levando ao aumento da taxa de transcrição dos “genes de transcrição imediata” (IEGs). Os IEGs codificam proteínas, chamadas fatores de transcrição, que formam dímeros no citoplasma e migram para o núcleo ligando-se aos sítios na cadeia de DNA, denominados sítios AP1, responsáveis pela ativação da transcrição dos genes de outras proteínas (Sheng & Greenberg, 1990). Assim, a ligação dos fatores de transcrição nos sítios AP1 é capaz de modificar a transcrição gênica. Entre essas modificações incluem-se alterações na concentração intracelular de segundos mensageiros que regulam as taxas de fosforilação de diferentes proteínas, alterações no fluxo de íons, tais como o Ca<sup>+2</sup>, e alterações nos canais de íons (Sheng & Greenberg, 1990).

Desse modo, as drogas psicostimulantes como a cocaína podem alterar o fenótipo da célula e finalmente a expressão da função celular.

#### **4.2.2 Sensibilização comportamental induzida por cocaína**

A administração aguda de doses baixas ou moderadas da cocaína ou anfetamina induz ativação psicomotora, caracterizada por aumento da atividade locomotora e comportamentos rotacionais e de levantar em roedores (Robinson, 1984). A administração aguda de doses altas induz comportamentos estereotipados, tais como movimentos repetidos da cabeça, cheirar, morder ou lambe (Randrup & Munkvad, 1967).

A administração crônica de doses baixas da cocaína, anfetamina ou fencanfamina produz um aumento progressivo da atividade locomotora a cada administração. A administração crônica de doses moderadas dessas substâncias provoca comportamentos estereotipados semelhantes aos observados com a administração de doses altas (Post & Contel, 1983; Robinson & Becker, 1986; Planeta et al., 1987).

O aumento gradual e progressivo da atividade locomotora e dos comportamentos estereotipados induzido pela administração repetida da droga é denominado de sensibilização comportamental (Post & Contel, 1983; Robinson & Becker, 1986).

Em humanos, a sensibilização dos efeitos psicostimulantes da anfetamina e cocaína parecem ser responsáveis pelo desenvolvimento de psicose ou sintomas paranóides que se assemelham à esquizofrenia (Kalivas & Stewart, 1991; Hyman, 1996).

A sensibilização comportamental é um dos eventos que emergem no decurso temporal das adaptações no sistema nervoso central que levam à farmacodependência e está relacionada com o aumento da vulnerabilidade ao abuso de drogas (Robinson & Berridge, 1993; Nestler & Aghajanian, 1997; Piazza & Le Moal, 1998). Recentemente, Covington III & Miczek (2001) sugerem que a sensibilização comportamental é a gênese do uso compulsivo das drogas.

Os trabalhos visando esclarecer os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da sensibilização comportamental induzida por psicostimulantes demonstram que as projeções dopaminérgicas são fundamentais para esse fenômeno. Os mecanismos neurais responsáveis pela sensibilização comportamental ainda são controversos; mesmo assim muitas evidências apontam a relação do aumento da atividade locomotora com o aumento da atividade dopaminérgica mesoacumbens e negroestriatal (Robinson & Becker, 1982; Castañeda et al., 1988; Miserendino & Nestler, 1995).

Wolf et al. (1993) propõem que a subsensibilidade dos receptores  $D_2$  na área tegmental ventral e a supersensibilidade dos receptores  $D_1$  no núcleo acumbens são necessários para o desenvolvimento e a expressão da sensibilização comportamental.

Várias evidências indicam a supersensibilidade da via AMPc / PKA como o mecanismo responsável pelo desenvolvimento da sensibilização comportamental à cocaína e a outros psicofármacos (para revisão: Nestler & Aghajanian, 1997).

Nesse sentido, Terwilliger et al. (1991) administram cocaína i.p. (15 mg/kg) durante 14 dias e avaliam a atividade da PKA dezesseis horas após a última injeção. Os autores demonstram que o tratamento com a cocaína resulta no aumento da atividade da PKA no núcleo acumbens. Esse aumento da atividade da

PKA estaria relacionado com o aumento da concentração da enzima adenilil ciclase, o aumento dos níveis de AMPc, bem como a diminuição da quantidade de proteína Gi também observados nesse trabalho.

A importância da via AMPc / PKA no desenvolvimento da sensibilização comportamental induzida por cocaína também é evidenciada por Miserendino & Nestler (1995). Os autores demonstram que a injeção de 8-bromo-AMPc (ativador da PKA) no núcleo acumbens aumenta a sensibilização comportamental induzida pelo tratamento crônico com cocaína.

Embora, o mecanismo mais aceito para o desenvolvimento da sensibilização comportamental seja a supersensibilidade da via AMPc / PKA, algumas evidências contradizem essa hipótese.

Nesse sentido, Crawford et al. (1998) administram o metilfenidato, um bloqueador do transportador de dopamina, durante 5 dias consecutivos. Dois dias após a última injeção é administrada a “dose desafio” do metilfenidato e são avaliados a locomoção, o comportamento estereotipado (cheirar) e a atividade da PKA no corpo estriado dos animais. Os autores demonstram que a administração crônica do metilfenidato induz sensibilização no comportamento de cheirar, sem indução da sensibilização locomotora. Demonstram ainda que o metilfenidato diminui a atividade da PKA no corpo estriado dos animais que recebem tratamento prévio com essa droga se comparada à dos animais que recebem tratamento com salina. A análise conjunta dos resultados revela que o desenvolvimento da sensibilização comportamental está relacionado com a diminuição da atividade da PKA no corpo estriado.

Embora as evidências sejam contraditórias, a sensibilização comportamental aparenta refletir alterações na sensibilidade da via AMPc / PKA induzidas pela exposição repetida a drogas.

### **4.3 Estresse**

#### **4.3.1 Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal induzida por estresse**

O estresse pode ser conceituado como qualquer mudança fisiológica ou psicológica que altera o balanço ou homeostasia do organismo (Akil e Morano, 1995).

Embora o estresse seja vagamente conceituado, diferentes tipos de estresse, psicológico ou fisiológico, produzem grandes mudanças comportamentais e fisiológicas. O estresse está relacionado ao desenvolvimento de transtornos mentais como depressão, ansiedade ou esquizofrenia (Steenbergen et al., 1991; Ottenweller et al., 1992; Rodgers & Cole, 1993). Outras alterações observadas após o estresse incluem hipoatividade, anorexia ou perda de peso (Dess et al., 1989; Blanchard et al., 1990; Woodmansee et al., 1993). Além disso, o estresse é considerado como um dos fatores relacionados às diferenças individuais no desenvolvimento, manutenção e recaída ao uso da cocaína e das outras drogas de abuso (Shaham & Stewart, 1995; Erb et al., 1996; Sinha et al., 1999).

A preservação da homeostasia do organismo necessita de contínuas adaptações comportamentais, autonômicas e endócrinas para controlar os distúrbios causados por estressores internos ou externos (Aguilera, 1998). Todos os

organismos desenvolveram mecanismos de adaptação para lidar com essas alterações. Em mamíferos o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) exerce essa função. O eixo HPA integra os vários sinais indicativos de estresse. Esses sinais convergem para uma via comum representada pelos neurônios da divisão parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Akil & Morano, 1995). Os neurônios do PVN sintetizam o fator liberador de corticotrofina (CRF), um polipeptídeo formado por uma cadeia simples de 41 aminoácidos (Romier et al., 1993).

Diferentes tipos de estresse são capazes de ativar o eixo HPA. A ativação do eixo HPA resulta no aumento da síntese do CRF no PVN. O CRF é então liberado na eminência média e liga-se aos seus receptores de membrana nos corticotrofos da pituitária anterior. Como resultado ocorre o aumento da liberação da pro-opiomelanocortina (POMC), o peptídeo precursor da molécula do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH liberado atua sobre seus receptores no córtex da adrenal resultando na síntese e secreção dos glicocorticóides, predominantemente, corticosterona nos roedores e cortisol nos primatas (Akil & Morano, 1995).

A exposição crônica ao estresse pode alterar a resposta do eixo HPA. Essas alterações das respostas do eixo HPA dependem de fatores como a previsibilidade, a intensidade e a natureza do estímulo estressor.

Quando o mesmo estressor é dado repetidamente, o grau de ativação do eixo HPA difere de acordo com o tipo do estresse, ocorrendo dessensibilização das respostas do ACTH para alguns tipos de estresses (frio, imobilização, natação forçada) ou preservação das respostas após outros tipos de estresses (choque nas patas, hipoglicemia por insulina, injeção intraperitoneal de salina hipertônica).



Quando há exposição crônica ao mesmo tipo de estresse e subsequente exposição aguda a um estímulo aversivo desconhecido observa-se aumento da resposta do eixo HPA (Dallman et al., 1992; Aguilera, 1994).

Assim, Dal-Zotto et al. (2000) demonstram que animais expostos a natação forçada por 20 minutos durante 14 dias apresentam recuperação mais rápida das concentrações de corticosterona no último dia de exposição quando comparada à dos animais submetidos ao mesmo estresse uma única vez. Demonstram ainda que não há diferença na concentração de ACTH entre os grupos.

É interessante ressaltar que nem sempre ocorre preservação da resposta do eixo HPA induzida por exposição ao mesmo tipo de estresse. O aumento, diminuição ou preservação da concentração de corticosterona depende da intensidade do estressor.

O trabalho realizado por Pitman et al. (1990) consiste na aplicação de choques elétricos por 3 horas durante 8 dias. Os autores demonstram que os animais que recebem choque de baixa intensidade recuperam rapidamente a concentração de corticosterona no 8º dia. Entretanto, os animais que recebem choque de alta intensidade apresentam maior concentração de corticosterona no 8º dia de exposição ao estresse indicando aumento das respostas do eixo HPA ao choque elétrico.

Além disso, várias evidências apontam que a resposta à exposição aguda a um estressor é maior em animais submetidos anteriormente a um diferente tipo de estresse crônico. Assim, Bhatnagar & Dallman (1998) demonstram que o aumento da corticosterona e ACTH induzido por imobilização durante 30 minutos é maior nos animais que foram previamente submetidos ao ambiente frio (4°C) por 4 horas diárias durante 7 dias se comparado ao dos animais controles.

### **4.3.2 Sensibilização comportamental cruzada entre estresse e cocaína**

Muitos estudos demonstram que o estresse induz a sensibilização comportamental cruzada com os psicostimulantes. Assim, Díaz-Otañez et al. (1997) demonstram que a exposição à imobilização por 2 horas durante 1 ou 7 dias induz aumento da atividade locomotora à administração intraperitoneal de 0,5 mg/kg de anfetamina 24 horas após a última sessão de estresse.

Herman et al. (1984) demonstram que a exposição por 20 minutos a choques elétricos durante 10 dias aumenta a locomoção induzida por administração de anfetamina 24 horas após o último estresse. No mesmo sentido, a exposição à imobilização durante 10 dias provoca a sensibilização comportamental à subsequente administração de anfetamina 24 horas após a última sessão de estresse (Badiani et al., 1992).

A sensibilização comportamental cruzada entre o estresse e os psicostimulantes pode estar relacionada a alterações nos sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbico e negroestriatal (Kalivas & Stewart, 1991; Piazza & Le Moal, 1998).

De fato, vários estudos demonstram que outros sistemas além do eixo HPA, tais como os sistemas dopaminérgicos mesolímbico e negroestriatal, são ativados por diferentes tipos de estresse.

Assim, estudos *in vivo* demonstram o aumento da concentração extracelular da dopamina no corpo estriado, núcleo acumbens e córtex frontal de ratos expostos agudamente a choques elétricos nas patas, imobilização ou choques na

cauda (Abercrombie et al., 1989; Rougé-Pont et al. 1993; Kalivas & Duffy, 1995; Cabib & Puglisi-Allegra, 1996).

O aumento da atividade dopaminérgica também é evidenciado por Morinobu et al. (1995) utilizando-se *c-fos* como marcador da ativação neuronal. Esses autores observam aumento da expressão de *c-fos* no córtex frontal após a exposição à imobilização.

As alterações na indução da sensibilização comportamental e na transmissão dopaminérgica induzidas por estresse parecem estar relacionadas com as ações dos glicocorticóides.

Nesse sentido, estudos comportamentais demonstram que a adrenalectomia ou a administração de metirapona, um inibidor da síntese de corticosterona, reduz a sensibilização comportamental induzida por anfetamina ou cocaína (Pauly et al., 1993; Piazza et al., 1994; Marinelli et al., 1997).

É interessante notar ainda que a administração aguda de cocaína é capaz de ativar o eixo HPA em roedores, macacos e humanos (Teoh et al., 1994; Sarnyai et al., 1992; 1995).

Estudos feitos em sinaptossomas demonstram que altas concentrações de glicocorticóides inibem a recaptação da dopamina (Gilad et al., 1987). Outros estudos utilizando células de feocromocitoma (Lewis et al., 1983) ou *in vivo* (Markey et al., 1982) demonstram que os glicocorticóides induzem aumento da concentração do RNAm da tirosina hidroxilase. Além disso, Piazza et al. (1996) demonstram que a administração de glicocorticóide *in vivo* aumenta a liberação da dopamina no núcleo acumbens.

Evidências recentes apontam que os glicocorticóides interferem na transdução dopaminérgica. Assim, Dwivedi & Pandey (2000) revelam que a

diminuição da atividade da PKA induzida pela implantação de “pellets” de 50 e 100 mg de corticosterona estaria relacionada com a diminuição da ligação do AMPc ao sítio regulatório e das concentrações das proteínas das subunidades catalítica (Cat $\beta$ ) e regulatórias (RI $\beta$  e RII $\beta$ ) da PKA, no córtex frontal e hipocampo de ratos.

O mecanismo pelo qual o estresse induz a sensibilização aos psicostimulantes ainda não é conhecido, mas podem-se sugerir dois mecanismos: a) aumento da concentração da dopamina e b) efeito sobre os mecanismos de transdução.

Cabib & Puglisi-Allegra (1996) demonstram que os sistemas mesocortical e mesolímbico adaptam-se de forma diferente à exposição repetida ao estresse. Os autores avaliam o efeito da imobilização por 10 minutos, em animais previamente expostos à imobilização durante 10 dias consecutivos, sobre as concentrações de dopamina no córtex frontal e núcleo acumbens. Os autores revelam que o aumento da liberação de dopamina no núcleo acumbens e no córtex frontal induzido por imobilização não é alterado pela exposição prévia ao estresse. Embora não se observem alterações nas concentrações do neurotransmissor, os autores observam, no córtex frontal, aumento das concentrações do metabólito da dopamina, o ácido diidroxifenil acético (DOPAC).

Recentemente, o trabalho realizado por Cuadra et al. (1999) avalia a liberação de dopamina *in vivo* induzida por imobilização durante 60 minutos em animais expostos previamente ao estresse imprevisível 5 dias após a última sessão de estresse. Os autores demonstram que o aumento da dopamina é maior nos animais expostos previamente ao estresse imprevisível se comparado ao dos animais controles.

Outras evidências apontam as ações do estresse sobre o sistema de transdução celular da via dopaminérgica. Nesse sentido, Ortiz et al. (1996) demonstram que a exposição ao estresse imprevisível durante 10 dias consecutivos induz o aumento da atividade da PKA no núcleo acumbens. Esse aumento da atividade estaria relacionado com a diminuição dos níveis de Gi também observada pelos autores.

Desde que a previsibilidade, intensidade e natureza dos estímulos aversivos provoquem diferentes mudanças nas respostas do eixo HPA, dopaminérgicas e comportamentais é possível que esses fatores também induzam diferentes efeitos na sensibilização cruzada à cocaína.

A literatura sobre as alterações induzidas por estresse nos mecanismos de transdução da via dopaminérgica e a sua relação com a sensibilização comportamental cruzada à cocaína é muito escassa. A fim de contribuir para o entendimento desse fenômeno o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos dos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, na secreção de corticosterona, no sistema de transdução do corpo estriado e do núcleo acumbens, bem como as suas relações com a sensibilização comportamental cruzada a cocaína.

## 5. Objetivos

Com o objetivo de estudar as alterações do eixo HPA produzidas pelo estresse e suas relações com a sensibilização comportamental cruzada à cocaína avaliamos os seguintes parâmetros em animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível:

- O ganho de peso corpóreo
  
- A concentração de corticosterona plasmática
  
- A atividade locomotora basal
  
- A atividade locomotora induzida pela administração aguda de cocaína
  
- A atividade da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) no corpo estriado e no núcleo acumbens

## **6. Material e Métodos**

### **6.1 Animais**

Foram utilizados ratos albinos machos, adultos, da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Câmpus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia do Câmpus de Araraquara – UNESP.

Em nosso biotério os animais foram mantidos em grupos de 3 em gaiolas plásticas, denominadas “gaiolas-viveiro”, medindo 32 x 40 x 16 cm (largura x comprimento x altura) por um período mínimo de 1 semana antes do início dos experimentos. A temperatura ambiente foi mantida constante ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Os animais foram mantidos sob ciclo de iluminação controlado claro / escuro (claro entre 7 – 19h).

Durante o período que os animais estiveram em nosso biotério foi mantido o fornecimento de água e ração *ad libitum*.

Todos os experimentos foram realizados durante a fase de claro.

### **6.2 Drogas**

- Cloridrato de cocaína (MERCK)

### **6.3 Exposição aguda ou crônica ao estresse**

O estresse previsível (EP) foi produzido mantendo-se os animais imobilizados diariamente em tubo plástico com 10 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento por 60 minutos durante 14 dias consecutivos.

No estresse imprevisível (EI) os animais foram submetidos a um tipo diferente de estresse a cada dia durante 14 dias consecutivos, como mostra a Tabela 1 (adaptado de Ortiz et al., 1996).

O estresse agudo (EA) consistiu de imobilização durante 60 minutos. A imobilização foi feita no dia referente ao 14<sup>o</sup> dia do protocolo de exposição crônica ao estresse.



**Tabela 1:** Protocolo de exposição ao EI

<b>DIA</b>	<b>TIPO DE ESTRESSE</b>	<b>HORÁRIO</b>
<b>1</b>	Imobilização por 60 minutos	Tarde
<b>2</b>	Natação forçada por 5 minutos	Manhã
<b>3</b>	Isolamento / frio por 60 minutos	Tarde
<b>4</b>	Luz acesa à noite	Noite
<b>5</b>	Natação forçada por 5 minutos	Manhã
<b>6</b>	Privação de água e alimento	Noite
<b>7</b>	Imobilização por 60 minutos	Tarde
<b>8</b>	Luz apagada por 2 horas	Tarde
<b>9</b>	Natação forçada por 5 minutos	Manhã
<b>10</b>	Luz acesa à noite	Noite
<b>11</b>	Isolamento / frio por 60 minutos	Manhã
<b>12</b>	Imobilização por 60 minutos	Tarde
<b>13</b>	Privação de água e alimento	Noite
<b>14</b>	Imobilização por 60 minutos	Manhã

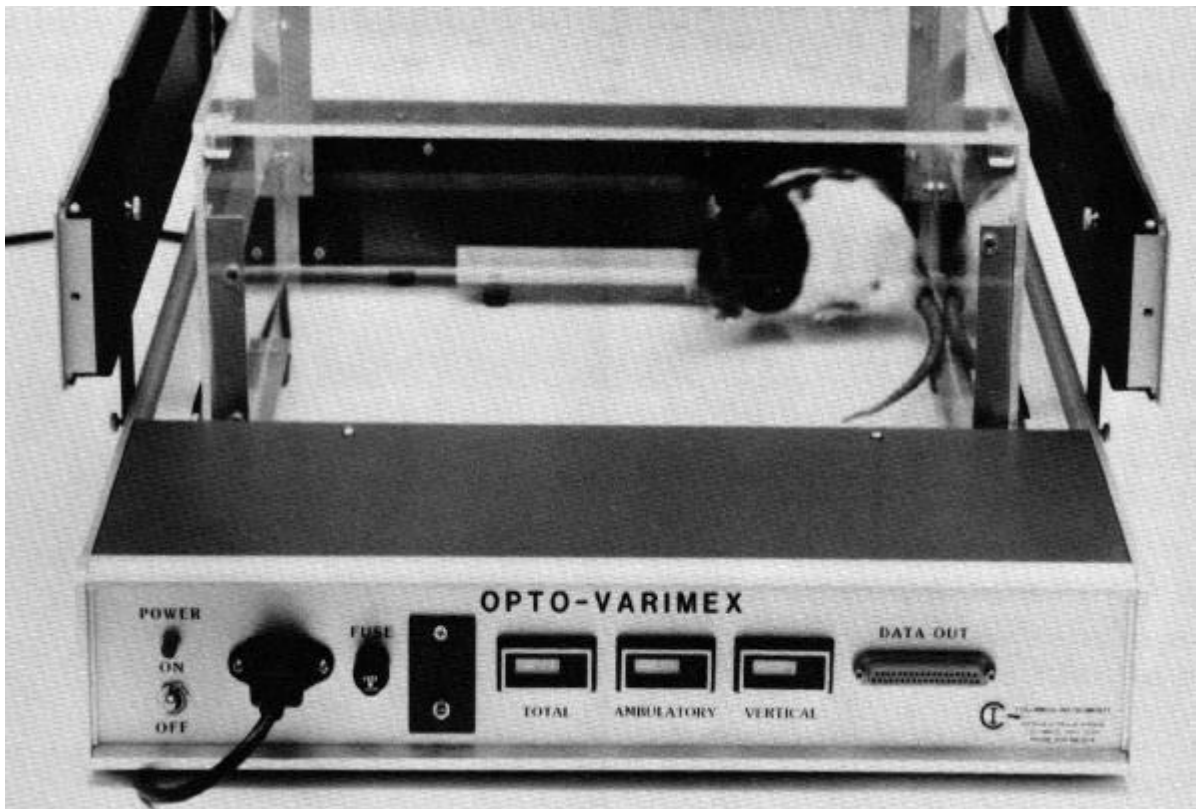
#### **6.4 Determinação do peso corpóreo**

O peso corpóreo foi determinado em balança com 1,0 g de precisão.

#### **6.5 Determinação da atividade locomotora**

Para a determinação da atividade locomotora os animais foram transferidos individualmente para a caixa de medida automática (Columbus Instruments Opto-Varimex, Columbus, Ohio, USA) da atividade locomotora, medindo 51,1 x 9,5 x 69,2 cm (largura x altura x comprimento), conforme mostra a Figura 1.

A caixa de atividade possui 10 emissores de luz infravermelha, distantes 2,5 cm entre si e à 3 cm do piso da caixa. Cada unidade de locomoção corresponde à interrupção de dois feixes de luz.



**Figura 1:** Caixa de medida automática da atividade locomotora

## **6.6 Determinação da concentração da corticosterona plasmática por radioimunoensaio**

As amostras foram preparadas segundo o método proposto por Sarnyai (1992). A concentração plasmática de corticosterona foi determinada por radioimunoensaio (RIA) segundo o método proposto pelo protocolo do anticorpo de corticosterona da SIGMA (Anti-Corticosterone – C-8784).

Alíquotas de 20 µl do plasma foram transferidas para 980 µl do tampão Tris (Tris-HCl 0,05M (SIGMA); NaCl 0,1M (SIGMA); azida sódica 0,1% (MERCK) - pH 8,0) e incubadas em banho de água a 75<sup>0</sup>C durante 1 hora, para o deslocamento da corticosterona da globulina plasmática. Após a incubação as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente.

Em tubos de polipropileno foram adicionados 100 µl do plasma diluído no tampão Tris. A seguir foram adicionados 500 µl do anticorpo para corticosterona diluído no tampão de diluição (Tris-HCl 0,05M (SIGMA); NaCl 0,1M (SIGMA); soroalbumina bovina (BSA) 0,1% (SIGMA), azida sódica 0,1% (MERCK) - pH 8,0).

Os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos e logo em seguida foram adicionados 100 µl de [1,2-<sup>3</sup>H(N)] – Corticosterone diluída no tampão de diluição (2,5 µl [<sup>3</sup>H]-Corticosterone : 1 ml de tampão de diluição) para a obtenção de uma contagem de aproximadamente 20.000 cpm por tubo de reação. A seguir, as amostras foram incubadas em banho de água por 1 hora, a 37<sup>0</sup>C.

Os tubos foram resfriados a 4<sup>0</sup>C durante 15 minutos e após esse período foram adicionados 200 µl da suspensão de carvão ativado (Tris-HCl 0,05M (SIGMA); NaCl 0,1M (SIGMA); BSA 0,1% (SIGMA), azida sódica 0,1% (MERCK); carvão ativado 0,5% (SIGMA); Dextran T70 0,5% (SIGMA) – pH 8,0). Os tubos foram

incubados em gelo por 10 minutos, seguida de centrifugação a 2.000 x g por 15 minutos, a 4°C.

Após a centrifugação, 600 µl do sobrenadante foram transferidos para os frascos de contagem da cintilação contendo 5 ml do líquido de cintilação (Aqueous Counting Scintillant® – Amersham Pharmacia Biotech) e a radiação (cpm) da [<sup>3</sup>H] – Corticosterone foi determinada no espectrofotômetro de cintilação líquida (Beckman).

Concomitantemente à determinação da concentração de corticosterona plasmática foram determinadas a concentração total da [<sup>3</sup>H] corticosterona adicionada em cada tubo (Total) e as ligações inespecíficas (Branco). Essas concentrações foram determinadas seguindo o mesmo procedimento descrito para as amostras. Para a determinação das reações inespecíficas foram adicionados 100 µl do tampão de diluição no lugar do plasma. Enquanto para a determinação da concentração total de [<sup>3</sup>H] corticosterona foram adicionados 100 µl do tampão de diluição no lugar do plasma, e ao invés da utilização da suspensão de carvão ativado, foram adicionados 200 µl do tampão de diluição.

Foi feita uma curva padrão de corticosterona nas concentrações de 62,5; 125; 250; 500 e 1000 pg/100µl. A curva foi submetida ao mesmo procedimento para a determinação da concentração da corticosterona descrito para as amostras de plasma.

A curva padrão foi plotada usando  $\ln[\text{cort}]$  no eixo x, e  $\ln[\text{cpm da amostra} / (\text{cpm do branco} - \text{cpm da amostra})]$  no eixo y. As concentrações da corticosterona presentes nas amostras foram calculadas interpolando-se as leituras obtidas das amostras (valores de y) na curva padrão e expressos em µg / 100ml de plasma.

A padronização do método feita no nosso laboratório demonstrou que o método apresenta coeficiente de variação inter-ensaio (c.v.) igual a 0,04.

### **6.7 Determinação da atividade da proteína quinase dependente de AMPc**

Os tecidos (corpo estriado e núcleo acumbens) foram homogeneizados em tampão de homogeneização (Tris-HCl 20 mM (SIGMA); EDTA 4 mM (SIGMA);  $\beta$ -mercaptoetanol 1% (v/v) (SIGMA); sacarose 0,32 M (SIGMA) e leupeptina 10  $\mu$ g/ml (SIGMA) - pH 6,5-8,0) e o homogenato foi centrifugado à 100.000 x g durante 15 minutos, a 4°C.

Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para a determinação da concentração de proteínas e outra alíquota foi utilizada para a determinação da atividade da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) solúvel.

A determinação da atividade da PKA foi realizada utilizando-se o Kit da Life Technologies (Protein Kinase Assay System®).

A concentração de proteínas foi determinada (item 6.8) no sobrenadante e normalizada para 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l.

Alíquotas de 10  $\mu$ l das amostras foram transferidas para duas séries de tubos de polipropileno. À primeira série foram adicionados 10  $\mu$ l de AMPc 40  $\mu$ M (ativador da PKA) enquanto à segunda série foram adicionados 10  $\mu$ l do peptídeo PKI 4  $\mu$ M (inibidor da PKA).

As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos para possibilitar a ligação do inibidor à PKA presente nas amostras.

Após a incubação foram adicionados 10  $\mu$ l de Kemptide 200  $\mu$ M (substrato da PKA) e solução de ATP 400  $\mu$ M contendo 20-25  $\mu$ Ci/ml de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (110 TBq/mmol – 3000 Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech)). Em seguida as amostras foram incubadas a 30°C durante 5 minutos.

Após o término da incubação, alíquotas de 20  $\mu$ l das soluções foram transferidas para discos de fosfoceleulose. Os discos foram lavados duas vezes com ácido fosfórico 1% (v/v) durante 5 minutos seguido por duas lavagens com água destilada.

Os discos foram transferidos para os frascos de contagem da cintilação contendo 5 ml do líquido de cintilação (Aqueous Counting Scintillant® – Amersham Pharmacia Biotech).

A radioatividade contida em cada disco foi determinada no espectrofotômetro de cintilação líquida (Beckman).

A atividade da PKA foi calculada pela diferença da fosforilação do substrato na presença do ativador e do inibidor específico para PKA e expressa em picomoles de  $^{32}$ Pi (fósforo inorgânico) transferidos para o substrato (Kemptide) por minuto por miligrama de proteína (pmol/min/mg prot.).

### **6.8 Determinação da concentração de proteínas**

A determinação da concentração de proteínas foi realizada utilizando-se o Kit da Bio-Rad®.

A curva padrão de soro albumina bovina foi feita em água destilada nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg/ml.

Alíquotas de 50  $\mu$ l das soluções padrão de soro albumina bovina ou das amostras diluídas foram adicionadas em 2,5 ml de corante de proteínas diluído 1:5 em água.

A leitura da absorbância da curva padrão e das amostras foi feita no comprimento de onda de 595 nm no espectrofotômetro UV-visível (Hewlett Packard).

A interpolação com a curva padrão forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras e foi expressa em miligrama de proteína por mililitro da solução das amostras (mg/ml).



## **7. Delineamento Experimental**

### **7.1 Alterações nos pesos corpóreos dos animais submetidos ao estresse crônico, previsível ou imprevisível**

Os pesos corpóreos dos animais dos grupos controle (n=24), EP (n=16) ou EI (n=18) foram determinados nos dias 1, 7 e 14 do protocolo do estresse crônico.

As pesagens foram feitas sempre antes do início das sessões diárias de estresse.

### **7.2 Efeito da exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, na ativação do eixo HPA induzida por imobilização**

Vinte e quatro horas após a última exposição ao estresse crônico, os animais submetidos ao EA (n=6), EP (n=7) ou EI (n=9) foram imobilizados durante 60 minutos. Ao término da imobilização, os animais foram transferidos para gaiolas individuais, permanecendo durante 60 minutos. Os animais controles (n=7), que não foram expostos ao estresse, foram retirados das suas “gaiolas-viveiro” e imobilizados durante 60 minutos, como descrito acima.

O sangue foi coletado da cauda dos animais nos intervalos de 0-5 (basal), 55-60 (estresse) e 120-125 (recuperação) minutos após o início da imobilização.

O sangue foi centrifugado a 2.000 x g durante 15 minutos, a 4°C. O plasma foi separado e utilizado para a determinação da concentração de corticosterona, como descrito no item 6.6.

### **7.3 Alteração da atividade locomotora basal induzida pela exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível**

Vinte e quatro horas após a última exposição aos estresses agudo ou crônico, os animais dos grupos submetidos ao EA (n=11), EP (n=12) ou EI (n=12) foram transferidos individualmente para a caixa de medida da atividade locomotora e a locomoção avaliada durante 15 minutos.

Os animais do grupo controle (n=14) foram retirados das suas “gaiolas-viveiro” e imediatamente colocados na caixa de atividade para determinação da locomoção durante 15 minutos.

### **7.4 Efeito da exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, sobre o aumento da atividade locomotora induzido pela administração aguda de cocaína**

Vinte e quatro horas após a última exposição ao EP (n=14), EI (n=13) ou EA (n=11), os animais foram transferidos individualmente para a caixa de medida da atividade locomotora por um período de 30 minutos. Dados obtidos em nosso laboratório indicam que esse é o tempo necessário para que ocorra habituação à caixa.

Ao término deste período os animais foram subdivididos em dois grupos. Em um grupo foi administrada 1,0 ml/kg de salina por via intraperitoneal (i.p.) e no outro grupo foi administrada 10 mg/kg de cocaína i.p.. A atividade locomotora dos animais foi avaliada durante 40 minutos.

Os animais do grupo controle (n=17) foram retirados das suas “gaiolas-viveiro”, transferidos para a caixa de atividade e tiveram sua locomoção avaliada após as injeções de salina ou cocaína, como descrito acima.

### **7.5 Alteração da atividade da proteína quinase dependente de AMPc induzida pela exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível**

Vinte e quatro horas após a última exposição ao estresse, os animais dos grupos EA (n=6), EP (n=6) ou EI (n=6) foram decapitados, os cérebros retirados, as estruturas específicas (estriado e núcleo acumbens) dissecadas e congeladas em gelo seco para a determinação da atividade da PKA.

Os animais do grupo controle (n=7), que não foram submetidos ao estresse, foram retirados das suas “gaiolas-viveiro” e imediatamente decapitados.

### **7.6 Análise estatística**

**a)** Os experimentos da determinação do peso corpóreo e da concentração de corticosterona plasmática foram analisados por ANOVA bifatorial para dados pareados, considerando-se os fatores tipo de estresse e tempo; seguida da comparação múltipla das médias

pelo teste de Newman-Keuls ou teste-F para a análise dos contrastes entre as médias, utilizando-se  $p < 0,05$  (Winer, 1971).

- b)** Os experimentos da determinação da atividade locomotora basal e da PKA foram analisados por ANOVA unifatorial para dados não pareados seguida da comparação múltipla das médias pelo teste de Newman-Keuls, utilizando-se  $p < 0,05$  (Winer, 1971).
- c)** O experimento da determinação da atividade locomotora após administração aguda de cocaína foi analisado por ANOVA bifatorial para dados não pareados, considerando os fatores tipo de estresse e tratamento; seguida da comparação múltipla das médias pelo teste de Newman-Keuls, utilizando-se  $p < 0,05$  (Winer, 1971).

## **8. Resultados**

### **8.1 Alterações nos pesos corpóreos dos animais submetidos ao estresse crônico, previsível ou imprevisível**

Na Figura 2 estão representados os resultados da determinação dos pesos corpóreos dos animais controles ou submetidos ao EP ou EI.

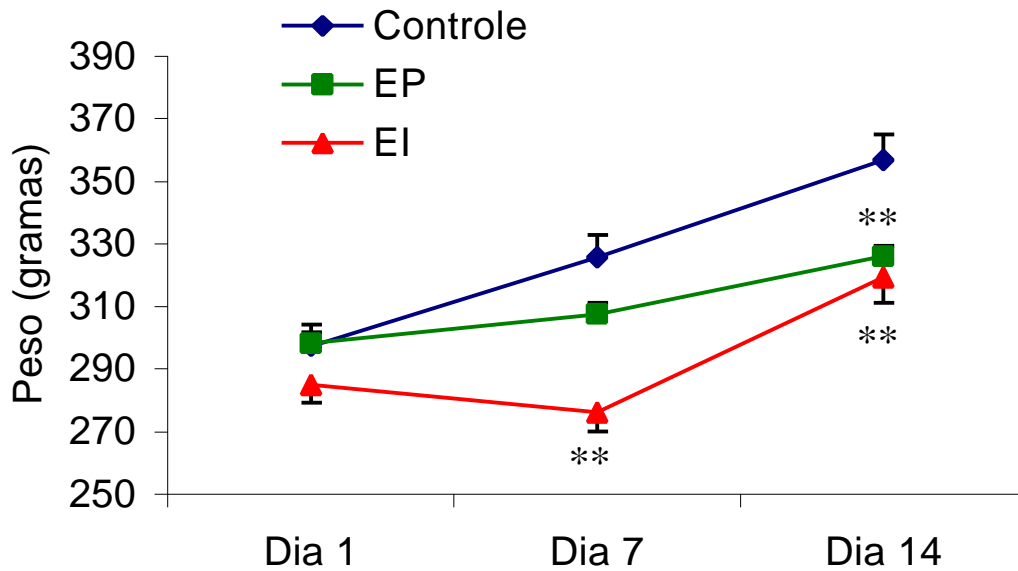
A análise dos resultados (ANOVA bifatorial para dados pareados; fatores tipo de estresse e tempo) demonstrou interação significativa entre os fatores ( $F(4,110)=36,20$ ;  $p<0,01$ ). A partir desta observação o fator tipo de estresse pôde ser analisado independentemente do fator tempo (Winer, 1971).

Considerando-se o fator tipo de estresse, a ANOVA unifatorial demonstrou que no 1º dia não houve diferença significativa entre os pesos corpóreos dos grupos ( $F(2,55)=1,38$ ; n.s.).

A ANOVA unifatorial demonstrou que nos 7º e 14º dias houve diferenças nos pesos corpóreos entre os grupos, ( $F(2,55)=16,01$ ;  $p<0,01$ ) e ( $F(2,55)=8,25$ ;  $p<0,01$ ); respectivamente. A comparação múltipla das médias pelo teste de Newman-Keuls revelou que no 7º dia os pesos corpóreos dos animais submetidos ao EI foram significativamente menores quando comparados aos dos grupos controle e EP. Enquanto no 14º dia os pesos corpóreos dos animais dos grupos submetidos ao EP ou EI foram significativamente menores se comparados aos do grupo controle, sendo que não houve diferença significativa entre os pesos corpóreos dos grupos EP e EI.

Considerando-se o fator tempo, a ANOVA unifatorial demonstrou diferença significativa nos pesos corpóreos entre os tempos analisados para os

grupos controle ( $F(2,69)=16,16$ ;  $p<0,01$ ), EP ( $F(2,45)=16,79$ ;  $p<0,01$ ) e EI ( $F(2,51)=11,50$ ;  $p<0,01$ ). A comparação múltipla das médias pelo teste de Newman-Keuls revelou que no 1º dia os animais do grupo controle apresentaram pesos corpóreos menores se comparados aos do 7º dia, e estes menores que aos do 14º dia. Os grupos EP e EI não apresentaram diferenças nos pesos corpóreos comparando-se o 1º e 7º dias, sendo esses menores se comparados aos do 14º dia.



**Figura 2:** Alterações nos pesos corpóreos dos animais induzidas pela exposição ao estresse crônico, previsível ou imprevisível. Os valores representam a média  $\pm$  epm do peso corpóreo (gramas) dos animais dos grupos controle (n=24), EP (n=16) ou EI (n=18).

Dia 1: ANOVA  $F(2,55)=1,38$ ; n.s.

Dia 7: ANOVA  $F(2,55)=16,01$ ; \*\* $p<0,01$  EI < controle = EP (Newman-Keuls)

Dia 14: ANOVA  $F(2,55)=8,25$ ; \*\* $p<0,01$  EP = EI < controle (Newman-Keuls)

## **8.2 Efeito da exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, na ativação do eixo HPA induzida por imobilização**

A Figura 3 representa a concentração plasmática de corticosterona no período basal, após o estresse e recuperação, dos animais do grupo controle ou submetidos ao EA, EP ou EI.

A análise dos resultados (ANOVA bifatorial para dados pareados; fatores tipo de estresse e tempo) demonstrou diferença significativa para os fatores tipo de estresse ( $F(3,25)=23,22$ ;  $p<0,01$ ) e tempo ( $F(2,50)=66,86$ ;  $p<0,01$ ), entretanto não houve interação significativa entre os fatores ( $F(6,50)=1,05$ ; n.s).

Em seguida, foi utilizado o teste-F para a análise dos contrastes entre as médias, sendo consideradas significativamente diferentes apenas as comparações que apresentarem  $p<0,05$ .

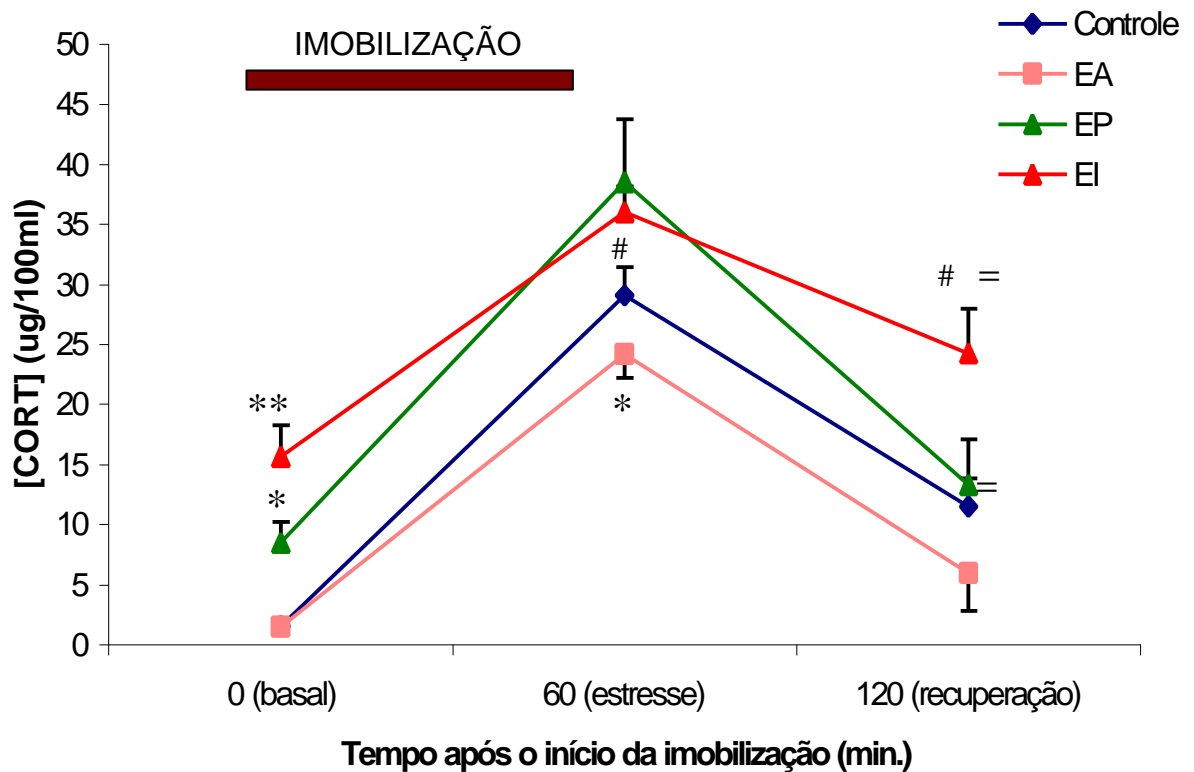
Considerando-se o fator tipo de estresse, o teste-F demonstrou que as concentrações basais de corticosterona dos grupos controle e EA foram significativamente menores quando comparadas às dos grupos EP e EI. O teste-F revelou também que as concentrações basais de corticosterona dos animais do grupo EI foram significativamente maiores se comparadas às do grupo EP.

No período após o estresse, o teste-F demonstrou que as concentrações de corticosterona do grupo EA foram significativamente menores se comparadas às dos grupos EP e EI. Demonstrou ainda que a concentração de corticosterona do grupo controle era significativamente menor se comparada à do grupo EP.



O teste-F feito para o período de recuperação revelou que a concentração de corticosterona do grupo EI era maior se comparada à dos grupos controle, EA e EP.

Considerando-se o fator tempo, o teste-F demonstrou que as concentrações de corticosterona dos grupos controle e EI foram maiores no período de recuperação se comparadas às basais. Demonstrou ainda que, em todos os grupos, as concentrações basais de corticosterona eram menores se comparadas às do período após o estresse.



**Figura 3:** Concentração da corticosterona plasmática após a imobilização dos animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível. Os valores representam a média  $\pm$  epm das concentrações de corticosterona dos grupos controle (n=7), EA (n=6), EP (n=7) ou EI (n=9) submetidos a 1 hora de imobilização vinte e quatro horas após a última sessão de estresse.

0 minutos: \* $p < 0,05$  EP > controle = EA (teste-F)

\*\* $p < 0,01$  EI > EP > controle = EA (teste-F)

60 minutos: \* $p < 0,05$  EA < EP = EI (teste-F)

# $p < 0,05$  controle < EP (teste-F)

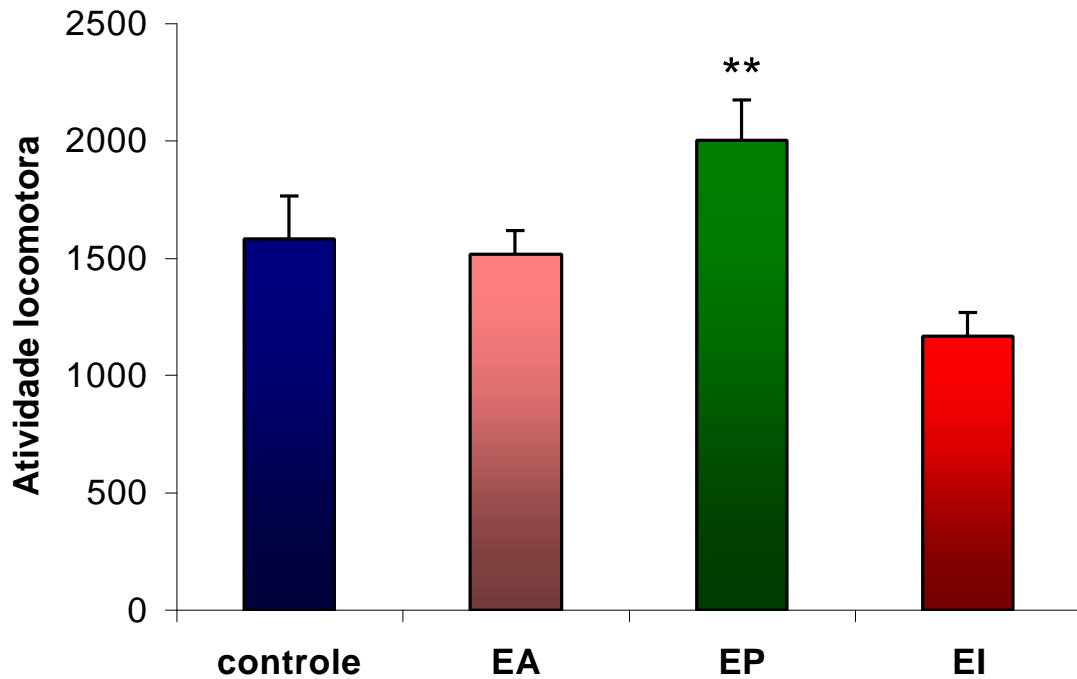
120 minutos: # $p < 0,05$  EI > controle = EA = EP (teste-F)

= $p < 0,05$  120 minutos > 0 minutos (teste-F)

### **8.3 Alteração da atividade locomotora basal induzida pela exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível**

Na Figura 4 está representada a atividade locomotora acumulada em 15 minutos de registro. A atividade foi avaliada 24 horas após a última exposição ao estresse dos animais dos grupos controle ou submetidos ao EA, EP ou EI.

A ANOVA unifatorial demonstrou diferença significativa na atividade locomotora ( $F(3,49)=5,69$ ;  $p<0,01$ ). A comparação múltipla das médias pelo teste de Newman-Keuls revelou que a atividade locomotora do grupo EP era maior quando comparada à dos grupos controle, EA e EI.



**Figura 4:** Atividade locomotora dos animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível. A atividade foi determinada 24 horas após a última sessão de estresse. Os valores representam a média  $\pm$  epm da atividade locomotora durante 15 minutos dos animais dos grupos controle (n=14), EA (n=11), EP (n=12) e EI (n=12).

ANOVA  $F(3,49)=5,69$

\*\* $p < 0,01$  EP > controle = EA = EI (Newman-Keuls)

#### **8.4 Efeito da exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível, sobre o aumento da atividade locomotora induzido pela administração aguda de cocaína**

A Figura 5 representa a atividade locomotora dos animais do grupo controle e dos grupos submetidos ao EA, EP ou EI, avaliada durante 40 minutos após as injeções de salina ou cocaína.

A ANOVA bifatorial para dados não pareados considerando-se os fatores tipo de estresse e tratamento (salina ou cocaína) revelou diferença significativa para os fatores tipo de estresse ( $F(3,47)=7,61$ ;  $p<0,01$ ) e tratamento ( $F(1,47)=56,15$ ;  $p<0,01$ ). A ANOVA bifatorial demonstrou também interação significativa entre os fatores ( $F(3,47)=5,16$ ;  $p<0,01$ ). A partir dessa observação o fator tipo de estresse pôde ser analisado independentemente do fator tratamento.

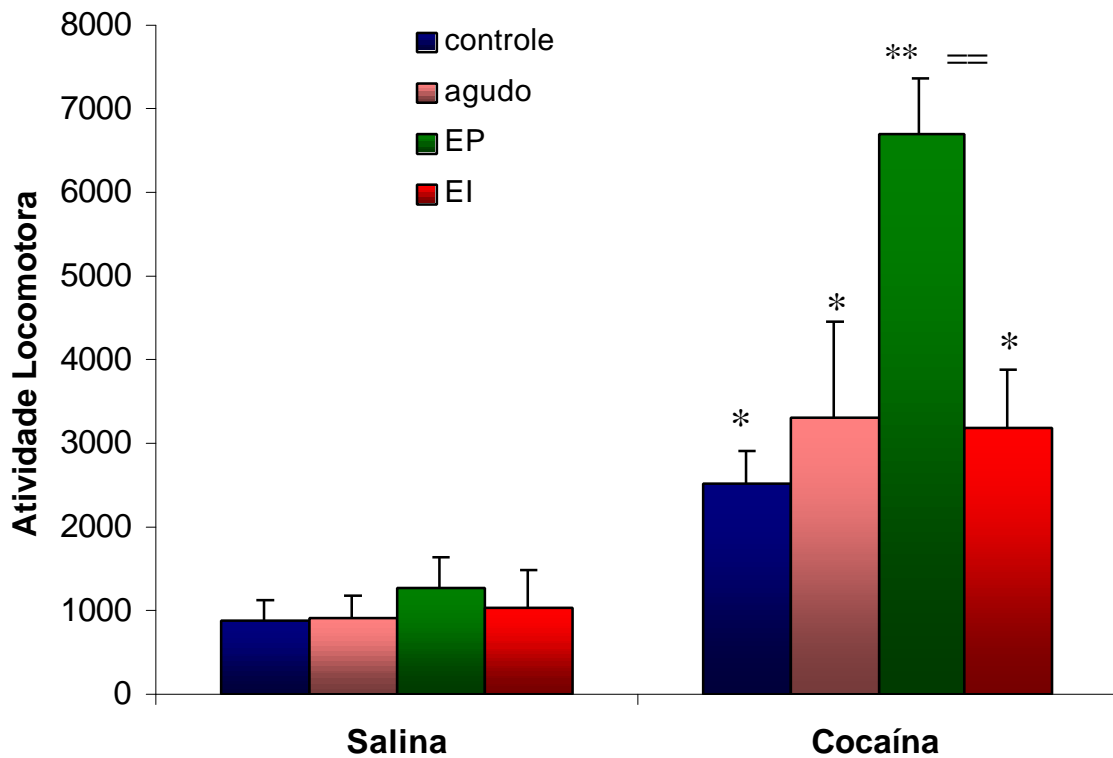
Em seguida, foi utilizado o teste-F para a análise dos contrastes entre as médias, sendo consideradas significativamente diferentes apenas as comparações que apresentarem  $p<0,05$ .

Análise de contrastes não revelou diferença significativa na atividade locomotora após a injeção de salina comparando-se os grupos.

O teste-F demonstrou que a administração de 10mg/kg de cocaína induziu aumento significativo da atividade locomotora em todos os grupos se comparado ao dos respectivos grupos que receberam injeção de salina. A diferença foi significativa para os grupos controle ( $F(1,47)=5,77$ ;  $p=0,02$ ), EA ( $F(1,47)=7,81$ ;  $p=0,07$ ), EP ( $F(1,47)=50,49$ ;  $p=0,007$ ) e EI ( $F(1,47)=7,51$ ;  $p<0,08$ ).

A análise de contrastes revelou diferença significativa na locomoção entre os grupos após injeção de cocaína. A atividade locomotora induzida por cocaína nos

animais do grupo EP era maior se comparada à dos grupos controle ( $F(1,47)=37,33$ ;  $p=0,000$ ), EA ( $F(1,47)=17,95$ ;  $p=0,000$ ) e EI ( $F(1,47)=23,32$ ;  $p=0,000$ ).



**Figura 5:** Atividade locomotora acumulada de 40 minutos induzida pelas injeções de salina ou cocaína. A atividade locomotora foi avaliada 24 horas após a última sessão de estresse. Os valores representam a média  $\pm$  epm da atividade locomotora dos animais dos grupos controle (n=8), EA (n=6), EP (n=6) e EI (n=6) após a injeção de salina (1,0ml/kg) e dos grupos controle (n=9), EA (n=5), EP (n=8) e EI (n=7) após a injeção de cocaína (10mg/kg).

\* $p < 0,05$  grupo cocaína > respectivo grupo salina (teste-F)

\*\* $p < 0,01$  grupo cocaína > respectivo grupo salina (teste-F)

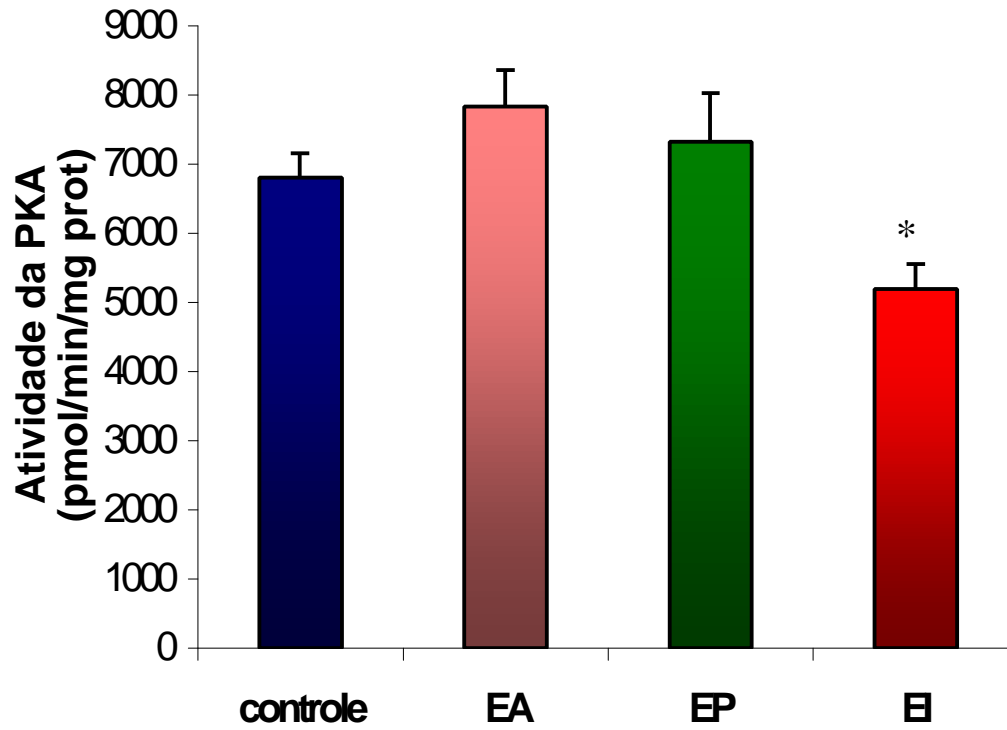
=  $p < 0,01$  EP > controle = EA = EI tratados com cocaína (teste-F)

### **8.5 Alteração da atividade da proteína quinase dependente de AMPc induzida pela exposição aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível**

A Figura 6 representa a atividade da PKA no corpo estriado avaliada 24 horas após a última exposição ao estresse nos animais dos grupos controle, EA, EP ou EI.

A ANOVA unifatorial revelou diferença significativa na atividade da PKA entre os grupos ( $F(3,17)=4,94$  ( $p<0,05$ )). A comparação múltipla das médias pelo teste de Newman-Keuls demonstrou que a atividade da PKA do grupo EI era significativamente menor se comparada à dos grupos controle, EA e EP.





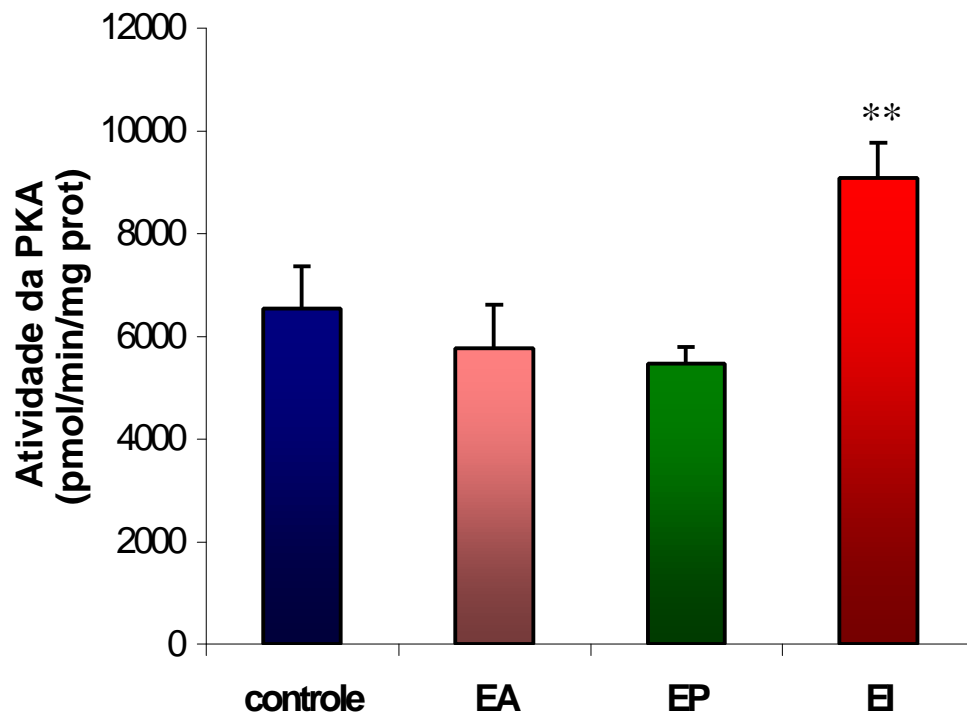
**Figura 6:** Atividade da PKA no corpo estriado dos animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível. Os valores representam a média  $\pm$  epm da atividade da PKA avaliada 24 horas após a última exposição ao estresse nos animais dos grupos controle (n=5), EA (n=5), EP (n=5) e EI (n=6).

ANOVA  $F(3,17) = 4,94$

\* $p < 0,05$  EI < controle = EA = EP (Newman-Keuls).

Na Figura 7 está representada a atividade da PKA no núcleo acumbens avaliada 24 horas após a última exposição ao estresse nos animais dos grupos controle, EA, EP ou EI.

A ANOVA unifatorial revelou diferença significativa na atividade da PKA entre os grupos ( $F(3,21)=5,01$  ( $p<0,01$ )). A comparação múltipla das médias pelo teste de Newman-Keuls demonstrou que a atividade da PKA do grupo EI era significativamente maior se comparada à dos grupos controle, EA e EP.



**Figura 7:** Atividade da PKA no núcleo acumbens dos animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível. Os valores representam a média  $\pm$  epm da atividade da PKA avaliada 24 horas após a última exposição ao estresse nos animais dos grupos controle (n=7), EA (n=6), EP (n=6) ou EI (n=6).

ANOVA  $F(3,21) = 5,01$

\*\* $p < 0,01$  EI > controle = EA = EP (Newman-Keuls).

## 9. Discussão

A investigação das alterações comportamentais, fisiológicas e bioquímicas induzidas por estresse, bem como as suas inter-relações com os efeitos das drogas de abuso, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento da farmacodependência.

No presente trabalho foram avaliadas as adaptações fisiológicas e moleculares induzidas pela exposição aguda ou crônica ao estresse e suas implicações nos efeitos comportamentais da cocaína.

O peso corpóreo e a concentração de corticosterona plasmática foram utilizados como indicadores da resposta fisiológica à exposição ao estresse.

Nossos resultados revelaram que a exposição ao estresse crônico diminuiu o peso corpóreo dos animais. Entretanto o padrão temporal dessa adaptação foi diferente comparando-se os grupos EP e EI. Observamos que a diminuição do peso foi mais acentuada no 7º dia nos animais expostos ao EI, indicando maior severidade desse tipo de estresse. A partir do 7º dia os animais expostos ao EI apresentaram ganho de peso, atingindo valores semelhantes aos pesos corpóreos dos animais do grupo EP no 14º dia, sugerindo, assim, adaptação parcial à condição de estresse.

Resultados semelhantes são observados por Martí et al. (1994). Os autores demonstram diminuição no consumo de alimento e no peso corpóreo de animais submetidos à imobilização ou à contenção diariamente por 1 hora durante 27 dias consecutivos. A perda do peso corpóreo é observada no 7º dia de exposição à imobilização, enquanto a exposição à contenção somente diminui o ganho de peso. Entretanto no 27º dia é observada a recuperação no ganho de peso corpóreo

dos animais expostos à imobilização. Com base nesses resultados, os autores sugerem que embora a exposição ao estresse por imobilização seja mais severa, o organismo adapta-se a essa condição. Aqui deve-se ressaltar que a contenção utilizada por Martí e colaboradores é semelhante ao estresse que, no presente trabalho, foi denominado de imobilização.

O efeito do estresse sobre o peso corpóreo pode estar relacionado com a ativação do eixo HPA. O CRF liberado pela ativação do eixo HPA induz a liberação do ACTH e das melanocortinas, sendo que as últimas têm propriedades anorexígenas. De fato, animais pré-tratados com injeção intracerebroventricular de HS014 (antagonista de receptores MC4 de melanocortina) cinco minutos antes das exposições diárias de 30 minutos à imobilização durante 5 dias não apresentam redução no consumo de alimento e no peso corpóreo (Vergoni et al., 1999). A recuperação do peso corpóreo nos animais expostos ao EI, observada no presente trabalho, poderia refletir adaptações nesse sistema.

Outra alteração fisiológica decorrente da ativação do eixo HPA induzida por estresse é o aumento da concentração da corticosterona. Mecanismos de regulação bastante complexos mantêm as concentrações dos glicocorticóides dentro de um intervalo adequado para que não haja efeitos deletérios no organismo (Munck et al., 1984). Nesse sentido, a atividade do eixo HPA é regulada para produzir respostas rápidas e eficientes e que cessem imediatamente após o estresse. A atividade do eixo HPA é controlada principalmente pelos glicocorticóides, que inibem a sua própria liberação (para revisão: Keller-Wood & Dallman, 1984).

Os glicocorticóides liberados durante a exposição ao estresse modulam a atividade do hipotálamo e da pituitária através dos mecanismos de retroalimentação negativa (para revisão: Harbuz & Lightman, 1992).

Esses mecanismos diferem entre si pelo tempo e local de ação. O mecanismo da retroalimentação negativa rápido ocorre minutos após o aumento da concentração dos glicocorticóides e atuam inibindo a liberação do CRF e da vasopressina. O mecanismo da retroalimentação negativa lento diminui a transcrição de genes essenciais para a ativação do eixo HPA, como POMC, CRF e vasopressina. Embora os efeitos sobre a transcrição gênica se iniciem logo após a ativação dos receptores de glicocorticóides, a regulação negativa demora horas ou dias para se manifestar (Akil & Morano, 1995).

Tem sido amplamente demonstrado que o eixo HPA apresenta alto grau de plasticidade. Um exemplo importante da plasticidade desse eixo são as adaptações observadas após a exposição ao estresse crônico (Martí et al., 1999; Dal-Zotto et al., 2000).

Assim, para obtermos mais informações quanto a adaptação desse sistema, determinamos as alterações das concentrações da corticosterona plasmática induzidas por imobilização vinte e quatro horas após a última exposição aos estresses agudo ou crônico.

No presente trabalho observamos que os animais de todos os grupos apresentaram aumento significativo das concentrações da corticosterona 60 minutos após o início da imobilização. Entretanto, o padrão da ativação do eixo HPA foi alterado pela exposição ao estresse crônico. Nossos resultados demonstraram que os animais expostos ao EP apresentaram a concentração de corticosterona maior se comparada à dos animais controle e EA, enquanto o grupo exposto ao EI apresentou concentração de corticosterona maior quando comparada à do grupo EA.

Esses resultados corroboram com aqueles observados por Bhatnagar & Dallman (1998). Estes autores demonstram que os animais expostos à baixas temperaturas (4 – 6°C) por 4 horas durante 7 dias apresentam aumento da resposta do eixo HPA quando submetidos a imobilização 24 horas após o término do estresse crônico.

Por outro lado, a exposição a natação forçada por 20 minutos diários durante 14 dias não altera a concentração de ACTH e corticosterona durante a subsequente exposição ao mesmo estresse (Dal-Zotto et al., 2000).

Pelo exposto acima, podemos sugerir que as adaptações das respostas do eixo HPA dependem da natureza e duração da exposição ao estresse.

O presente trabalho demonstrou também que os animais expostos ao EP e EI apresentaram elevação da concentração basal de corticosterona. Assim, o aumento da concentração basal de corticosterona após o estresse poderia estar relacionado a alterações da expressão gênica induzida pela exposição ao estresse crônico, como observado por Aguilera (1994). Esse autor revela que a exposição crônica a alguns tipos de estresses, como injeção de salina hipertônica ou choque nas patas, aumenta a expressão de RNAm do CRF no PVN e essa expressão permanece elevada por 24 horas.

Nossos resultados demonstraram ainda que as concentrações de corticosterona dos grupos controle e EI foram significativamente maiores no período da recuperação se comparadas às do período basal. Entretanto, essas concentrações são significativamente menores do que aquelas observadas após 60 minutos de imobilização indicando recuperação parcial da concentração de corticosterona. Assim, é evidente que a velocidade de recuperação da concentração

de corticosterona é mais rápida nos animais expostos à imobilização aguda ou crônica.

Alterações semelhantes na recuperação da concentração de corticosterona são observadas por Dal-Zotto et al. (2000) que utilizam um modelo diferente de estresse previsível. Os autores demonstram que animais expostos a natação forçada por 20 minutos durante 14 dias apresentam recuperação mais rápida das concentrações de corticosterona avaliada após uma exposição aguda ao mesmo estressor.

A análise conjunta desses resultados sugere que a imobilização aguda ou crônica modificou o mecanismo de retroalimentação negativa, tornando-o mais efetivo.

A discussão acima evidencia que a exposição ao estresse crônico produz alterações adaptativas no eixo HPA. Contudo, a relação com a natureza do estímulo estressor, com o tempo de exposição, bem como os mecanismos subjacentes ao estresse permanecem abertos para investigação.

Os glicocorticóides interferem na atividade de vários sistemas através dos seus receptores citoplasmáticos regulando a expressão de genes. Foram descritos dois tipos de receptores de glicocorticóides no sistema nervoso central: os receptores mineralocorticóides, localizados principalmente no sistema límbico e com maior afinidade por corticosterona, e os receptores glicocorticóides, expressos em neurônios e células da glia e com baixa afinidade pela corticosterona (De Nicola et al., 1998).

No sistema dopaminérgico os glicocorticóides atuam no terminal pré-sináptico aumentando a síntese (Markey et al., 1982) ou inibindo a recaptação do



neurotransmissor (Gilad et al., 1987). No terminal pós- sináptico os glicocorticóides diminuem a atividade da PKA (Dwivedi & Pandey, 2000).

As alterações das respostas do eixo HPA induzidas pelo estresse crônico, observadas no presente trabalho, poderiam alterar a atividade do sistema dopaminérgico e conseqüentemente o comportamento exploratório e os efeitos da cocaína. Assim, avaliamos a atividade locomotora basal e a induzida pela administração de 10 mg/kg de cocaína em animais expostos aos estresses agudo ou crônico, previsível ou imprevisível.

Nossos resultados demonstraram que a exposição ao EP alterou a atividade locomotora basal.

A literatura quanto as alterações da atividade locomotora basal após a exposição ao estresse é bastante restrita. D'Aquila et al. (2000) demonstram que a exposição ao estresse imprevisível durante 7 semanas diminui a atividade locomotora enquanto nenhuma alteração é observada nos animais expostos repetidamente à imobilização.

A exposição crônica (várias semanas) ao estresse imprevisível produz anedonia que pode expressar-se através da diminuição da atividade locomotora e também poderia relacionar-se à diminuição da atividade dopaminérgica mesolímbica (Willner, 1997; Gambarana et al., 1999).

No presente trabalho, o aumento da locomoção observado nos animais expostos ao EP indica a presença de supersensibilidade dopaminérgica e de sensibilização comportamental.

Essa hipótese foi confirmada com a observação de que o aumento da locomoção induzida pela administração aguda de 10,0 mg/kg de cocaína foi significativamente maior nos animais expostos ao EP se comparado ao dos demais

grupos. Assim, podemos concluir que a exposição ao EP, mas não ao EI, induziu a sensibilização cruzada à cocaína.

Nossos resultados estão de acordo com aqueles que demonstram a sensibilização à anfetamina após a exposição crônica ao estresse social, imobilização ou choques nas patas (Herman et al., 1984; Badiani et al., 1992; Reid et al., 1998; Miczek et al., 1999; Covington III & Miczek, 2001). Também é demonstrada a sensibilização cruzada entre o estresse crônico previsível e a cocaína utilizando-se restrição de alimento como estímulo estressor (Rougé-Pont et al. 1995).

A sensibilização cruzada entre o estresse imprevisível e a cocaína aparenta ser um fenômeno mais complexo. Assim, Prasad et al. (1998) demonstram resultados semelhantes aos do presente trabalho. Esses autores não observam qualquer sensibilização da atividade locomotora induzida pela cocaína após a exposição ao estresse imprevisível por 6 dias, quando o teste foi realizado 48 horas após a última sessão de estresse. Contudo, a sensibilização comportamental à cocaína expressou-se no momento da injeção, 13 dias após o término do estresse.

Nossos resultados revelaram que a exposição à imobilização aguda não induziu a sensibilização comportamental cruzada à cocaína. No mesmo sentido, Schmidt et al. (1999) demonstram que a exposição ao estresse agudo (choque nas patas ou injeção de interleucina-1 $\beta$ ) não induz a sensibilização cruzada à anfetamina 3 semanas após o término das sessões de estresse. Por outro lado, a sensibilização comportamental cruzada à administração aguda de 0,5 mg/kg de anfetamina é observada 24 horas após a imobilização por 2 horas (Díaz-Otañez et al., 1997). As diferenças na duração do estresse e da droga utilizada poderiam explicar essa contradição.

Uma das conseqüências da sensibilização comportamental são as alterações do efeito reforçador e da vulnerabilidade ao desenvolvimento da farmacodependência às drogas de abuso. Essas alterações são evidenciadas observando-se mudanças no padrão da auto-administração. Nesse sentido, a sensibilização à anfetamina aumenta a taxa de aquisição e o ponto de ruptura durante a auto-administração dessa mesma droga (Piazza et al., 1990; Mendrek et al.; 1998; Vezina et al., 1999).

Covington III & Miczek (2001) demonstram que a exposição ao estresse social não altera a aquisição e o ponto de ruptura da auto-administração, entretanto aumenta a auto-administração contínua (“binge”) da cocaína. Com base nessas observações os autores sugerem que a sensibilização comportamental seja a gênese do uso compulsivo de drogas.

Assim, podemos sugerir que a sensibilização comportamental observada nos animais expostos ao EP seja um fator vaticinador da predisposição ou vulnerabilidade ao uso compulsivo da cocaína.

Vários trabalhos sugerem que a corticosterona é um fator importante para o desenvolvimento da sensibilização comportamental aos psicostimulantes (Pauly et al., 1993; Piazza et al., 1994; Marinelli et al., 1997). Recentemente, o trabalho realizado por Przegalinski et al. (2000) aponta que a corticosterona facilita a expressão da sensibilização comportamental induzida por cocaína. Os autores demonstram que a sensibilização comportamental induzida pela administração de 10 mg/kg de cocaína durante 5 dias é bloqueada por adrenalectomia. Demonstram ainda uma sensibilização mais pronunciada nos animais controles que receberam administração de 10 mg/kg de corticosterona antes das injeções da cocaína.

Assim, supõe-se que os glicocorticóides estejam envolvidos na sensibilização cruzada entre o estresse e os psicostimulantes. Nesse sentido, Deroche et al. (1992) demonstram que a sensibilização comportamental à anfetamina induzida pela exposição crônica à imobilização não ocorre em animais adrenalectomizados. Esse efeito da adrenalectomia é revertido pela reposição de corticosterona.

Da mesma forma, a administração de metirapona (inibidor da síntese de corticosterona) impede o desenvolvimento de sensibilização aos efeitos da cocaína induzida pela restrição crônica de alimentos (Rougé-Pont et al., 1995).

Assim, a corticosterona aparenta atuar amplificando as respostas locomotoras da anfetamina e cocaína, sendo um fator importante no desenvolvimento da sensibilização cruzada.

Entretanto, nossos resultados demonstraram que embora tenha ocorrido aumento da concentração basal da corticosterona nos animais expostos ao estresse crônico, a sensibilização comportamental foi observada apenas naqueles submetidos ao EP.

A sensibilização cruzada à cocaína observada nos animais expostos ao EP pode estar relacionada ao aumento da concentração de corticosterona no período após o estresse se comparado ao do grupo controle. Fato esse não observado nos animais expostos ao EI.

O papel da corticosterona na sensibilização cruzada entre o estresse e os psicostimulantes é questionado por Prasad et al. (1998). Esses autores demonstram que a expressão de sensibilização comportamental cruzada entre o estresse imprevisível e a cocaína não é bloqueada por adrenalectomia quando avaliada 48 horas após a última exposição ao estresse. Entretanto, observa-se que a

sensibilização cruzada é bloqueada por adrenalectomia 13 dias após a exposição crônica ao estresse. Com isso, os autores sugerem que a corticosterona está relacionada apenas ao desenvolvimento da sensibilização tardia.

Além disso, o padrão de ativação do eixo HPA é importante para o desenvolvimento da sensibilização, uma vez que os efeitos diretos da corticosterona na atividade locomotora e nas concentrações de dopamina no núcleo acumbens dependem do ritmo circadiano (Piazza et al., 1996). O padrão temporal da ativação do eixo HPA e, conseqüentemente, o aumento da corticosterona nos protocolos utilizados nos nossos experimentos são diferentes ao longo das 24 horas, e isso poderia contribuir para a diferença da expressão da sensibilização comportamental.

Como a sensibilização comportamental aos psicostimulantes parece ser um efeito comum decorrente da exposição a diferentes tipos de estresse (Badiani et al., 1992; Díaz-Otañez et al., 1997), a ausência da sensibilização comportamental nos animais expostos ao EI, no presente trabalho, poderia ser decorrente de três fatores: intensidade, previsibilidade ou latência para a injeção de cocaína.

Atualmente, o mecanismo molecular mais aceito para o desenvolvimento da sensibilização comportamental à cocaína e outros psicofármacos é a supersensibilidade da via AMPc / PKA (Nestler & Aghajanian, 1997).

Embora os mecanismos neuroquímicos pelos quais o estresse induz a sensibilização cruzada com os psicostimulantes ainda não sejam conhecidos, supõe-se que esses mecanismos estejam relacionados às ações da corticosterona sobre o sistema de transdução da via dopaminérgica. Nesse sistema os glicocorticóides podem: a) aumentar da concentração de dopamina ou b) agir diretamente sobre os componentes do sistema de transdução dopaminérgica. Sendo que ambos os mecanismos podem levar a adaptações da via AMPc / PKA.

Poucos trabalhos na literatura avaliaram a influência da natureza do estímulo estressor nas alterações do sistema de transdução das vias dopaminérgicas. Com o propósito de contribuir para a compreensão dessa inter-relação avaliamos os efeitos da exposição aos estresses agudo ou crônico na atividade da PKA no corpo estriado e no núcleo acumbens vinte e quatro horas após a última exposição ao estresse.

Nossos resultados demonstraram que a exposição ao EI diminuiu a atividade da PKA no corpo estriado, enquanto no núcleo acumbens a exposição ao EI aumentou a atividade da enzima.

Resultado semelhante foi obtido por Ortiz et al. (1996) no núcleo acumbens. Os autores demonstram que a exposição ao estresse imprevisível durante 10 dias induz aumento da atividade da PKA e diminuição da concentração da proteína  $G_{i\alpha}$ , enquanto a imobilização por 45 minutos durante 10 dias não altera a atividade da PKA. Demonstram ainda que as alterações no sistema de transdução do núcleo acumbens dependem da linhagem de ratos utilizada, já que o aumento da atividade da PKA e a diminuição de  $G_{i\alpha}$  são observadas somente nos animais da linhagem Fischer e não nos das linhagens Sprague-Dawley ou Lewis. Entretanto, os autores não avaliam as alterações da atividade da PKA no corpo estriado dos animais submetidos ao estresse crônico.

No presente trabalho, a diferença na atividade da PKA no corpo estriado e no núcleo acumbens provocada por exposição ao EI indica que os eventos “pós-receptor” adaptaram-se de maneiras diferentes.

A diminuição da atividade da PKA no corpo estriado pode ser explicada pelo aumento da concentração de corticosterona apresentada pelo grupo exposto ao EI. Nesse sentido, foi demonstrado que a corticosterona diminui o número de sítios

para a ligação do AMPc, a atividade, bem como a expressão das subunidades catalítica (Cat $\beta$ ) e regulatórias (RI $\beta$  e RII $\beta$ ) da PKA (Dwivedi & Pandey, 2000).

Entretanto, essa explicação não se aplica ao aumento da atividade da PKA no núcleo acumbens. Essa contradição poderia relacionar-se ao predomínio da ação da corticosterona nos terminais pré-sinápticos do núcleo acumbens, a qual aumentaria as concentrações de dopamina na fenda sináptica (Piazza et al., 1996), ou ainda no terminal pós-sináptico onde a corticosterona aumenta a atividade da adenilil ciclase e a concentração de Gs $\alpha$  e diminui a concentração de Gi $\alpha$  (Johnson & Jaworski, 1983; Saito et al., 1989).

Embora o mecanismo molecular mais aceito para explicar a sensibilização comportamental seja a supersensibilidade da via AMPc / PKA, Crawford et al. (1998) demonstram que a sensibilização comportamental induzida por administração crônica de metilfenidato está relacionada com a diminuição da atividade da PKA no corpo estriado.

Ao contrário dos trabalhos anteriores que apontam a relação da sensibilização comportamental com a via AMPc / PKA, no presente trabalho demonstramos que a sensibilização comportamental cruzada entre o EP e a cocaína não se correlaciona com a atividade da PKA no corpo estriado e no núcleo acumbens.

A análise conjunta dos resultados demonstra que a exposição ao estresse crônico pode alterar vários parâmetros relacionados ao aumento da vulnerabilidade ao desenvolvimento da farmacodependência à cocaína e contribui para evidenciar a complexidade das relações entre o estresse e o abuso de drogas.

## 10. Conclusões

- Exposição crônica ao estresse diminui o ganho do peso corpóreo
- Exposição ao estresse crônico provoca alterações nas respostas do eixo HPA
- Exposição ao estresse crônico previsível aumenta a atividade locomotora basal
- Exposição ao estresse crônico previsível induz a sensibilização comportamental cruzada à cocaína
- Exposição ao estresse imprevisível diminui a atividade da PKA no corpo estriado e aumenta a atividade da enzima no núcleo acumbens
- Alterações na atividade da PKA não estão relacionadas com o desenvolvimento da sensibilização comportamental cruzada entre estresse e cocaína



## 11. Referências Bibliográficas

1. ABERCROMBIE, E.D.; KEEFE, K.A.; DIFRISCHIA, D.S.; ZIGMOND, M.J. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. **J. Neurochem.**, v. 52, p. 1655-1658, 1989.
2. AGUILERA, G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 9, n. 8, p. 329-336, 1998.
3. AGUILERA, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. **Front Neuroendocrinol.**, v. 15, p. 321-350, 1994.
4. AKIL, H.A.; MORANO, M.I. Stress. In: BLOOM, F.E; KUPFER, D.J. (Eds.). **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. New York: Raven, 1995. p. 773-785.
5. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Cell signaling. In: ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. (Eds.). **Molecular Biology of the cell**. New York: Garland Publ., 1994. p. 721-785.
6. BADIANI, H.; SIMONA, C.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Chronic stress induces strain-dependent sensitization to the behavioral effects of amphetamine in the mouse. **Pharmacol. Biochem. Beh.**, v. 43, p. 53-60, 1992.
7. BERRIDGE, K.C.; ROBINSON, T.E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 309-369, 1998.

8. BHATNAGAR, S.; DALLMAN, M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. **Neuroscience**, v. 84, n. 4, p. 1025-1039, 1998.
9. BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; RODGERS, J.; WEISS, S.M. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neurosci. Biobehav.**, v. 14, p. 463-472, 1990.
10. BRADLEY, B.P.; PHILLIPS, G.; GREEN, L.; GOSSOP, M. Circumstances surrounding the initial lapse to opiate use following de detoxification. **Br. J. Psychiatry**, v. 154, p. 354-359, 1989.
11. CABIB, S.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Different effects of repeated stressful experiences on mesocortical and mesolimbic dopamine metabolism. **Neuroscience**, v. 73, p. 375-380, 1996.
12. CASTAÑEDA, E.; BECKER, J.B.; ROBINSON, T.E. The long-term effects of repeated amphetamine treatment in vivo on amphetamine, KCl and electrical stimulation evoked striatal dopamine release in vitro. **Life Sci.**, v. 42, n. 24, p. 2447-2456, 1988.
13. COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. Amino acid transmitters. In: \_\_\_\_\_. **The biochemical basis on neuropharmacology**. 7<sup>th</sup> ed., New York: Oxford University Press, 1996. p. 178-193.
14. COVINGTON III, H.E.; MICZEK, K.A. Repeated social defeat stress or morphine: effects on behavioral sensitization and IV cocaine self-administration "binges". **Psychopharmacology**, 2001. (no prelo)
15. CRAWFORD, C.A.; McDOUGALL, S.A.; MEIER, T.L.; COLLINS, R.L.; WATSON, J.B. Repeated methylphenidate treatment induces behavioral sensitization and decreases protein kinase A and dopamine-stimulated adenylyl

- cyclase activity in the dorsal striatum. **Psychopharmacology**, v. 136, p. 34-43, 1998.
16. CUADRA, G.; ZURITA, A.; LACERRA, C.; MOLINA, V. Chronic stress sensitizes frontal cortex dopamine release in response to a subsequent novel stressor: reversal by naloxone. **Brain Res. Bull.**, v. 48, n. 3, p. 303-308, 1999.
  17. DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; SCRIBNER, K. A. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamus pituitary adrenal axis. **J. Neuroendocrinol.**, v. 4, p. 517-526, 1992.
  18. DAL-ZOTTO, S.; MARTI, O.; ARMARIO, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. **Behav. Brain Res.**, v. 114, n. 1/2, p. 175-181, 2000.
  19. D'AQUILA, P.S.; PEANA, A.T.; CARBONI, V.; SERRA, G. Exploratory behaviour and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 399, n. 1, p. 43-47, 2000.
  20. DE NICOLA, A.F.; FERRINI, M.; GONZALEZ, S.L.; GONZALEZ DENISELLE M.C.; GRILLO, C.A.; PIROLI, G.; SARAVIA, F.; DE KLOET, E.R. Regulation of gene expression by corticoid hormones in the brain and spinal cord. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 65, n. 1/6, p. 253-272, 1998.
  21. DEROUCHE, V.; PIAZZA, P.V.; CASOLINI, P.; MACCARI, S.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Stress-induced sensitization to amphetamine and morphine psychomotor effects depend on stress-induced corticosterone secretion. **Brain Res.**, v. 598, n. 1/2, p. 343-348, 1992.
  22. DESS, N.K.; MINOR, T.R.; BREWER, J. Suppression of feeding and body weight by inescapable shock: Modulation by quinine adulteration, stress reinstatement, and controllability. **Physiol. Behav.**, v. 45, p. 975-983, 1989.

23. DIAZ-OTANEZ, C.S.; CAPRILES, N.R.; CANCELA, L.M. D1 and D2 dopamine and opiate receptors are involved in the restraint stress-induced sensitization to the psychostimulant effects of amphetamine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 58, n. 1, p. 9-14, 1997.
24. DWIVEDI, Y.; PANDEY, G.N. Adrenal glucocorticoids modulate [3H] cyclic AMP binding to protein kinase A (PKA), cyclic AMP-dependent PKA activity, and protein levels of selective regulatory and catalytic subunit isoforms of PKA in rat brain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 294, p. 103-116, 2000.
25. EBERLE, A.N. **The melanotropins: chemistry, physiology and mechanisms of action.** Basel: Karger, 1988. p. 173-208.
26. EDWARDS, G.; ARIF, A.; HADGSON, R. Nomenclature and classification of drug- and alcohol-related problems: a WHO Memorandum. **Bull. World Health Organ.**, v. 59, n. 2, p.225-242, 1981.
27. ERB, S.; SHAHAM, Y.; STEWART, J. Stress reinstates cocaine-seeking behavior after prolonged extinction and a drug-free period. **Psychopharmacology**, v. 128, p. 408-412, 1996.
28. GAMBARANA, C.; MASI, F.; TAGLIAMONTE, A.; SCHEGGI, S.; GHIGLIERI, O.; DE MONTIS, M.G. A chronic stress that impairs reactivity in rats also decreases dopaminergic transmission in the nucleus accumbens: a microdialysis study. **J. Neurochem.**, v. 72, n. 5, p. 2039-2046, 1999.
29. GAWIN, F.H. Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. **Science**, v. 251, p. 1580-1586, 1991.
30. GILAD, G.M.; RABEY, J.M.; GILAD, V.H. Presynaptic effects of glucocorticoids on dopaminergic and cholinergic synaptosomes. Implications for rapid

- endocrine-neural interactions in stress. **Life Sci.**, v. 40, n. 25, p. 2401-2408, 1987.
31. GIROS, B.; JABER, M.; JONES, S.R.; WIGHTMAN, R.M.; CARON, M.G. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 606-612, 1996.
  32. GOEDERS, N.E.; GUERIN, G.F. Non-contingent electric fooshock facilitates the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v. 114, p. 63-70, 1994.
  33. GOEDERS, N.E.; GUERIN, G.F. Role of corticosterone in intravenous cocaine self-administration in rats. **Neuroendocrinology**, v. 64, p. 337-348, 1996.
  34. HARBUZ, M.S.; LIGHTMAN, S.L. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. **J. Endocrinol.**, v. 134, n. 3, p. 327-339, 1992.
  35. HERMAN, J.P.; STINUS, L.; LEMOAL, M., Repeated stress increases the locomotor response to amphetamnine. **Psychopharmacology**, v. 84, p. 431-435, 1984.
  36. HYMAN, S.E. Addiction to cocaine and amphetamine. **Neuron**, v. 16, n. 5, p. 901-904, 1996.
  37. IZENWASSER, S. Basic pharmacological mechanisms of cocaine. In: HIGGINS, S.T.; KATZ, J.L (Eds.). **Cocaine abuse: behavior, pharmacology and clinical applications**, San Diego: Academic, 1998. p. 1-20.
  38. JAFFE, J.H. Drug addiction and drug abuse. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. (Eds.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 8<sup>th</sup> ed. New York: Pergamon, 1990. p. 523-573.

39. JOHNSON, G.S.; JAWORSKI, C.J. Glucocorticoids increase GTP-dependent adenylate cyclase activity in cultured fibroblasts. **Mol. Pharmacol.**, v. 23, n. 3, p. 648-652, 1983.
40. KALIVAS, P.W.; DUFFY, P. Selective activation of dopamine transmission in the shell of the nucleus accumbens by stress. **Brain Res.**, v. 675, p. 325-328, 1995.
41. KALIVAS, P.W.; DUFFY, P. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. **J. Neurosci.**, v. 13, n. 1, p. 266-275, 1993.
42. KALIVAS, P.W.; STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 16, n. 3, p. 223-244, 1991.
43. KELLER-WOOD, M.E.; DALLMAN, M.F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. **Endocr. Rev.**, v. 5, n. 1, p. 1-24, 1984.
44. KOOB, G.F. Drug addiction: The Yin and Yang of hedonic homeostasis. **Neuron**, v. 16, p. 893-896, 1996.
45. KOOB, G.F. Neural mechanisms of drug reinforcement. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 654, p. 171-191. 1992.
46. LEWIS, E.J.; TANK, A.W.; WEINER, N.; CHIKARAISHI, D.M. Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA by glucocorticoid and cyclic AMP in a rat pheochromocytoma cell line. Isolation of a cDNA clone for tyrosine hydroxylase mRNA. **J. Biol. Chem.**, v. 258, n. 23, p. 14632-14637, 1983.
47. MARINELLI, M.; ROUGE-PONT, F.; DE JESUS-OLIVEIRA, C.; LE MOAL, M.; PIAZZA, P.V. Acute blockade of corticosterone secretion decreases the

- psychomotor stimulant effects of cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 156-161, 1997.
48. MARKEY, K.A.; TOWLE, A.C.; SZE, P.Y. Glucocorticoid influence on tyrosine hydroxylase activity in mouse locus coeruleus during postnatal development. **Endocrinology**, v. 111, n. 5, p. 1519-1523, 1982.
49. MARTI, O.; MARTI, J.; ARMARIO, A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. **Physiol. Behav.**, v. 55, n. 4, p. 747-753, 1994.
50. MARTI, O.; HARBUZ, M.S.; ANDRES, R.; LIGHTMAN, S.L.; ARMARIO, A. Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomised rats: potentiation by chronic stress. **Brain Res.**, v. 821, n. 1, p. 1-7, 1999.
51. MENDREK, A.; BLAHA, C.D.; PHILLIPS, A.G. Pre-exposure of rats to amphetamine sensitizes self-administration of this drug under a progressive ratio schedule. **Psychopharmacology**, v. 135, n. 4, p. 416-422, 1998.
52. MICZEK, K.A.; MUTSCHLER, N.H. Activational effects of social stress on IV cocaine self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v. 128, p. 256-264, 1996.
53. MICZEK, K.A.; MUTSCHLER, N.H.; VAN ERP, A.M.; BLANK, A.D.; McINERNEY, S.C. d-amphetamine "cue" generalizes to social defeat stress: behavioral sensitization and attenuated accumbens dopamine. **Psychopharmacology**, v. 147, n. 2, p.190-199, 1999.
54. MISERENDINO, M.J.; NESTLER, E.J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. **Brain Res.**, v. 674, p. 299-306, 1995.

55. MORINOBU, S.; NIBUYA, M.; DUMAN, R. Chronic antidepressant treatment down-regulates the induction of c-fos mRNA in response to acute stress in rat frontal cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 12, p. 221-228, 1995.
56. MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocrine Rev.**, v. 5, p. 25-55, 1984.
57. NERR, E.J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. **Cell**, v. 80, p. 249-257, 1995.
58. NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**, v. 278, p. 58-63, 1997.
59. O'BRIEN, C.P.; EHRMAN, R.N.; TERNES, J.W. Classical conditioning in human opioid dependence. In: GOLDBERG, S.R.; STOLERMAN, I.P. (Eds.). **Behavioral analysis of drug dependence**. Orlando: Academic, 1986. p. 329-356.
60. ORTIZ, J.; FITZGERALD, L.W.; LANE, S.; TERWILLINGER, R.; NESTLER, E.J. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 6, p. 443-452, 1996.
61. OTTENWELLER, J.E.; SERVATIUS, R.J.; TAPP, W.N.; DRASTAL, S.D.; BERGEN, M.T.; NATELSON, B.H. A chronic stress state in rats: Effects of repeated stress on basal corticosterone and behavior. **Physiol. Behav.**, v. 51, p. 689-698, 1992.
62. PAULY, J.R.; ROBINSON, S.F.; COLLINS, A.C. Chronic corticosterone administration enhances behavioral sensitization to amphetamine in mice. **Brain Res.**, v. 620, n. 2, p. 195-202, 1993.



63. PIAZZA, P.V.; LE MOAL, M. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 359-378, 1996.
64. PIAZZA, P.V.; LE MOAL, M. The role of stress in the drug self-administration. **TIPS**, v. 19, p. 67-74, 1998.
65. PIAZZA, P.V.; DEMINIERE, J.M.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. **Brain Res.**, v. 514, n. 1, p. 22-26, 1990.
66. PIAZZA, P.V.; ROUGE-PONT, F.; DEROCHE, V.; MACCARI, S.; SIMON, H.; LE MOAL, M. Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 16, p. 8716-8720, 1996.
67. PIAZZA, P.V.; MARINELLI, M.; JODOGNE, C.; DEROCHE, V.; ROUGE-PONT, F.; MACCARI, S.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Inhibition of corticosterone synthesis by Metyrapone decreases cocaine-induced locomotion and relapse of cocaine self-administration. **Brain Res.**, v. 658, n. 1/2, p. 259-264, 1994.
68. PITMAN, D.L.; OTTENWELLER, J.E.; NATELSON, B.H. Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. **Behav. Neurosci.**, v. 104, n. 1, p. 28-36, 1990.
69. PLANETA, C.S.; SCAVONE, C.; DE LUCIA, R.; AIZENTEIN, M.L. Behavioral effects of long-term administration of fencamfamine: Neurochemical implications. **Gen. Pharmacol**, v. 18, p. 299-301, 1987.
70. POST, R.M.; CONTEL, N.R. Human and animal studies of cocaine: implications of development of behavioral pathology. In: CREESE, I. (Ed.). **Stimulants:**

**neurochemical, behavioral and clinical perspectives.** New York: Raven, 1983. p. 169-203.

71. PRASAD, B.M.; ULIBARRI, C.; SORG, B.A. Stress-induced cross-sensitization to cocaine: effect of adrenalectomy and corticosterone after short- and long-term withdrawal. **Psychopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 24-33, 1998.
72. PRZEGALINSKI, E.; FILIP, M.; SIWANOWICZ, J.; NOWAK, E. Effect of adrenalectomy and corticosterone on cocaine-induced sensitization in rats. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 51, n. 2, p. 193-204, 2000.
73. RAMSEY, N.F.; VAN REE, J.M. Emotional but not physical stress enhances intravenous cocaine self-administration in drug-naive rats. **Brain Res.**, v. 608, p. 216-222, 1993.
74. RANDRUP, A.; MUNKVAD, I. Brain dopamine and amphetamine-induced stereotyped behaviour. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v. 25, Suppl., p. 4-62, 1967.
75. REID, M.S.; HO, L.B.; TOLLIVER, B.K.; WOLKOWITZ, O.M.; BERGER, S.P. Partial reversal of stress-induced behavioral sensitization to amphetamine following metyrapone treatment. **Brain Res.**, v. 783, n. 1, p. 133-142, 1998.
76. ROBINSON, T.E. Behavioral sensitization: characterization of enduring changes in rotational behavior produced by intermittent injections of amphetamine in male and female rats. **Psychopharmacology**, v. 84, n. 4, p. 466-475, 1984.
77. ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Behavioral sensitization is accompanied by an enhancement in amphetamine-stimulated dopamine release from striatal tissue in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 85, n. 2, p. 253-254, 1982.
78. ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of

- animal models of amphetamine psychosis. **Brain Res. Rev.**, v. 396, p. 157-198, 1986.
79. 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, n. 3, p. 247-291, 1993.
80. RODGERS, R.J.; COLE, J.C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiol. Behav.**, v. 53, p. 383-388, 1993.
81. ROMIER, C.; BERNASSAU, J.M.; CABBILLAU, C.; DARBON, H. Solution of structure of human corticotropin releasing factor by HNMR and distance geometry with restrained molecular dynamics. **Prot. Eng.**, v. 6, p. 149-156, 1993.
82. ROUGE-PONT, F.; MARINELLI, M.; LE MOAL, M.; SIMON, H.; PIAZZA, P.V. Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 11, p. 7189-7195, 1995.
83. ROUGÉ-PONT, F.; PIAZZA, V., KHAROUBY, M.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Higher and longer stress-induced increase in dopamine concentrations in the nucleus accumbens of animals predisposed to amphetamine self-administration. A microdialysis study. **Brain Res.**, v. 602, p. 169-174, 1993.
84. SAITO, N.; GUITART, X.; HAYWARD, M.; TALLMAN, J.F.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. Corticosterone differentially regulates the expression of Gs alpha and Gi alpha messenger RNA and protein in rat cerebral cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 86, n. 10, p. 3906-3910, 1989.

85. SARNYAI, Z.; BIRO, E.; PENKE, B.; TELEGDY, G. The cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in rats. **Brain Res.**, v. 589, n. 1, p. 154-156, 1992.
86. SARNYAI, Z.; MELLO, N.K.; MENDELSON, J.H.; NGUYEN, P.H.; EROS-SARNYAI, M. Effects of cocaine and corticotropin-releasing factor on pulsatile ACTH and cortisol release in ovariectomized rhesus monkeys. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, n. 9, p. 2745-2751, 1995.
87. SCHMIDT, E.D.; TILDERS, F.J.; BINNEKADE, R.; SCHOFFELMEER, A.N.; DE VRIES, T.J. Stressor- or drug-induced sensitization of the corticosterone response is not critically involved in the long-term expression of behavioural sensitization to amphetamine. **Neuroscience**, v. 92, n. 1, p. 343-352, 1999.
88. SHAHAM, Y.; STEWART, J. Exposure to mild stress enhances the reinforcing efficacy of intravenous heroine self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v. 118, p. 523-527, 1994.
89. SHAHAM, Y.; STEWART, J. Stress reintates heroin self-administration behavior in drug-free animals: an effect mimicking heroin heroin, not withdrawal. **Psychopharmacology**, v. 119, p. 334-341, 1995.
90. SHENG, M.; GREENBERG, M.E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, v. 4, n. 4, p. 477-485, 1990.
91. SINHA, R.; CATAPANO, D.; O'MALLEY, S. Stress-induced craving and stress response in cocaine dependent individuals. **Psychopharmacology**, v. 142, n. 4, p. 343-351, 1999.

92. STEENBERGEN, H.L.; FARABOLLINI, F.; HEINSBROEK, R.P.W.; VAN DE POLL, N.E. Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. **Behav. Brain Res.**, v. 43, p. 159-165, 1991.
93. TEOH, S.K.; SARNYAI, Z.; MENDELSON, J.H.; MELLO, N.K.; SPRINGER, S.A.; SHOLAR, J.W.; WAPLER, M.; KUEHNLE, J.C.; GELLES, H. Cocaine effects on pulsatile secretion of ACTH in men. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 270, n. 3, p. 1134-1138, 1994.
94. TERWILLIGER, R.Z.; BEITNER-JOHNSON, D.; SEVARINO, K.A. CRAIN, S.M.; NESTLER, E.J. A general role for adaptations in G-protein and cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuron functions. **Brain Res.**, v. 548, p. 100-110, 1991.
95. VANDERSCHUREN, L.J.M.J.; KALIVAS, P.W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology**, v. 151, p. 99-120, 2000.
96. VERGONI, A.V.; BERTOLINI, A.; WIKBERG, J.E.; SCHIOTH, H.B. Selective melanocortin MC4 receptor blockage reduces immobilization stress-induced anorexia in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 369, n. 1, p. 11-15, 1999.
97. VEZINA, P.; PIERRE, P.J.; LORRAIN, D.S. The effect of previous exposure to amphetamine on drug-induced locomotion and self-administration of a low dose of the drug. **Psychopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 125-134, 1999.
98. WALLACE, B.C. Psychological and environmental determinants of relapse in crack cocaine smokers. **J. Subst. Abuse Treat.**, v. 6, p. 95-106, 1989.

99. WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, n. 4, p. 319-329, 1997.
100. WINER. B.J. **Statistical principles in experimental design**. New York: McGraw-Hill, 1971. p. 907.
101. WISE, R.A. The role of reward pathways in the development of drug dependence. In: BALFOUR, D.J.K. (Ed.). **Psychotropic Drugs of Abuse**. Oxford: Pergamon, 1990. p. 23-57.
102. WOLF, M.E.; WHITE, F.J.; NASSAR, R.; BROODERSON, R.J.; KHANSA, M.R. Differential development of auto-receptor release during amphetamine sensitization. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 264, p. 249-255, 1993.
103. WOODMANSEE, W.W.; SILBERT, L.H.; MAIER, S.F. Factors that modulate inescapable shock-induced reductions in daily activity in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 45, p. 553-559, 1993.