



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF**

**ASSOCIAÇÃO UFSCar/UNESP**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA**

**LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA**

**CELINA FERRARI LAVERDE**

**SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL AO ETANOL EM  
CAMUNDONGOS: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA  
(DELTA)FOSB E POSSÍVEIS EFEITOS DA LATERALIZAÇÃO NA VIA  
MESOCORTICOLÍMBICA**

**ARARAQUARA – SP**

**2019**

**CELINA FERRARI LAVERDE**

**SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL AO ETANOL EM  
CAMUNDONGOS: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA  
(DELTA)FOSB E POSSÍVEIS EFEITOS DA LATERALIZAÇÃO NA VIA  
MESOCORTICOLÍMBICA**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin

ARARAQUARA – SP

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**


Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

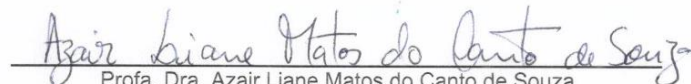
---

**Folha de Aprovação**

---


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Celina Ferrari Laverde, realizada em 06/05/2019:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Azair Liane Matos do Cantô de Souza  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz  
UNIFESP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Fábio Cardoso Cruz e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ao) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Alexandre e Conceição**, os verdadeiros responsáveis por esta conquista. Sempre serei imensamente agradecida por nunca terem medido esforços para que eu tivesse a melhor educação possível.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin**, pela paciência infindável e pela confiança em meu trabalho. Muito obrigada por todo conhecimento transmitido, por ter sido compreensivo nos meus momentos de dificuldade e pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

Ao **PEnsAD (Grupo de Pesquisa e Ensino sobre Álcool e outras Drogas)**, por todo trabalho íntegro e de excelência desenvolvido dentro e fora do laboratório. Obrigada a todos os idealizadores e integrantes desse grupo que me ensinaram a importância de tornar a ciência acessível à população.

A **Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanessa Cristiane Santana Amaral**, que desde que a conheci se tornou uma grande amiga. Mesmo de longe me ajudou inúmeras vezes, me aconselhou e contribuiu muito para minha formação pessoal e profissional. Foi uma satisfação ter trabalhado e aprendido tanto com você. Obrigada por todo carinho e amizade.

Aos amigos do meu grupo de pesquisa, **Carlos, Gessynger e Lígia**, pelo companheirismo e por dividir a trajetória de vocês comigo. Foi um grande aprendizado ter compartilhado o ANY-maze e as bancadas do laboratório com vocês.

Ao **Carlos, Gabriel, Gessynger, Leandro, Lucas Gomes, Ricardo e Willian**, amigos que fiz no laboratório e que pretendo levar para vida. Foram eles que me sustentaram ao longo desses anos, trouxeram alegria para os meus dias e fizeram do nosso ambiente de trabalho um lugar muito mais leve e divertido. Seria difícil imaginar o meu período de

mestrado sem a companhia desses meninos. Do fundo do meu coração, obrigada a cada um de vocês.

Aos demais colegas do Laboratório de Farmacologia, **Carlos Eduardo (Cadu), Diego, Lígia, Lucas Canto, Marion, Matheus (Capiau), Nathália (Bang), Paula (Pupu), Rodrigo e Tatiani (Tati)**, por terem me recebido com tanto carinho nesse grupo incrível de neuropsicofarmacologistas. Vou guardar com alegria todos os bons momentos que compartilhamos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia da FOAr/UNESP com quem dividi diversos momentos de alegria, companheirismo e amizade: **Diule, Emilson, Jéssica e Marlusa**.

A **Tirene**, agradeço pela extrema competência profissional, por todo amparo emocional, pelas conversas sempre enriquecedoras, pelos puxões de orelha, pelos conselhos, por me ouvir com paciência e por fazer o melhor café de toda faculdade. Obrigada pela empatia e amizade.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza** e ao **Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani**, por serem sempre solícitos em contribuir com a formação de todos nós, alunos de pós-graduação.

A **Elizabete e Rosana**, que deixaram saudades no laboratório. Tive sorte de ainda encontrá-las pelo caminho e sou muito agradecida por tudo que aprendi com elas.

A **Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, mais especificamente a **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCF)**, lugar onde me formei farmacêutica, onde me sinto em casa, onde construí amizades e lembranças para uma vida toda. Espero que daqui a alguns anos este lugar ainda seja uma referência de educação pública gratuita, acessível e de qualidade.

A **Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)**, lugar onde sempre quis estar desde os tempos dos vestibulares. Quando me percebi aluna de pós-graduação desta Universidade tive certeza de que o “destino” agiu em meu favor. Aprendi com esse pequeno simbolismo que tudo acontece exatamente no tempo em que tem que acontecer. E ao relembrar o que Machado de Assis escreve em “Esaú e Jacó” reforço cada vez mais esse aprendizado. *“Não se luta contra o destino; o melhor é deixar que nos pegue pelos cabelos e nos arraste até onde queira alçar-nos ou despenhar-nos.”*

Ao **Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação UFSCar/ UNESP (PIPGCF)**, pelo suporte acadêmico e pela oportunidade de realização do meu mestrado.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** – Código de Financiamento 001 e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo nº 2014/02371-9, pelo auxílio financeiro concedido para a realização desse projeto.

*“É um pequeno mundo que acaba no momento em que percebemos que já não seremos bailarinas clássicas, jogadores de futebol ou escreveremos o romance que mudará a história da literatura universal ou faremos a descoberta que nos levará ao Nobel – no exato instante em que descobrimos que precisamos adaptar nossos grandes planos (...) A cada um desses pequenos apocalipses temos a chance de recomeçar. Partidos, aos pedaços, às vezes colados como um Frankenstein de filme B. Enquanto o meteoro não chega, há sempre um possível que podemos inventar. Se os anúncios de fim do mundo servem para alguma coisa, é para nos lembrar de que o mundo acaba mesmo. Não em apoteose coletiva, com dia e hora determinados, mas na tragédia individual, sem alarde e sem aviso prévio, que desde sempre está marcada na vida de cada um de nós”.*

*Eliane Brum*

*“A ciência mostra a realidade independente do que achamos  
ou gostaríamos. Com ela podemos dizer: “faça-se luz” e  
torne o invisível, visível”.*

*Atila Iamarino*



*“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem  
ela tampouco a sociedade muda”.*

*Paulo Freire*

## RESUMO

Um dos principais desafios da pesquisa sobre o abuso de etanol é desvendar as alterações cerebrais responsáveis pela transição do uso recreativo de drogas para a dependência. Neste contexto, a sensibilização comportamental tem sido usada como um modelo de neuroplasticidade induzida pela administração repetida de drogas de abuso. A proteína  $\Delta$ FosB é um fator de transcrição que se acumula no interior dos neurônios após a exposição crônica à substâncias de abuso e constitui uma das mais importantes neuroadaptações induzidas pelo uso de drogas. Dados recentes sugeriram um papel distinto dos hemisférios cerebrais na modulação das emoções. No entanto, atualmente existem poucos estudos sobre lateralização cerebral e alterações comportamentais induzidas pelo etanol ou neuroplasticidade. Neste contexto, avaliamos a expressão de  $\Delta$ FosB em áreas encefálicas relacionadas a dependência, comparando os hemisférios cerebrais direito e esquerdo. Para isso, camundongos Suíços machos foram submetidos ao procedimento de sensibilização comportamental com repetidas administrações i.p. de etanol ou veículo. De acordo com o aumento na atividade locomotora induzida pelo etanol, os animais foram separados em três grupos experimentais: Controle, EtOH-Sensibilizado e EtOH-Não Sensibilizado. Posteriormente, os camundongos tiveram os cérebros processados para a técnica de imunohistoquímica. Observamos que o grupo EtOH-Sensibilizado aumentou a expressão de  $\Delta$ FosB em ambos os hemisférios do estriado dorsal e córtex infralímbico. Entretanto, no córtex orbitofrontal e no núcleo accumbens *shell*, o aumento de  $\Delta$ FosB ocorreu apenas no hemisfério esquerdo. Em contraste, o grupo EtOH-Não Sensibilizado demonstrou expressão elevada de  $\Delta$ FosB em ambos os hemisférios na ínsula granular / disgranular, mas apenas no hemisfério direito do córtex orbitofrontal, do córtex cingulado e da área tegmental ventral. Na amígdala central, todos os grupos tratados com etanol aumentaram a expressão de  $\Delta$ FosB apenas no hemisfério direito. Nossos resultados sugerem o predomínio da neuroplasticidade no hemisfério esquerdo de animais comportamentalmente sensibilizados ao etanol. Enquanto a neuroplasticidade no hemisfério direito parece proteger os animais das alterações comportamentais induzidas pelo etanol.

**Palavras-chave:** álcool, dependência, sensibilização comportamental, lateralização, neuroadaptações, deltaFosB.

## ABSTRACT

One of the main challenges of ethanol addiction research is to unveil the brain changes responsible for the transition from recreational drug use to addiction. In this context, behavioral sensitization has been used as a model of neuroplasticity induced by repeated administration of abuse drugs.  $\Delta$ FosB is a transcription factor that accumulates in the brain after chronic drug exposure and constitutes one of the most important neuroplastic alteration induced by repeated drug use. Recent data have suggested a distinct role of brain hemispheres in modulation of emotions. However, there are no studies about brain lateralization and ethanol-induced behavioral alterations or neuroplasticity. Thus, we evaluated the expression of  $\Delta$ FosB in brain areas related to alcohol effect comparing the right and left brain hemispheres. For this, Swiss mice were submitted to behavioral sensitization procedure with ethanol or vehicle repeated i.p. administrations. According to their increase on ethanol-induced locomotor activity they were separated in EtOH-Sensitized and EtOH-Not Sensitized or Vehicle treated. Later, mice had their brain processed for  $\Delta$ FosB immunohistochemistry. We observed that EtOH-Sensitized group has increased  $\Delta$ FosB expression in in both hemispheres of dorsal medial striatum and infralimbic cortex. In the orbitofrontal cortex and nucleus accumbens shell, the increase of  $\Delta$ FosB occurred only in the left hemisphere. In contrast, EtOH-Not Sensitized group demonstrated an elevated  $\Delta$ FosB expression in both hemispheres in granular/disgranular insular cortex but only in right hemisphere of orbitofrontal cortex, cingulate cortex and ventral tegmental area. In central amygdala all groups treated with ethanol had increased  $\Delta$ FosB expression only in right hemisphere. Our results point predominance of neuroplasticity in the left hemisphere of ethanol behaviorally sensitized animals while neuroplasticity in the right hemisphere seems to protect from ethanol behavioral alterations.

**Keywords:** alcohol, addiction, behavioral sensitization, brain lateralization, neuroadaptations, deltaFosB.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Representação esquemática do sistema mesocorticolímbico e nigroestriatal no encéfalo humano e de roedor.....	22
<b>Figura 2-</b> Base bioquímica das proteínas FosB e $\Delta$ FosB.....	26
<b>Figura 3-</b> Secções coronais das regiões e sub-regiões encefálicas.....	35
<b>Figura 4-</b> Representação gráfica do protocolo experimental e sensibilização comportamental induzida pelo etanol.....	37
<b>Figura 5-</b> Número de neurônios positivos para $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito no córtex Cgl.....	39
<b>Figura 6-</b> Número de neurônios positivos para $\Delta$ FosB no córtex PrL.....	41
<b>Figura 7-</b> Número de neurônios positivos para $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito no córtex IL.....	42
<b>Figura 8-</b> Número de neurônios positivos para $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito no OFC.....	44
<b>Figura 9-</b> Número de neurônios positivos para $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito no AcbC.....	46
<b>Figura 10-</b> Número de neurônios positivos para $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito no AcbS.....	47
<b>Figura 11-</b> Número de neurônios positivos para $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito no DmS.....	48
<b>Figura 12-</b> Número de neurônios positivos para $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito na BLA.....	50

**Figura 13-** Número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito na CeA..... 51

**Figura 14-** Número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito na AIV..... 53

**Figura 15-** Número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito na GDI..... 54

**Figura 16-** Número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito na VTA..... 55

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Critérios diagnósticos do DSM-5 para transtornos relacionados ao uso de substâncias ..... 20

**Tabela 2-** Resumo das regiões encefálicas relacionadas a dependência que apresentaram aumento da expressão de  $\Delta$ FosB ..... 63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Acb-** Núcleo acumbens

**AcbC-** Núcleo acumbens *core*

**AcbS-** Núcleo acumbens *shell*

**AIV-** Ínsula agranular ventral

**ANOVA-** Análise de variância

**BLA-** Amígdala basolateral

**BSA-** Albumina de soro bovino

**CA-** Campo aberto

**CeA-** Amígdala central

**CEBRID-** Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas

**CEUA-** Comissão de Ética no Uso de Animais

**Cg1-** Córtex cingulado 1

**CoCl<sub>2</sub>**- Cloreto de cobalto

**CONCEA-** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**CPF-** Córtex pré-frontal

**CPFm-** Córtex pré-frontal medial

**DAT-** Transportador de dopamina

**D<sub>1</sub>**- Receptor dopaminérgico tipo 1

**D<sub>2</sub>**- Receptor dopaminérgico tipo 2

**D<sub>2/3</sub>**- Receptor dopaminérgico tipo 2/3

**DmS-** Estriado dorsal medial

**DOPAC-** Ácido 3,4-diidroxifenilacético

**DSM-5-** Manual de Diagnóstico e Estatística da Sociedade Americana de Psiquiatria

**EPM-** Erro padrão da média

**EtOH-** Etanol

**GDI-** Ínsula granular/disgranular

**HVA-** Ácido homovanílico

**I.P.-** Intraperitoneal

**IL-** Córtex infralímbico

**kD-** Kilodalton

**LCE-** Labirinto em cruz elevado

**NaCl-** Cloreto de sódio

**NMDA-** Receptor glutamatérgico N-metil D-aspartato

**OFC-** Córtex orbitofrontal

**OMS-** Organização Mundial da Saúde

**PBS-** Tampão fosfato salino

**PFA-** Paraformaldeído

**PrL-** Córtex pré-límbico

**SeR27-** Resíduo número 27 de serina

**SN-** Substância nigra

**SNC-** Sistema nervoso central

**VTA-** Área tegmental ventral



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 <i>Perspectiva histórica e epidemiologia do uso de etanol</i> .....	18
1.2 <i>Dependência ao etanol e sensibilização comportamental</i> .....	19
1.3 <i>A proteína <math>\Delta</math>FosB</i> .....	25
1.4 <i>Lateralização dos hemisférios encefálicos: esquerdo vs direito</i> .....	27
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	30
2.1 <i>Objetivo geral</i> .....	30
2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1 <i>Aspectos éticos</i> .....	31
3.2 <i>Sujeitos experimentais</i> .....	31
3.3 <i>Substâncias</i> .....	31
3.4 <i>Sensibilização comportamental</i> .....	31
3.5 <i>Dissecção dos encéfalos e imunofluorescência para <math>\Delta</math>FosB</i> .....	32
3.6 <i>Contagem de neurônios positivos para <math>\Delta</math>FosB</i> .....	34
3.7 <i>Análise estatística</i> .....	34
<b>4 RESULTADOS</b> .....	37
4.1 <i>Sensibilização comportamental induzida pelo etanol</i> .....	37
4.2 <i>Neurônios positivos para <math>\Delta</math>FosB</i> .....	39
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64
<b>8 ANEXO A</b> .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

### *1.1 Perspectiva história e epidemiologia do uso de etanol*

Toda a história da humanidade está permeada pelo consumo de álcool. Ao longo do tempo esse consumo esteve associado a diversos aspectos recreativos, entre eles o favorecimento da integração social (CIARLO; MASTROIANNI, 2010). Segundo Lapate (2001), alguns animais já buscavam no uso de frutas fermentadas uma sensação de bem-estar e relaxamento. Ao observarem o comportamento alterado desses animais, os homens começaram a fazer uso do suco de frutas fermentadas que continham algum teor alcoólico e, dessa forma, pôde-se inferir que as primeiras bebidas alcoólicas eram fermentadas e de origem artesanal.

Em meados de 800 a.C., os árabes passaram a produzir as bebidas destiladas e a partir disto, bebidas com maiores teores alcoólicos foram introduzidas na sociedade (GIGLIOTTI; BESSA, 2004). Com o advento da industrialização, no século XVIII, o álcool começou a ser produzido em larga escala, o que reduziu os custos ao consumidor e estimulou o seu consumo. O transporte através de caravanas também auxiliou na difusão das bebidas alcoólicas industrializadas (FORTES; CARDO, 1991) e contribuiu para o aumento do consumo nos grandes centros urbanos. A partir daí, iniciaram-se as descrições dos problemas físicos e psicológicos provenientes do abuso de álcool (GIGLIOTTI; BESSA, 2004).

Devido ao fato do álcool ser considerado uma substância lícita e estar atrelado a diversos anúncios publicitários, ele se tornou amplamente aceitável pela sociedade, tornando-se a principal substância psicotrópica de abuso consumida no mundo (PEACOCK et al., 2018). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), de 2010, mostraram que os continentes asiático e europeu são os lugares com maior consumo de álcool no mundo, cuja média de ingestão *per capita* de etanol puro em indivíduos maiores de 15 anos esteve em torno de 13 litros. No Brasil, o mesmo estudo apontou que a média de ingestão é de aproximadamente 10 litros. Além disso, dados epidemiológicos obtidos pelo Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) mostraram que o álcool foi uma das substâncias de abuso com maior prevalência de uso na vida (74,6%), sendo as estimativas de dependentes de álcool de 12,3% (CARLINI et al., 2006).

Um estudo comparativo entre diferentes substâncias de abuso apontou o álcool como sendo a substância que mais causa danos aos usuários e a terceiros (NUTT et al. 2010). Estima-se que cerca de 3,3 milhões de mortes em 2012 tenham sido provocadas diretamente pelo consumo abusivo de etanol e através da relação entre o abuso de álcool e o desenvolvimento de comorbidades como câncer, doenças hepatoesplênicas, cardiovasculares, gastrointestinais e alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) (OMS, 2014), sendo essas últimas é o enfoque deste trabalho.

### ***1.2 Dependência ao etanol e sensibilização comportamental***

A dependência de substâncias psicoativas de abuso é uma desordem complexa, de caráter crônico e progressivo, caracterizada como um conjunto de sinais e sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos indicativos de que o indivíduo perdeu o controle do uso da substância e, apesar disso, continua a usá-la mesmo reconhecendo as consequências adversas desse uso. Outra característica muito observada na dependência é o aparecimento de estados emocionais negativos e desagradáveis, como irritabilidade, disforia e ansiedade, quando o acesso à substância é interrompido (KARILA et al., 2008; KOOB et al., 2009).

Na quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística da Sociedade Americana de Psiquiatria (DSM-5), o abuso e a dependência de substâncias foram classificados de acordo com a gravidade em três níveis: leve (2 a 3 sintomas), moderado (4-5 sintomas) e grave (6 ou mais sintomas), de acordo com os critérios diagnósticos descritos na tabela abaixo:

**Tabela 1:** Critérios diagnósticos do DSM-5 para transtornos relacionados ao uso de substâncias.

---

Padrão problemático de uso de substâncias, que leva ao comprometimento ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por pelo menos dois dos seguintes critérios, que ocorrem durante um período de 12 meses:

1. A substância é frequentemente consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido.
  2. Desejo persistente ou esforços ineficazes no sentido de reduzir ou controlar o uso da substância.
  3. Muito tempo gasto em atividades necessárias para a obtenção, utilização e recuperação dos efeitos da substância.
  4. Fissura ou um forte desejo ou necessidade de usar a substância.
  5. Uso recorrente da substância que resulta no comprometimento de desempenho na realização de atividades diárias.
  6. Uso continuado da substância, apesar dos problemas sociais e interpessoais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados por seus efeitos.
  7. Abandono ou redução de atividades sociais, profissionais e recreacionais em virtude do uso da substância.
  8. Uso recorrente da substância em situações nas quais isso representa perigo na integridade física.
  9. O uso da substância é mantido apesar da consciência de ter problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pela substância.
  10. Aparecimento de tolerância, caracterizada pela necessidade de quantidades progressivamente maiores da substância para alcançar o efeito desejado.
  11. Surgimento da síndrome de abstinência.
- 

Fonte: DSM -5, 5ª edição (2013).

De uma maneira geral, todas as substâncias de abuso funcionam como estímulos reforçadores positivos, ou seja, possuem a propriedade de causarem efeitos euforizantes e prazerosos (WISE; BOZARTH, 1987) que acarretam na repetição do seu consumo ou busca. Essa propriedade é uma das principais características responsáveis pela procura e uso compulsivo da substância que pode levar ao desenvolvimento da dependência (GILPIN; KOOB, 2008).

Mediante o uso crônico de substâncias de abuso, importantes regiões encefálicas sofrem neuroadaptações que podem levar ao padrão compulsivo e excessivo de consumo (MOST et al. 2014). Essas regiões encefálicas são descritas como sendo importantes no controle da motivação, cognição, memória, comportamentos

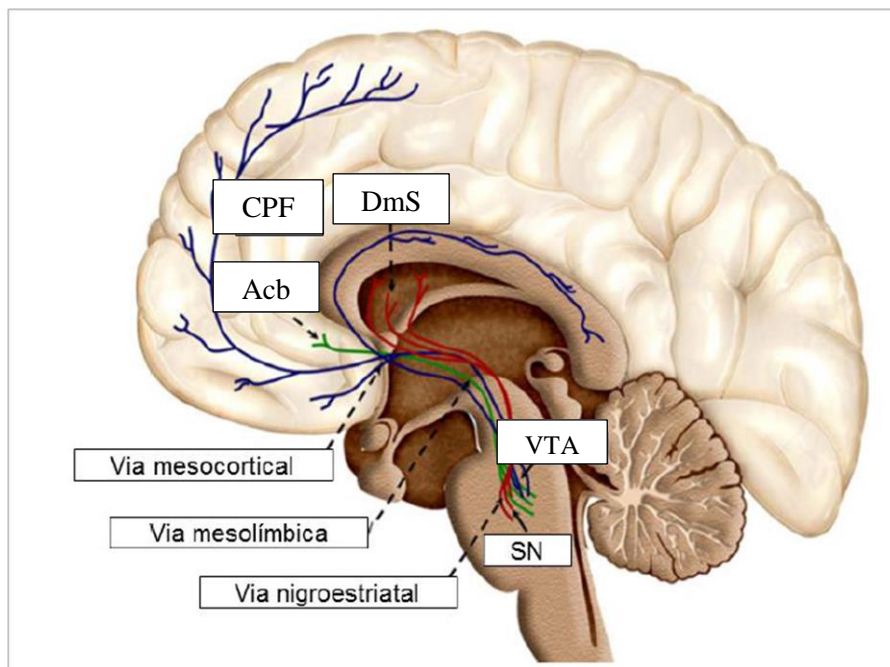
relacionados ao medo, ansiedade, tomada de decisões e atividade motora (KALIVAS; VOLKOW, 2005).

A via dopaminérgica mesocorticolímbica (Figura 1A), também conhecida como via da recompensa, é uma das principais vias neurais relacionadas com a dependência e responsável por mediar os efeitos reforçadores das drogas de abuso. Este sistema é formado por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares estão localizados na área tegmental ventral (VTA) com projeções para o núcleo acumbens (Acb) e córtex pré-frontal (CPF). Pode ser considerada como a combinação de duas vias: a via mesocortical, cujos neurônios da VTA se projetam para o CPF, e a via mesolímbica, cujos neurônios da VTA se projetam para o Acb e outras áreas límbicas. Por via de regra, as substâncias de abuso promovem o aumento da liberação de dopamina nessa via de recompensa, principalmente no Acb, situação responsável por causar efeitos prazerosos, e que conseqüentemente provocam o consumo e a busca da substância de abuso (DI CHIARA; BASSAREO, 2007; VANGELIENE, 2008).

Outra via encefálica importante na dependência é a nigroestriatal (Figura 1A e B), que compreende os neurônios dopaminérgicos com seus corpos celulares na substância nigra (SN) e suas projeções para o estriado dorsal medial (DmS) (EVERITT; ROBINS, 2013). As conexões entre DmS, Acb e CPF parecem se tornar mais intensas na dependência, o que ocasiona alterações consideráveis na perda do controle do uso da droga, tornando a tomada de decisão voltada para o consumo da droga, independente da motivação envolvida (BELIN et al., 2013).

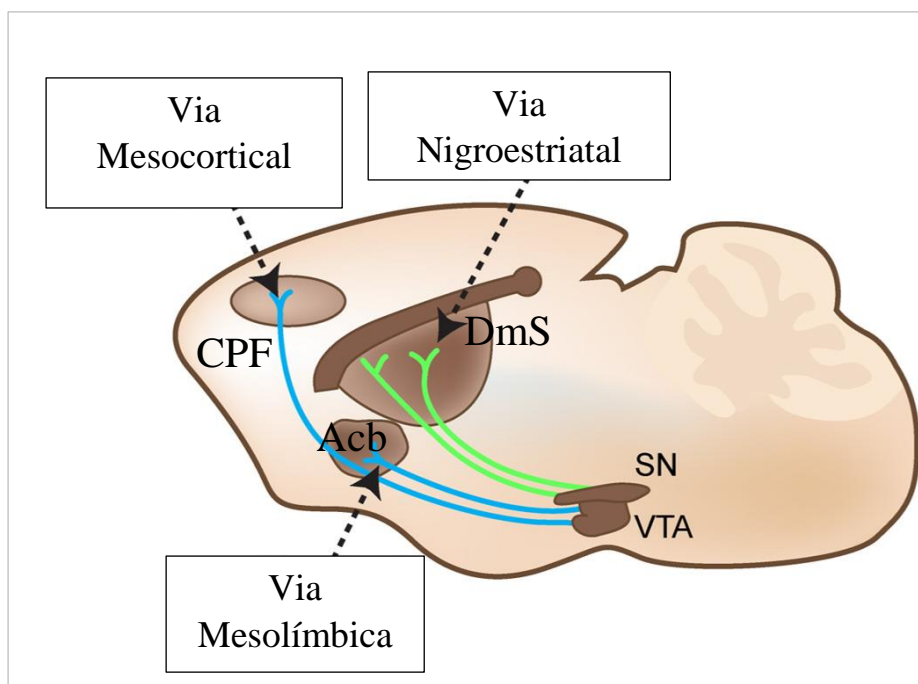
**Figura 1:** Representação esquemática do sistema mesocorticolímbico e nigroestriatal no encéfalo humano (A) e de roedor (B). Destaque para os neurônios dopaminérgicos localizados na VTA e SN que se projetam para o Acb, CPF e DmS.

**A**



Fonte: Adaptado de (ARIAS-CARRIÓN et al., 2010)

**B**



Fonte: Adaptado de (MONEY; STANWOOD, 2013).

É importante mencionar que nem todos os indivíduos que iniciam o consumo de drogas progridem para a dependência (SCHRAMM-SAPYTA et al., 2009). Atualmente um dos principais desafios da pesquisa sobre dependência de substâncias de abuso é revelar quais são os processos envolvidos na transição do uso recreativo para a dependência. Neste contexto, a sensibilização comportamental se destaca como sendo um importante modelo de estudo utilizado para avaliar a neuroplasticidade relacionada a esse fenômeno de transição.

A sensibilização comportamental pode ser mais facilmente observada avaliando-se a ativação psicomotora induzida pelas substâncias de abuso. Em roedores, ela consiste do aumento gradual e progressivo da atividade locomotora observado após a administração repetida da droga (POST; ROSE, 1976; ROBINSON; BECKER, 1986; DE PAULI et al., 2014). Em humanos, a sensibilização de alguns efeitos das substâncias psicoativas também tem sido demonstrada. A administração repetida de anfetamina a indivíduos saudáveis em condições laboratoriais controladas induz aumento progressivo da sensação de vigor físico/atividade motora, aumento da taxa de fala e do número de atos de piscar os olhos (STRAKOWSKI et al., 1996; STRAKOWSKI; SAX, 1998).

Relatos de casos também demonstram que com o decorrer do uso crônico de psicostimulantes ocorre aumento progressivo dos sintomas de estimulação psicomotora e alucinações induzidas pela substância. Do mesmo modo, maior vulnerabilidade a psicoses e recaídas ocorrem com a repetição das administrações (UJIKE; SATO, 2004). Segundo Robinson (1993), a sensibilização comportamental consiste do aumento gradativo da relevância motivacional para o consumo da droga e não necessariamente aos efeitos intrínsecos de cada droga. Este paradigma é explicado através da sensibilização das vias neurais relacionadas a dependência que promovem o aumento da saliência motivacional.

Ao longo do tempo, durante o desenvolvimento da dependência, a sensação prazerosa diminui, enquanto a fissura tende a aumentar. Em outras palavras, o indivíduo deixa de “gostar” da droga e passa a “quere-la”. Daí surge o termo “sensibilização do incentivo”, indicando um aumento da relevância motivacional das substâncias de abuso. Um estudo clínico mostrou que ocorre diminuição na intensidade da sensação de prazer causada pela anfetamina com o decorrer das administrações repetidas da substância (STRAKOWSKI et al., 2001). Esse resultado está de acordo com as observações de Robinson e Berridge (2003) de que os indivíduos dependentes continuam a

autoadministrarem a substância psicoativa mesmo sem a sensação prazerosa evidente. A procura e consumo das substâncias ocorreriam então devido ao intenso incentivo motivacional para as substâncias. Dados de Lambert et al. (2006) reforçam a argumentação anterior. Esses autores observaram que, quando experimentavam a substância, pessoas dependentes ou usuários pesados de cocaína relatavam maior desejo de consumir mais da substância quando comparados aos indivíduos não dependentes ou usuários ocasionais. Além disso, indivíduos fumantes e que foram pré-expostos terapeuticamente a psicoestimulantes descreviam menor prazer ao consumir pela primeira vez cocaína, mas relatavam maior desejo de consumir maiores quantidades da substância do que indivíduos que não tinham sido pré-expostos aos psicoestimulantes e tabaco.

A correlação entre sensibilização comportamental e comportamentos de consumo de drogas pode ser explicada pelo compartilhamento das estruturas encefálicas que regulam a relevância motivacional de um estímulo e o controle motor (ROBINSON; BERRIDGE, 1993). Tanto o Acb quanto o DmS possuem projeções para áreas motoras (ARIAS-CARRIÓN et al., 2010), portanto, as neuroadaptações duradouras que modificam a funcionalidade do Acb e do DmS e promovem o aumento da saliência motivacional das substâncias de abuso, também costumam alterar a resposta locomotora coordenada por essas regiões (SMITH et al., 2009; VANDERSCHUREN; KALIVAS, 2000).

No entanto, nem todos os animais expostos a administrações repetidas de drogas de abuso desenvolvem sensibilização comportamental e/ou neuroadaptações. Por exemplo, camundongos DBA/2J possuem maior propensão a desenvolver sensibilização locomotora quando comparados a camundongos C57BL/6J (PHILLIPS et al., 1994).

Além disso, Masur e dos Santos (1988) descreveram uma grande variabilidade em relação ao desenvolvimento da sensibilização comportamental induzida pelo etanol em camundongos Suíços *outbred*. Um estudo conduzido por Nona et al., (2013) separou os fenótipos de animais em sensibilizados e não sensibilizados de acordo com o desenvolvimento da atividade locomotora ao longo do procedimento sensibilização comportamental, fato também descrito por Quadros et al., (2002b).

De maneira semelhante, Coelho e colaboradores (2014) distribuíram camundongos Suíços em dois grupos distintos com base na intensidade de suas atividades locomotoras. Os animais que apresentaram maior locomoção ao final do último dia de sensibilização foram classificados como *EtOH-High*, enquanto aqueles



que apresentaram menor locomoção foram classificados como *EtOH-Low*. Adicionalmente, neste mesmo estudo, os autores submeteram os animais a um período de retirada ao etanol e demonstraram que mesmo após o período em abstinência, os animais ainda permaneciam sensibilizados, comprovando que a sensibilização comportamental é um processo duradouro e pode persistir ao longo do tempo mesmo que o uso da droga já tenha sido interrompido.

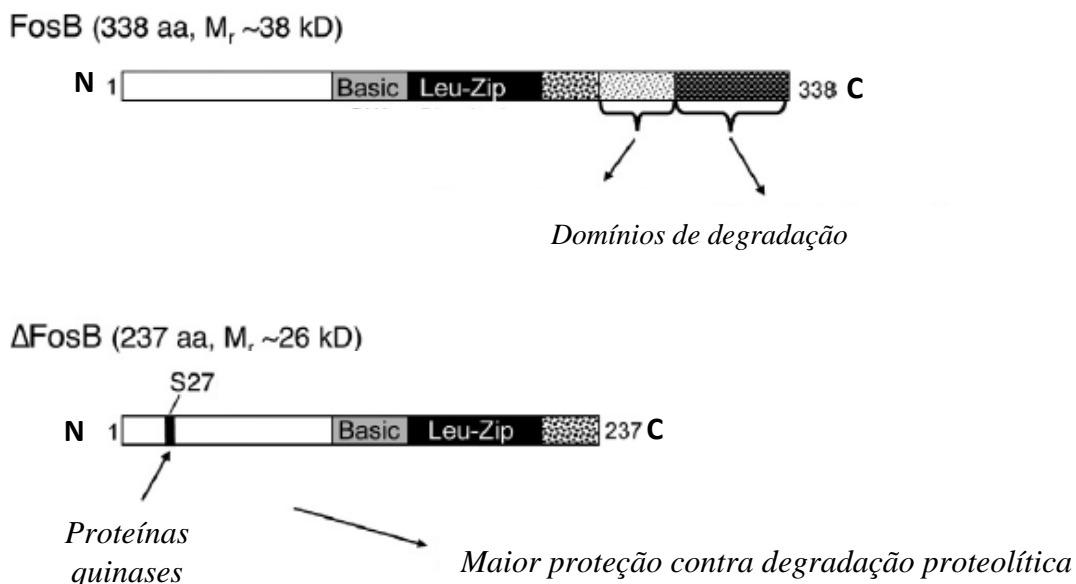
Vários estudos demonstram que a variabilidade individual no desenvolvimento da sensibilização comportamental pode estar atrelada a diferentes características neuroquímicas nas regiões encefálicas envolvidas na dependência (SOUZA-FORMIGONI et al., 1999; ABRAHÃO et al., 2012; DE PAULI et al., 2014). Ratos sensibilizados com anfetamina (TURGEON et al., 1997) e cocaína (MATTSON et al., 2007) apresentaram aumento de *p*-CREB no estriado, enquanto camundongos resistentes à sensibilização comportamental demonstraram aumento da ligação de receptores NMDA no CPF e *Acb core* (QUADROS et al., 2002a). Essas diferenças moleculares em regiões encefálicas relacionadas à dependência sugerem um papel relevante no desenvolvimento de comportamentos característicos da dependência (GILPIN, KOOB, 2008).

### **1.3 A proteína $\Delta$ FosB**

A regulação da expressão gênica tem sido descrita como um componente importante da neuroplasticidade associada a dependência de substâncias de abuso. A  $\Delta$ FosB é uma variante truncada via *splicing* alternativo do gene FosB, que pertence à família de genes de ativação imediata Fos e são classificados como fatores de transcrição. São produzidos quando uma célula é ativada por diversos estímulos e devido a esse motivo, as proteínas dessa família são largamente empregadas no mapeamento da ativação neural (KOVÁCS, 1998).

A  $\Delta$ FosB é uma proteína composta por 237 aminoácidos, com aproximadamente 26 kD, fortemente estável devido a sua estrutura bioquímica que não possui domínios de degradação em sua porção C-terminal. Além disso, também sofre fosforilação por proteínas quinases no resíduo de Ser27 da porção N-terminal, que oferece proteção adicional contra a degradação proteolítica (NESTLER, 2015) (Figura 2).

**Figura 2:** Base bioquímica das proteínas FosB e  $\Delta$ FosB. A proteína FosB possui dois domínios de degradação na porção C-terminal que a torna susceptível a proteólise. Em contrapartida, a proteína  $\Delta$ FosB não possui domínios de degradação e é fosforilada por proteínas quinases na região N-terminal, o que constitui maior proteção contra a degradação proteolítica e, portanto, maior estabilidade.



Fonte: Adaptado de (NESTLER, 2015).

Diversos estudos demonstram que FosB e  $\Delta$ FosB são produzidas mediante a estímulos repetidos. Enquanto a FosB é rapidamente degradada após sua produção, a variante  $\Delta$ FosB, altamente estável, se acumula no interior da célula (RUFFLE, 2014).

A exposição aguda ao etanol e outras drogas promove a indução da proteína FosB, ao passo que a exposição crônica leva ao acúmulo de  $\Delta$ FosB (HOPE et al., 1994; PERROTTI et al., 2008) que persiste mesmo após longos períodos de retirada (NESTLER, 2015; DE PAULI et al., 2014). Além disso, é bem estabelecido que a exposição repetida a substâncias de abuso aumenta a expressão de  $\Delta$ FosB nas regiões encefálicas relacionadas a dependência, tais como núcleo acumbens, córtex pré-frontal (PERROTTI et al., 2005) e estriado dorsal (MORAIS-SILVA et al., 2016).

Um estudo conduzido por Nestler e colaboradores (2013) demonstrou pela primeira vez em humanos um aumento de  $\Delta$ FosB no núcleo acumbens de indivíduos dependentes de cocaína, o que sugere um possível alvo terapêutico para futuras intervenções que auxiliem no tratamento da dependência. Neste contexto, o acúmulo

gradual do fator de transcrição  $\Delta$ FosB após exposição crônica ao álcool e outras drogas, tem sido investigado como um marcador de plasticidade neural e comportamental a longo prazo. Este mecanismo foi relatado por aumentar as respostas motivacionais e efeitos psicomotores do abuso de drogas associado com a transição para a dependência (NESTLER et al., 2001).

Além das substâncias de abuso, o estresse também é uma importante resposta fisiológica que promove o aumento de proteínas da família Fos no encéfalo. Um estudo conduzido por Perrotti e colaboradores (2004) mostrou que ratos Sprague-Dawley submetidos ao estresse agudo de restrição tiveram aumento de c-Fos e FosB nas regiões do CPF e Acb, enquanto a expressão de  $\Delta$ FosB apareceu somente após o estresse crônico de restrição, predominantemente nas regiões do CPF, Acb e amígdala basolateral (BLA).

O aumento do conteúdo de  $\Delta$ FosB no Acb de camundongos C57BL/6J após situações aversivas, como o modelo de estresse de derrota social, foi considerado um mecanismo essencial na resiliência ao estresse (VIALOU et al., 2010). Já a diminuição da expressão de FosB/ $\Delta$ FosB foi vista em situações onde a síndrome de abstinência a morfina foi atenuada (LI et al., 2012), pressuposto que o período de retirada/abstinência constitui uma fase de intenso estresse para o indivíduo.

#### ***1.4 Lateralização dos hemisférios encefálicos: esquerdo vs direito***

A lateralização pode ser definida como uma assimetria entre os lados esquerdo e direito que interferem na funcionalidade fisiológica da estrutura anatômica (CERQUEIRA et al., 2008). Em vertebrados, a lateralização do cérebro é amplamente difundida e está relacionada a determinados comportamentos que podem contribuir para sobrevivência das espécies (ROGERS; ANDREW, 2002), o que propõe uma importância evolutiva desse fenômeno.

Alguns animais compartilham um padrão de uso do hemisfério direito associado a observação e compreensão de novidades, bem como a execução de respostas rápidas, enquanto o uso do hemisfério esquerdo se associa ao controle de respostas que requerem escolhas (RODGERS, 2004). Um estudo com galinhas observou que o hemisfério esquerdo se relacionou com a distinção do alimento inserido em um *background* escuro, enquanto o hemisfério direito se associou aos comportamentos de procura por um predador (RODGERS, 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que a lateralização funcional em áreas do sistema límbico, mais notadamente no córtex pré-frontal medial (CPFm) está relacionada a desordens psiquiátricas, como depressão e ansiedade. Cerqueira e colaboradores (2008) descobriram que em situações de estresse crônico, ocorre uma hiperativação do CPFm direito e uma hipotivação do CPFm esquerdo. Dados recentes mostraram que a inibição química através da injeção local de cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) no CPFm direito de camundongos atenuou os comportamentos relacionados a ansiedade, ao passo que a mesma inibição no CPFm esquerdo produziu comportamentos do tipo ansiogênicos no labirinto em cruz elevado (LCE) (COSTA et al., 2016) o que sugere uma distinção dos hemisférios cerebrais na modulação de emoções, como a ansiedade.

Além disso, a assimetria na atividade de neurônios corticais também tem sido associado com o consumo de álcool. Estudos de eletroencefalografia e análise de fluxo sanguíneo local em humanos sugerem que a maior atividade neural do hemisfério direito em relação ao esquerdo é preditivo de uma tendência crescente ao abuso de álcool (BAUER et al., 1993; DECKEL et al., 1995). Elevados níveis de metabólitos da dopamina (DOPAC e HVA) no hemisfério direito do CPFm correlacionaram-se positivamente com as taxas de auto-administração de morfina em ratas Sprague-Dawley (GLICK, 1992). De maneira semelhante, a liberação de dopamina provocada pela ingestão aguda de etanol parece ativar preferencialmente os neurônios do lado direito do CPFm em humanos (VOLKOW et al., 2009).

A lateralização em estruturas como a amígdala (AMY) pode aumentar a probabilidade de desenvolvimento de abuso de etanol em indivíduos adolescentes e jovens adultos. Imagens de ressonância magnética mostraram que nos indivíduos com maior risco houve redução do volume da amígdala no hemisfério direito quando comparado ao grupo controle (HILL et al., 2001).

O sistema dopaminérgico mesoestriatal que desempenha um papel importante no processamento dos comportamentos motivados relacionados à recompensa, também apresenta efeitos de lateralização (MARTIN-SOELCH et al., 2011). Na região do estriado dorsal em humanos, o transportador de dopamina *DAT* e o receptor do tipo *D<sub>1</sub>* são mais expressos no hemisfério esquerdo do que no hemisfério direito. Em contrapartida, no estriado ventral há maior expressão de *DAT*, *D<sub>1</sub>* e *D<sub>2/3</sub>* no hemisfério direito em relação ao esquerdo (VERNALEKEN et al., 2007; CANNON et al., 2009).

Apesar disso, a maioria dos estudos mais recentes sobre lateralização encefálica se concentram em processos como ansiedade, memória (EUSTON et al., 2012), tomada de decisões (BECHARA & DAMASIO, 2002), cognição (YUAN & RAZ, 2014) e controle das respostas emocionais (DAVIDSON, 1998). Existem poucos dados que elucidam os papéis dos diferentes hemisférios na neuroplasticidade causada pela administração repetida de substâncias psicoativas de abuso. Neste sentido, o presente estudo buscou avaliar a expressão de  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito das regiões encefálicas relacionadas a dependência em camundongos submetidos ao procedimento de sensibilização comportamental induzida pelo etanol.

Portanto, nós hipotetizamos que a variabilidade no desenvolvimento da sensibilização comportamental é acompanhada por padrões distintos de neuroadaptações nos hemisférios esquerdo e direito, nas vias dopaminérgicas mesocorticolímbica e nigroestriatal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo geral*

O presente estudo avaliou a relação entre a expressão da proteína  $\Delta$ FosB e o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol em camundongos.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- Separar os animais submetidos ao protocolo de sensibilização comportamental induzida pelo etanol em sensibilizados e não sensibilizados, de acordo com um índice de locomoção.

- Quantificar através da técnica de imunofluorescência a expressão de  $\Delta$ FosB nas seguintes regiões encefálicas: Córtex pré-frontal (cingulado 1, pré-límbico, infralímbico e orbitofrontal), núcleo acumbens (*core e shell*), amígdala (central e basolateral), ínsula (agranular ventral e granular/disgranular), área tegmental ventral e estriado dorsal.

- Comparar a expressão de  $\Delta$ FosB separadamente nos hemisférios esquerdo e direito das regiões de interesse.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### ***3.1 Aspectos éticos***

Todos os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (CEUA/FCF 25/2018) (Anexo A) e foram conduzidos de acordo com a regulamentação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### ***3.2 Sujeitos experimentais***

Foram utilizados sessenta e nove camundongos Suíços machos, com peso aproximado de 30-35g no início dos experimentos, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) (Botucatu, SP). Os animais foram transferidos para o biotério do laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAr/UNESP) com no mínimo 7 dias de antecedência ao início dos experimentos. Neste local, os camundongos foram mantidos em grupos de 4-5 animais por caixa (33 × 15 × 13 cm) em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2$  °C), ciclo de luz 12/12h (luzes acesas às 7:00h) com livre acesso a água e alimento.

#### ***3.3 Substâncias***

Etanol 99,8% (Labsynth, Diadema – SP, Brasil) foi diluído a 20% v/v em solução salina (NaCl 0,9%) e administrado intraperitonealmente (i.p.) (0,1 mL/10g) na dose de 1,6 g/kg. Uretana (Sigma-Aldrich, St. Louis – MO, EUA) foi diluída em solução salina 0,9% e administrada i.p. na dose de 2,5 g/kg.

#### ***3.4 Sensibilização comportamental***

O protocolo de sensibilização comportamental foi baseado em Morais-Silva et al. (2016) e avaliou o desenvolvimento e a expressão da sensibilização psicomotora induzida pelo etanol em camundongos através do aparato de Campo Aberto (CA). O CA é uma arena circular de assoalho preto com 26 cm de diâmetro circundada por paredes pretas e opacas de 30 cm de altura.

O procedimento teve duração de 16 dias (Figura 4A) como descrito a seguir: durante os dois primeiros dias (H1-2), todos os animais receberam solução salina i.p. e foram inseridos no CA para avaliação da atividade locomotora por 20 minutos. Essa

fase foi chamada de habituação e foi necessária para eliminar os efeitos da novidade do ambiente na locomoção dos animais. Após essa fase, os animais foram submetidos a fase de sensibilização, cuja duração foi de 8 dias (S1-8). Nessa fase, os animais receberam etanol (1,6 g/kg i.p.) ou solução salina (NaCl 0,9%, grupo controle, i.p.) diariamente e em seguida foram colocados no CA para avaliação comportamental por 20 minutos.

Após o término do período de sensibilização, os animais foram submetidos a um período de retirada da droga que durou 7 dias (R1-7). Neste período, os animais não foram expostos ao etanol e permaneceram em suas respectivas caixas moradia com livre acesso a água e alimento. Após a fase de retirada, todos os animais foram submetidos a um desafio com etanol (D-EtOH) (1,6 g/kg i.p.) e inseridos no CA para novamente terem a atividade locomotora avaliada por 20 minutos. A distância percorrida (em metros) pelos animais no CA foi mensurada por uma câmera conectada a um computador contendo o software de análise comportamental ANY-maze (Stoelting Co., Wood-Dale- IL, EUA).

Como descrito por Coelho et al. (2013), a variabilidade na atividade locomotora no último dia de sensibilização nos permitiu distribuir os animais tratados com etanol em dois grupos: Sensibilizados e Não-Sensibilizados. Foram considerados como animais sensibilizados 30% daqueles que apresentaram maiores valores de locomoção, e não-sensibilizados 30% daqueles que apresentaram menores valores de locomoção, com base nos valores de locomoção (metros percorridos) apresentados no último dia da fase de sensibilização (S8). Sendo assim, foram constituídos três grupos experimentais: Controle (veículo), Etanol-Sensibilizado (EtOH-Sensibilizado) e Etanol-Não Sensibilizado (EtOH-Não Sensibilizado), cada um com 9-10 animais/grupo. Os animais tratados com etanol e que apresentaram locomoção intermediária no dia S8 foram excluídos da análise comportamental ou molecular.

### ***3.5 Dissecção dos encéfalos e imunofluorescência para $\Delta$ FosB***

Imediatamente após deixarem o CA no dia do desafio (20 minutos após a injeção de etanol), os animais foram anestesiados com uretana (2,5 g/kg, i.p.) e submetidos ao procedimento de perfusão transcardíaca, com 50 mL de tampão fosfato salino (PBS) 0,01 M durante 2 minutos, seguido de 150 mL de paraformaldeído (PFA) a 4%, com pH 7,4 durante 8 minutos para fixação do tecido.



Os encéfalos foram removidos e colocados em paraformaldeído durante 24 horas e posteriormente foram mantidos em solução de sacarose 30% diluída em PBS 0,01 M para crioproteção por 48 horas. Cortes coronais de 30  $\mu\text{m}$  foram realizados com o auxílio de um criostato a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , colocados em solução anti-congelante, constituída de sacarose e etilenoglicol diluídos em PBS 0,01 M, e posteriormente mantidos em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização da técnica de imuofluorescência.

Para o procedimento de quantificação de  $\Delta\text{FosB}$  por imunofluorescência, as fatias dos encéfalos de todos os grupos experimentais foram colocadas na mesma corrida, lavadas três vezes por 10 minutos com PBS 0,01 M. Em seguida, os cortes foram incubados em solução bloqueadora contendo 3% de BSA (albumina de soro bovino), 0,2% de Triton X-100 e 5% de soro equino diluídos em PBS 0,01 M durante 1 hora. Após a etapa de bloqueio, os cortes foram incubados *overnight* a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  com o anticorpo primário anti-rabbit, reativo para FosB/ $\Delta\text{FosB}$  (1:200, cat. No. 102: sc-48, Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz- CA, EUA) seguido por seis lavagens de 5 minutos. É importante notar que o anticorpo primário utilizado é reativo tanto para FosB quanto para  $\Delta\text{FosB}$ . A fim de garantir a quantificação apenas de  $\Delta\text{FosB}$ , os animais foram eutanasiados após uma semana do término do período de administrações repetidas de etanol/salina para que não houvesse FosB remanescentes do tratamento repetido com etanol, e somente 20 minutos após o desafio de etanol para que não houvesse tempo suficiente dos neurônios produzirem quantidades significativas de novas proteínas FosB. Esta estratégia tem sido usada em outros estudos, incluindo aqueles que utilizaram o mesmo anticorpo primário descrito neste trabalho (FLACK et al., 2010; GARCÍA-PEREZ et al., 2012; MORAIS-SILVA et al., 2016).

Subsequentemente, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 488 (1:1000, cat. No. A11008, Life Technologies Co., Eugene-OR, EUA) por 2 horas a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e novamente foram lavados por seis vezes com duração de 5 minutos. Posteriormente, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e fixadas com Fluoroshield com DAPI (Sigma-Aldrich F6057, St. Louis-MO, EUA).

### **3.6 Contagem de neurônios positivos para $\Delta$ FosB**

O número de neurônios marcados positivamente para  $\Delta$ FosB foram contados separadamente nos hemisférios esquerdo e direito, em áreas selecionadas de acordo com o atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Franklin (2011) como segue: Córtex pré-frontal [córtex cingulado anterior (Cg1), córtex pré-límbico (PrL), córtex infralímbico (IL) e córtex orbitrofrontal (OFC)] (Bregma + 1,94), núcleo acumbens *core* (AcbC), núcleo acumbens *shell* (AcbS), estriado dorsal medial (DmS), ínsula agranular ventral (AIV), ínsula granular e disgranular (GDI) (Bregma + 1,42), amígdala basolateral (BLA), amígdala central (CeA) (Bregma -1,22) e área tegmental ventral (ATV) (Bregma -2,92) (Figura 3).

A contagem de células positivas para  $\Delta$ FosB em cada área do encéfalo foi realizada com fatias em duplicata e o valor médio foi utilizado como valor final para análise. Tais áreas foram selecionadas pois são descritas como circuitos envolvidos na atividade locomotora, recompensa e neuroplasticidades relacionadas à dependência. As imagens foram obtidas em ampliação de 20X através de um microscópio de fluorescência (Axio Imager.D2, Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood-NY, USA) acoplado a um computador e digitalizadas com o auxílio do software Zen Pro 2.0 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood-NY, USA). As células marcadas positivamente para  $\Delta$ FosB foram quantificadas através do software ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda-MD, EUA).

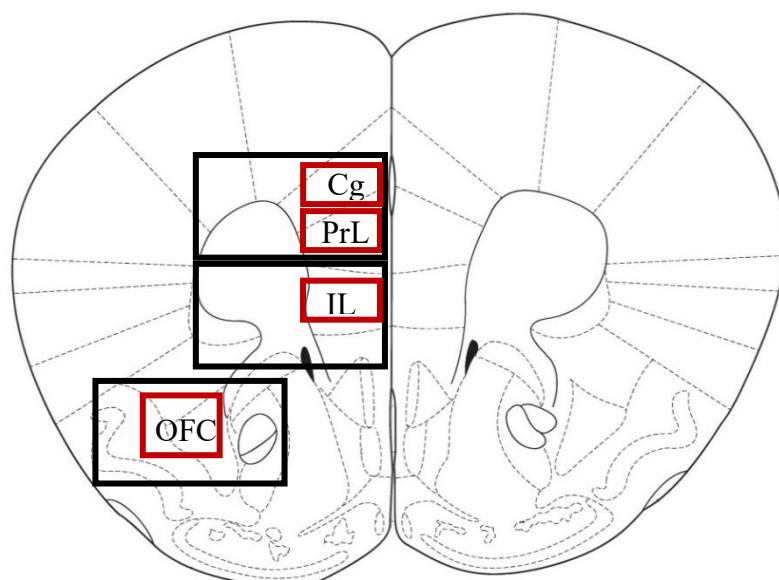
### **3.7 Análise estatística**

A análise estatística foi feita através do software Statistica 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, Ok, USA) e os gráficos foram feitos com auxílio do software GrandPad Prism 5 (GrandPad software Inc., LaJolla, CA, USA). Todos os valores foram expressos como média + EPM. Os dados referentes às fases de habituação e sensibilização do protocolo de sensibilização comportamental foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas considerando os fatores fenótipo (Controle x EtOH - Sensibilizado x EtOH - Não Sensibilizado) e dias. Já os dados referentes ao dia do desafio com etanol (D-EtOH) foram analisados por ANOVA de uma via considerando o fator fenótipo.

Os dados da imunofluorescência para quantificação de  $\Delta$ FosB foram analisados por ANOVA de duas vias considerando os fatores fenótipo e lado (hemisfério esquerdo x hemisfério direito). Nos casos em que a ANOVA apontou resultados significativos ( $p \leq 0,05$ ), o teste de Duncan foi realizado.

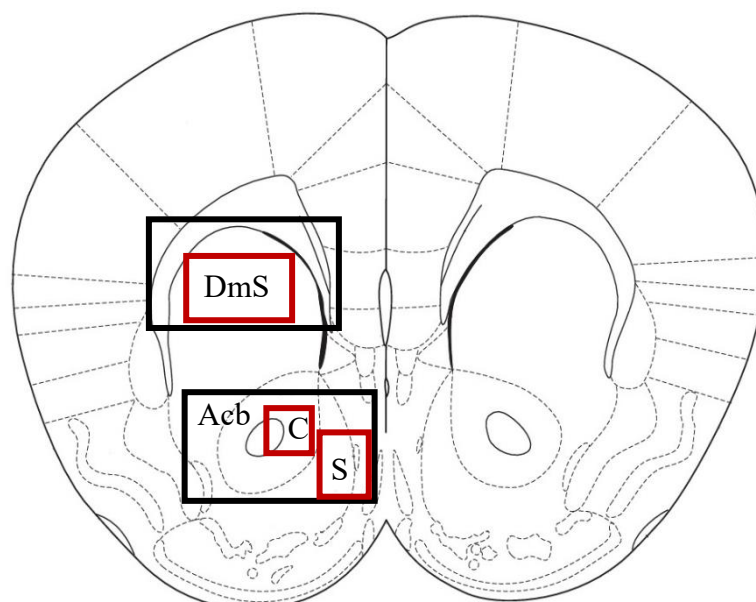
**Figura 3:** Secções coronais das regiões e sub-regiões encefálicas de acordo com o atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Franklin (2001). As figuras geométricas em preto representam a fotomicrografia enquanto as vermelhas representam a área do cérebro quantificada em cada corte. **A**, córtex pré-frontal (CPF), sub-regiões: córtex cingulado anterior (Cg1), córtex pré-límbico (PrL), córtex infralímbico (IL), córtex orbitofrontal (OFC). **B**, núcleo acumbens (Acb), sub-regiões: *core* (C) e *shell* (S). Estriado dorsal medial (DmS). **C**, ínsula agranular ventral (AIV) e ínsula granular/disgranular (GDI). **D**, amígdala basolateral (BLA), amígdala central (CeA). **E**, área tegmental ventral (VTA).

**A**

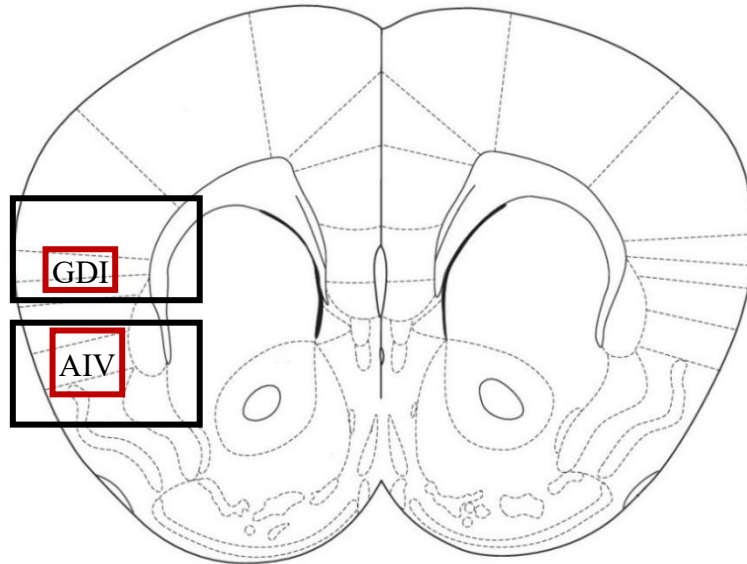


1.94 mm do Bregma

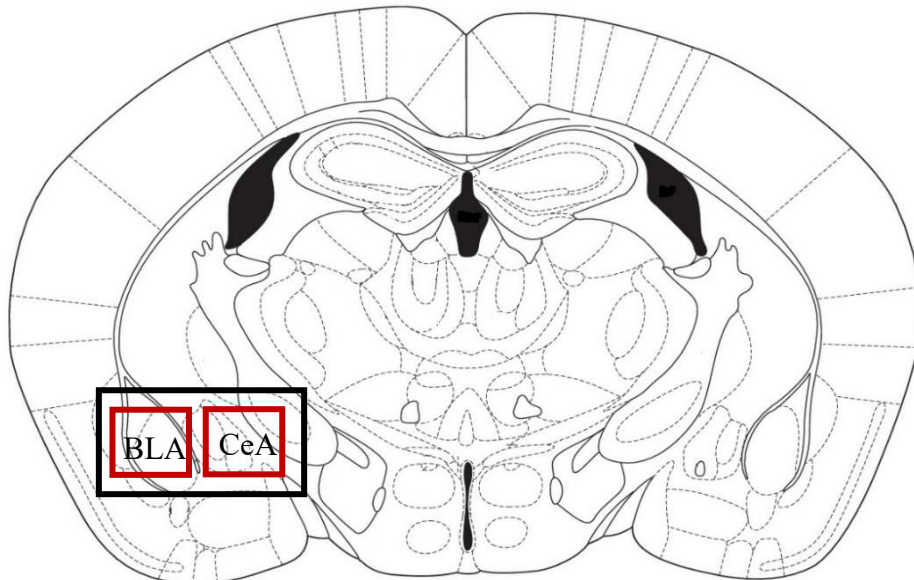
**B**



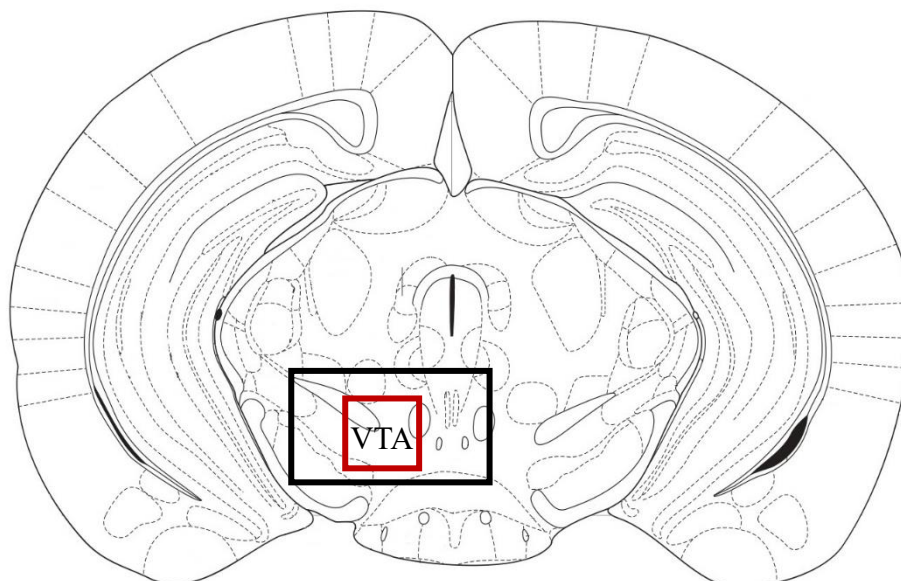
1.42 mm do Bregma

**C**

1.42 mm do Bregma

**D**

-1.22 mm do Bregma

**E**

-2.92 mm do Bregma

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Sensibilização comportamental induzida pelo etanol

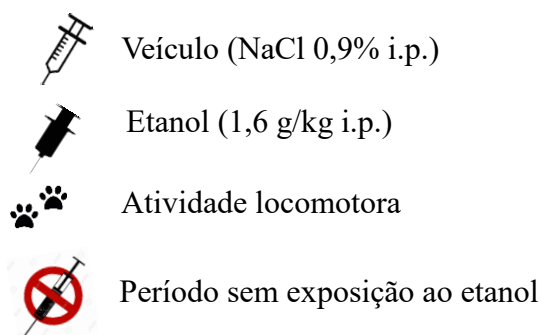
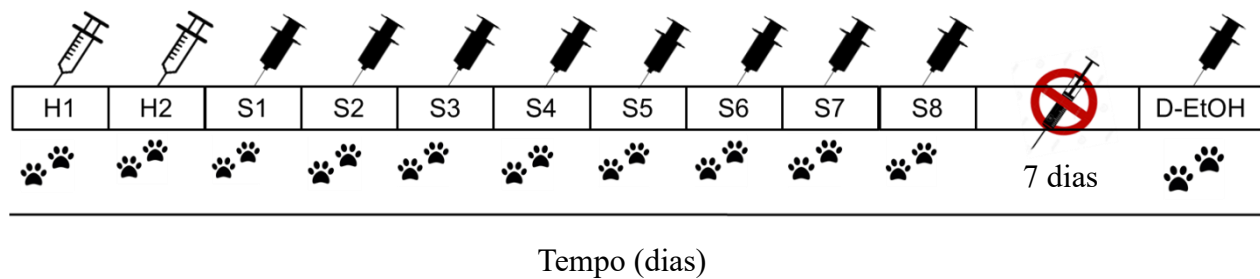
A ANOVA de duas vias para medidas repetidas indicou efeito da habituação à novidade do CA no segundo dia de experimento, como evidenciado pelo efeito do fator dia (H1 vs H2) ( $F_{1,24} = 16,85$ ;  $p < 0,001$ ), indicando diminuição da atividade locomotora dos animais no dia H2 em relação ao dia H1. Não houve efeito significativo do fenótipo ou interação entre os fatores nesse período de habituação.

Durante o desenvolvimento da sensibilização comportamental (S1 a S8), a ANOVA apontou diferenças significativas para os fatores fenótipo ( $F_{2,24} = 19,68$ ;  $p < 0,001$ ) e dias ( $F_{7,168} = 3,64$ ;  $p < 0,001$ ) e interação entre eles ( $F_{14,168} = 5,48$ ;  $p < 0,001$ ). O teste *post hoc* de Duncan mostrou que os camundongos do grupo EtOH-Sensibilizado apresentaram aumento da atividade locomotora ao longo do desenvolvimento da sensibilização comportamental quando comparados com os animais dos grupos controle e EtOH-Não Sensibilizado ( $p < 0,05$ ) nos três últimos dias do protocolo (S6, S7 e S8) e em relação ao mesmo grupo no dia S1 ( $p < 0,05$ ) (Figura 4B).

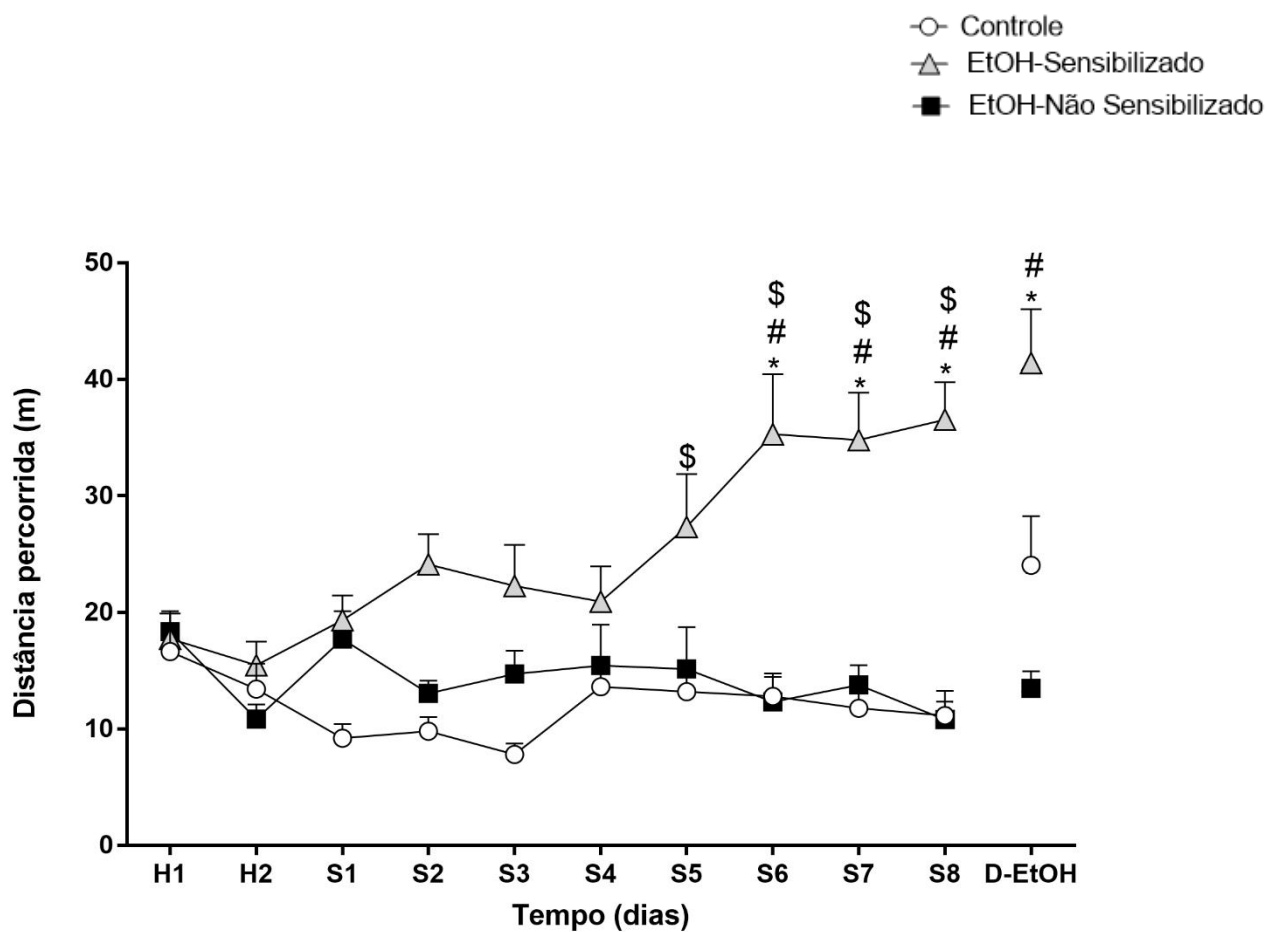
No dia do desafio com etanol, a ANOVA de uma via mostrou diferença quanto ao fator fenótipo ( $F_{2,24} = 14,43$ ;  $p < 0,01$ ). O grupo EtOH-Sensibilizado apresentou maior atividade locomotora em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), o que indica que os animais permaneceram sensibilizados mesmo após o período de retirada (Figura 4B).

**Figura 4:** Representação gráfica do protocolo experimental e sensibilização comportamental induzida pelo etanol. **A**, os animais foram submetidos a fase de habituação (H1-H2), seguido da fase de sensibilização, onde receberam diariamente injeções de etanol (1,6 g/kg i.p.) ou solução salina (NaCl 0,9% i.p.) (S1-S8). Subsequentemente, os animais passaram por um período de retirada no qual nenhuma substância foi administrada e após isso, todos os animais receberam um desafio com etanol (1,6 g/kg i.p.) (D-EtOH). A atividade locomotora dos animais foi mensurada diariamente no CA (com exceção do período de retirada) imediatamente após receberem as injeções de etanol ou salina. **B**, sensibilização comportamental induzida pelo etanol. Os pontos representam a média + EPM da distância percorrida no aparato ( $n = 9/10$  animais/grupo). \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo EtOH-Não Sensibilizado; \$  $p < 0,05$  em relação ao mesmo grupo no dia S1.

A



B

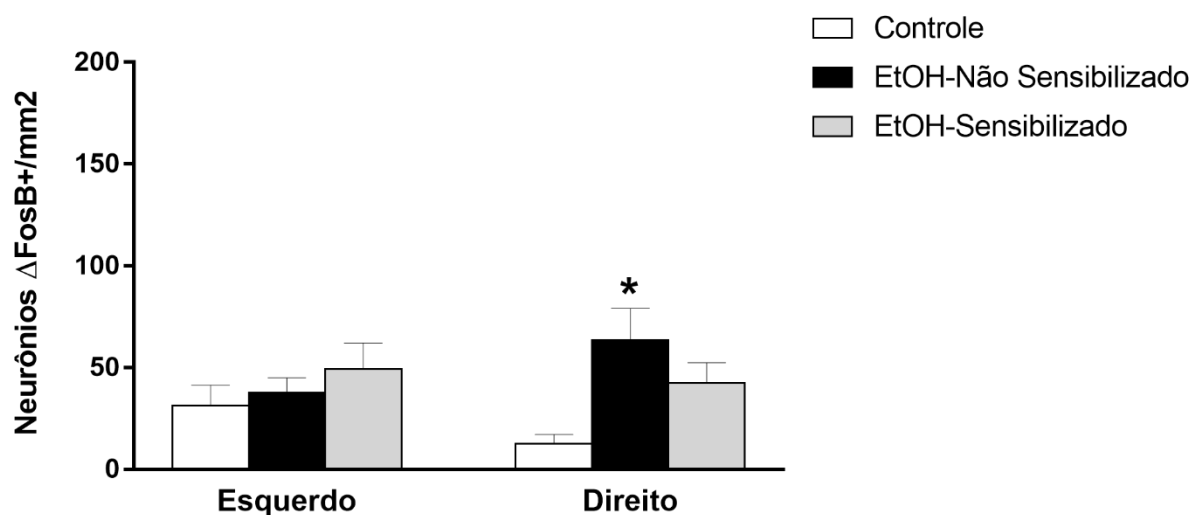


#### 4.2 Neurônios positivos para $\Delta$ FosB

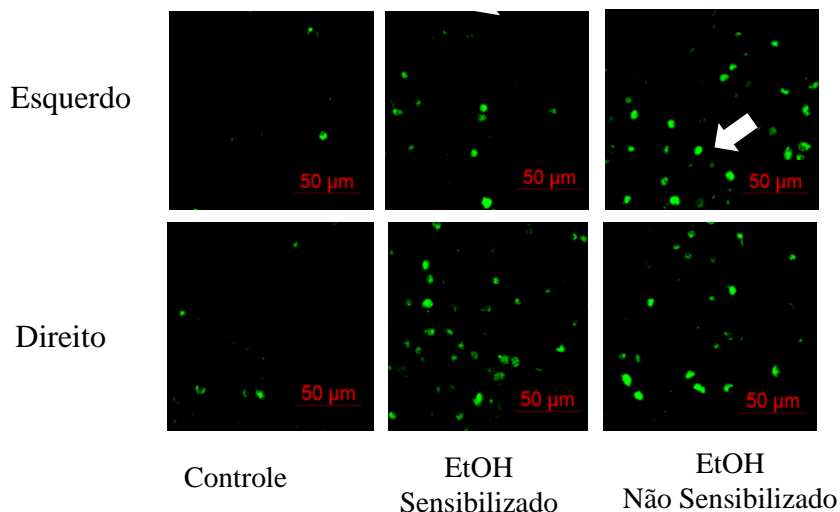
No CPFm, sub-região do Cg1, a ANOVA de duas vias apontou diferença significativa para fator fenótipo ( $F_{2,44} = 3,90$ ;  $p < 0,05$ ) mas não para fator lado ( $F_{1,44} = 0,00$ ;  $p = 0,99$ ) e nem para a interação entre eles ( $F_{2,44} = 2,31$ ;  $p = 0,11$ ). No entanto, devido ao valor significativo para o fator fenótipo e ao baixo valor de  $p$  para a interação, a análise foi continuada. O teste *post hoc* de Duncan revelou que o grupo EtOH-Não Sensibilizado teve aumento da expressão de  $\Delta$ FosB em relação ao grupo controle apenas no hemisfério direito ( $p < 0,05$ ) (Figura 5A).

**Figura 5:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito do Cg1. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. ( $n = 6-9$  animais/grupo), \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

**A**



**B**



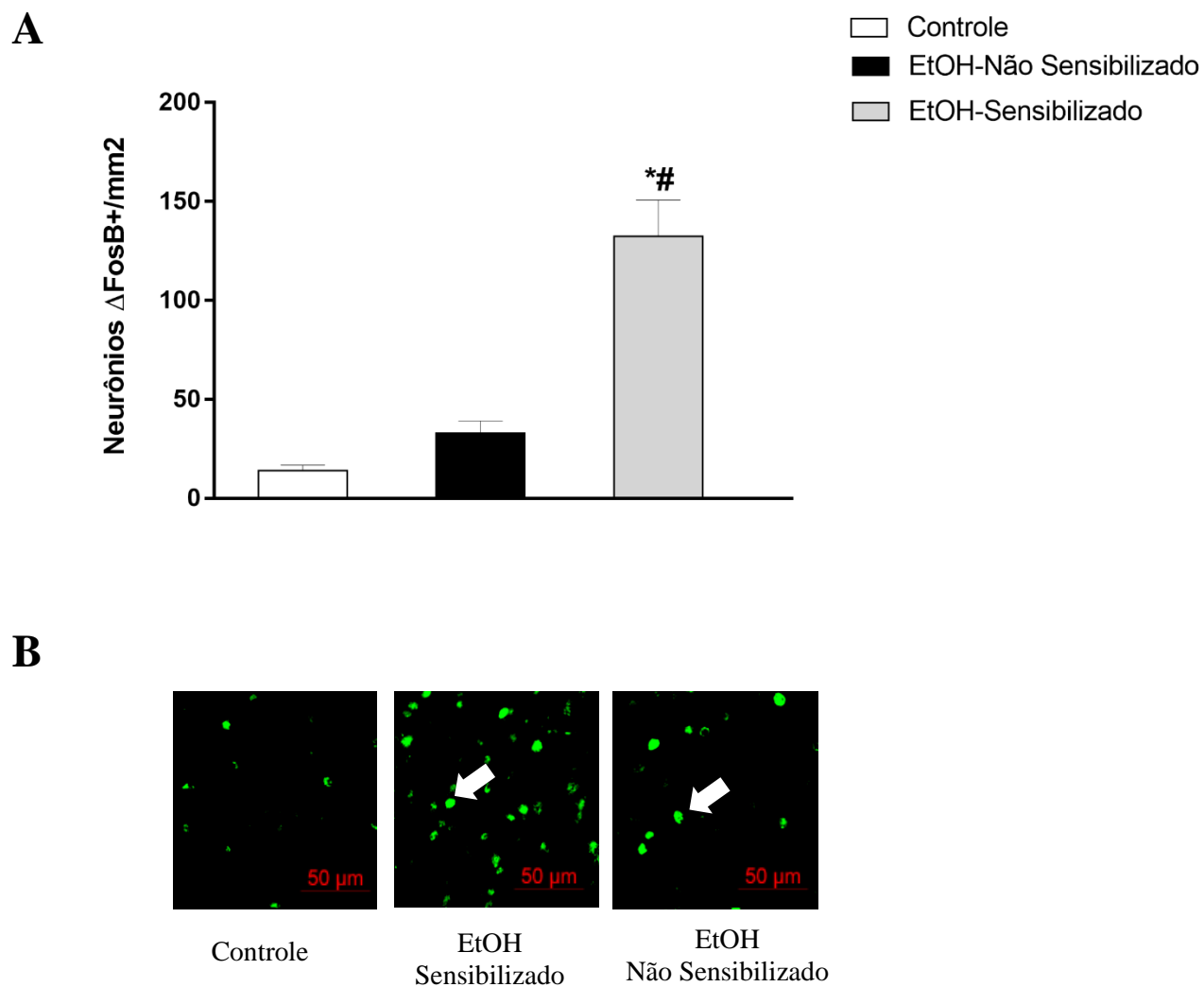
Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

No córtex PrL, a ANOVA de duas vias também apontou diferença significativa apenas para o fator fenótipo ( $F_{2,45} = 42,9$ ;  $p < 0,001$ ). O fator lado e a interação entre os dois fatores não foram significativos ( $F_{1,45} = 0,20$ ;  $p = 0,6$ ) ( $F_{2,45} = 0,03$ ;  $p = 0,97$ ). O teste *post-hoc* foi conduzido considerando apenas o fator fenótipo e demonstrou que os animais do grupo EtOH-Sensibilizado apresentaram aumento do conteúdo de  $\Delta$ FosB em relação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ) (Figura 6).

No córtex IL, a ANOVA demonstrou efeito significativo quanto ao fator fenótipo ( $F_{2,44} = 39,2$ ;  $p < 0,001$ ) e uma tendência ao efeito para o fator lado ( $F_{1,44} = 3,80$ ;  $p = 0,057$ ). Mesmo sem valores significativos para a interação entre os dois fatores ( $F_{2,44} = 0,92$ ;  $p = 0,40$ ), foi realizado o teste de Duncan que demonstrou aumento de  $\Delta$ FosB em ambos os hemisférios nos animais do grupo EtOH-Sensibilizado em relação aos animais dos demais grupos ( $p < 0,001$ ). Além disso, houve aumento da expressão de  $\Delta$ FosB no grupo EtOH-Sensibilizado no hemisfério direito quando comparado ao mesmo grupo no hemisfério esquerdo ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).



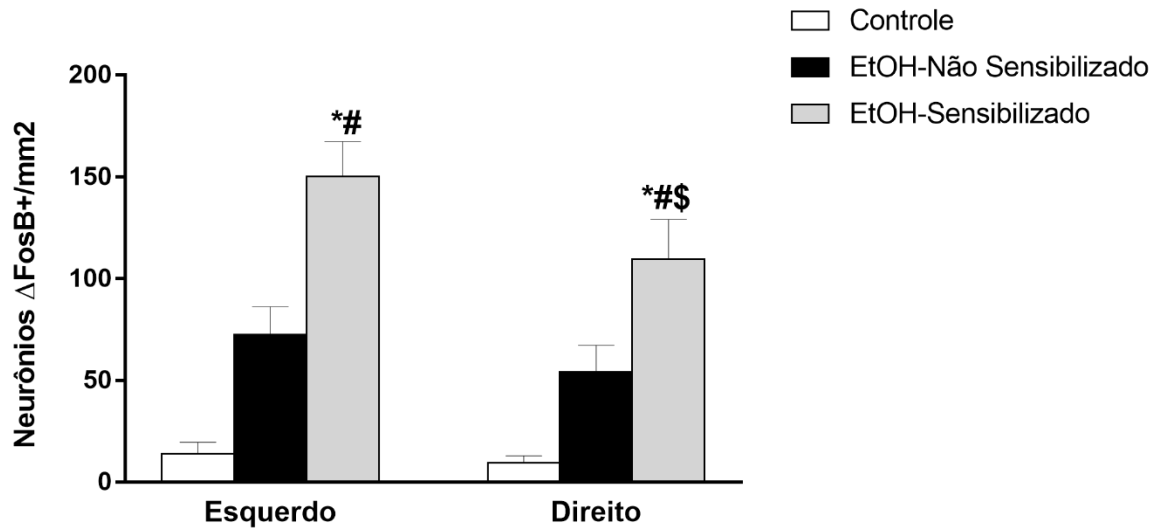
**Figura 6:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB no córtex PrL. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. (n = 6-9 animais/grupo); \* p < 0,05 em relação ao grupo controle; # p < 0,05 em relação ao grupo EtOH-Não Sensibilizado.



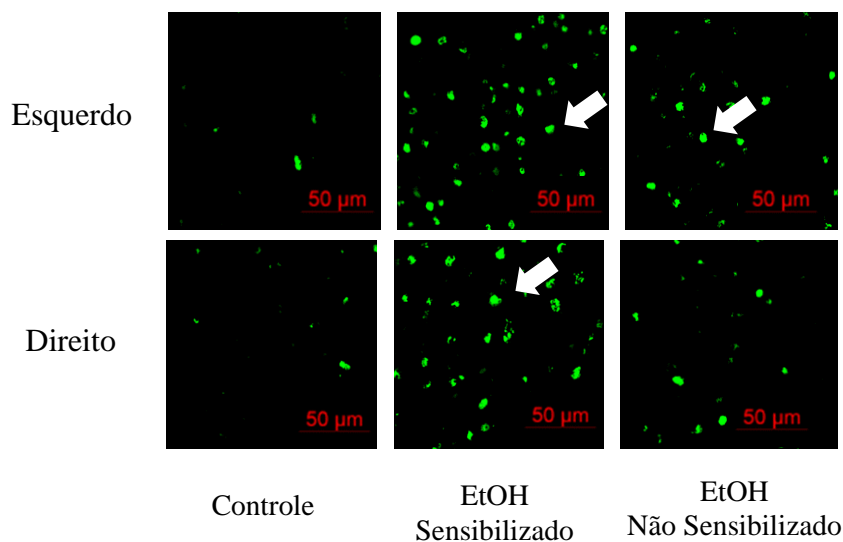
Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

**Figura 7:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito do córtex IL. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. (n = 6-9 animais/grupo); \* p < 0,05 em relação ao grupo controle; # p < 0,05 em relação ao grupo EtOH-Não Sensibilizado do mesmo lado; \$ p < 0,05 em relação ao mesmo grupo no lado esquerdo.

**A**



**B**

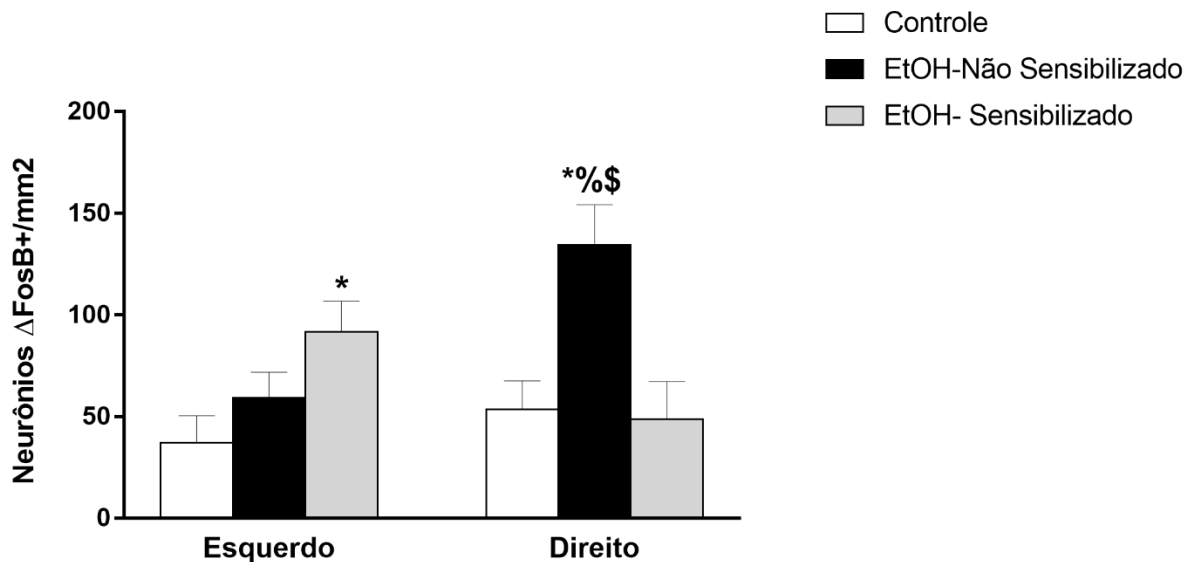


Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

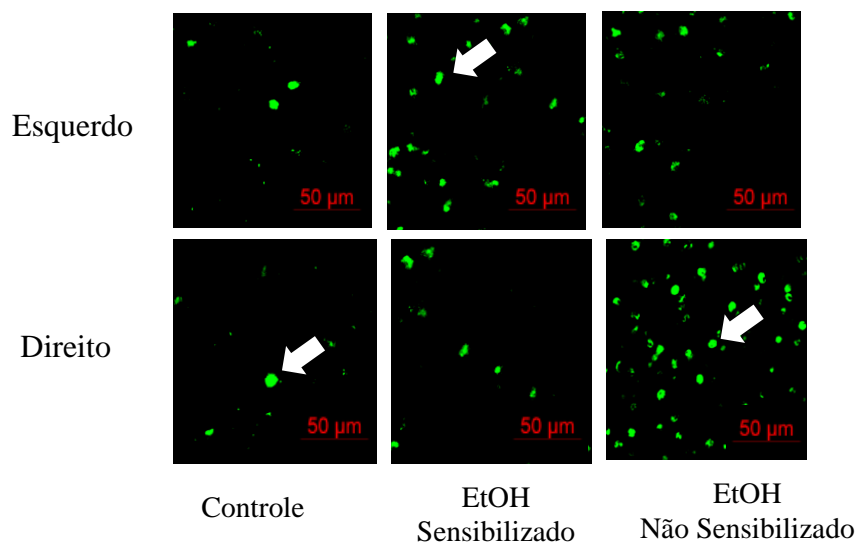
No OFC, ANOVA mostrou diferenças significativas para o fator fenótipo ( $F_{2,34} = 5,32$ ;  $p < 0,05$ ) e para a interação entre fenótipo e lado ( $F_{2,34} = 7,06$ ;  $p < 0,05$ ). Não houve efeito significativo quanto ao fator lado ( $F_{1,34} = 1,59$ ;  $p = 0,22$ ). No hemisfério esquerdo, o grupo EtOH-Sensibilizado apresentou aumento do conteúdo de  $\Delta$ FosB quando comparado aos grupos controle e EtOH-Não Sensibilizado ( $p < 0,05$ ). Em contraste, no hemisfério direito, o grupo EtOH-Não Sensibilizado demonstrou maior expressão de  $\Delta$ FosB em relação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). O grupo não sensibilizado também apresentou maior conteúdo de  $\Delta$ FosB no hemisfério direito quando comparado ao mesmo grupo no hemisfério esquerdo ( $p < 0,05$ ) (Figura 8).

**Figura 8:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito do OFC. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. (n = 6-9 animais/grupo); \* p < 0,05 em relação ao grupo controle; % p < 0,05 em relação ao grupo EtOH-Sensibilizado ; \$ p < 0,05 em relação ao mesmo grupo no lado esquerdo.

**A**



**B**

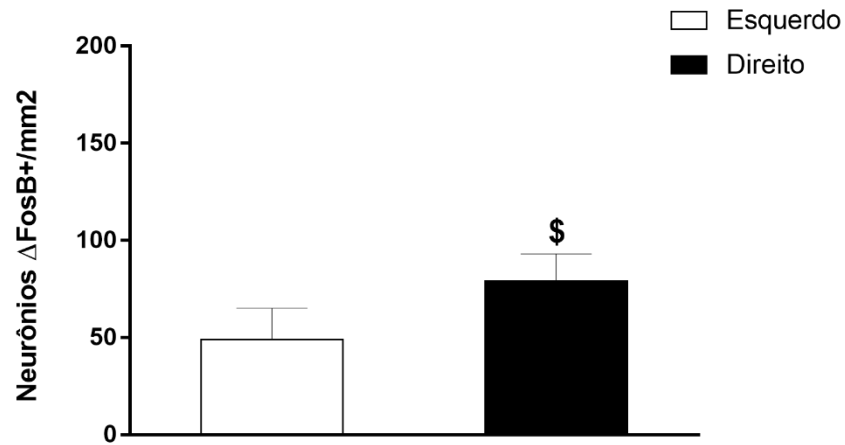
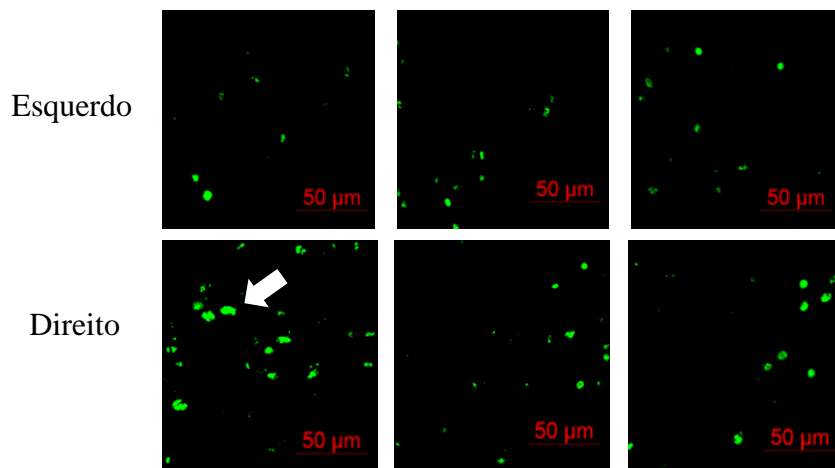


Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

No Acb, sub-região do *core*, a ANOVA de duas vias não apontou diferenças significativas para o fator fenótipo ( $F_{2,39} = 1,80$ ;  $p = 0,17$ ) e nem para a interação entre os dois fatores ( $F_{2,39} = 2,18$ ;  $p = 0,12$ ). Entretanto, houve uma tendência ao efeito significativo quanto ao fator lado ( $F_{1,39} = 4,05$ ;  $p = 0,050$ ). Sendo assim, foi considerado apenas o fator lado no teste *post hoc* de Duncan, que demonstrou maior expressão de  $\Delta$ FosB no hemisfério direito quando comparado ao hemisfério esquerdo ( $p < 0,05$ ). (Figura 9). Em contrapartida, no Acb *shell*, a ANOVA mostrou efeito significativo para fator fenótipo ( $F_{2,44} = 3,45$ ;  $p < 0,05$ ) mas não para o fator lado ( $F_{2,44} = 2,97$ ;  $p = 0,09$ ) e nem para a interação entre eles ( $F_{2,44} = 1,62$ ;  $p = 0,20$ ). No entanto, devido ao baixo valor de  $p$  para o fator lado, a análise seguiu para o pós-teste de Duncan. Somente no lado esquerdo o grupo EtOH-Sensibilizado apresentou aumento da expressão de  $\Delta$ FosB quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 10).

Na região do DmS, a ANOVA de duas vias mostrou alterações significativas apenas para fator fenótipo ( $F_{2,42} = 35,2$ ;  $p < 0,001$ ). Não houve efeitos significativos quanto ao fator lado ( $F_{1,42} = 3,25$ ;  $p = 0,07$ ) e nem para a interação entre eles ( $F_{2,42} = 1,78$ ;  $p = 0,18$ ). Entretanto, o baixo valor de  $p$  para o fator lado permitiu que a análise fosse continuada. Sendo assim, o grupo EtOH-Sensibilizado apresentou aumento da expressão de  $\Delta$ FosB em ambos os hemisférios quando comparado aos grupos controle e EtOH-Não Sensibilizado ( $p < 0,001$ ). Além disso, o grupo de animais sensibilizados apresentou maior conteúdo de  $\Delta$ FosB no hemisfério direito em relação ao mesmo grupo no hemisfério esquerdo ( $p < 0,05$ ) (Figura 11).

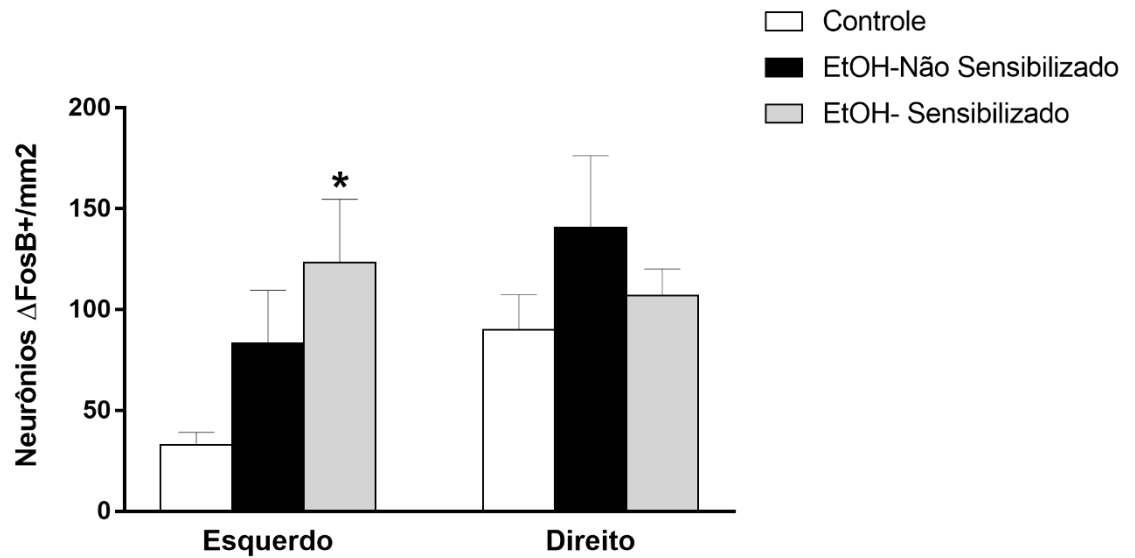
**Figura 9:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito do AcbC. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. (n = 6-9 animais/grupo); \$ p < 0,05 em relação ao lado esquerdo.

**A****B**

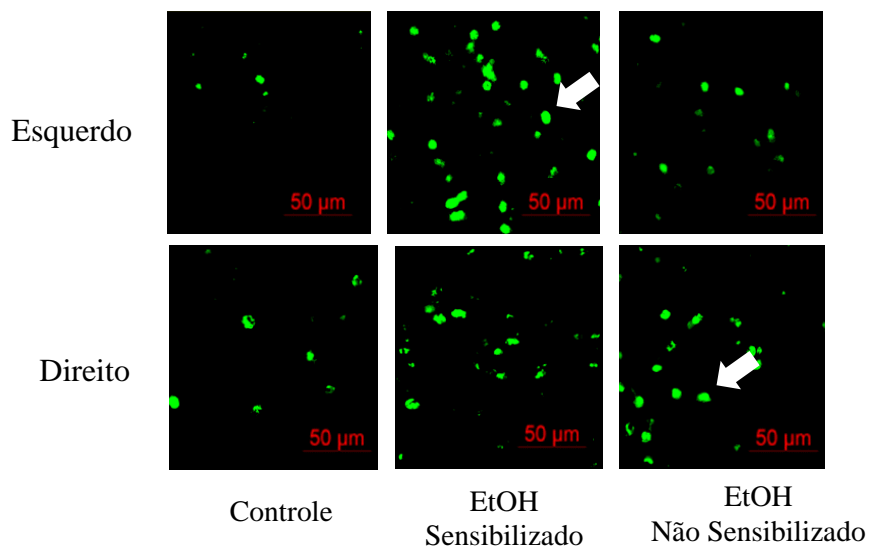
Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

**Figura 10:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito do AcbS. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

**A**



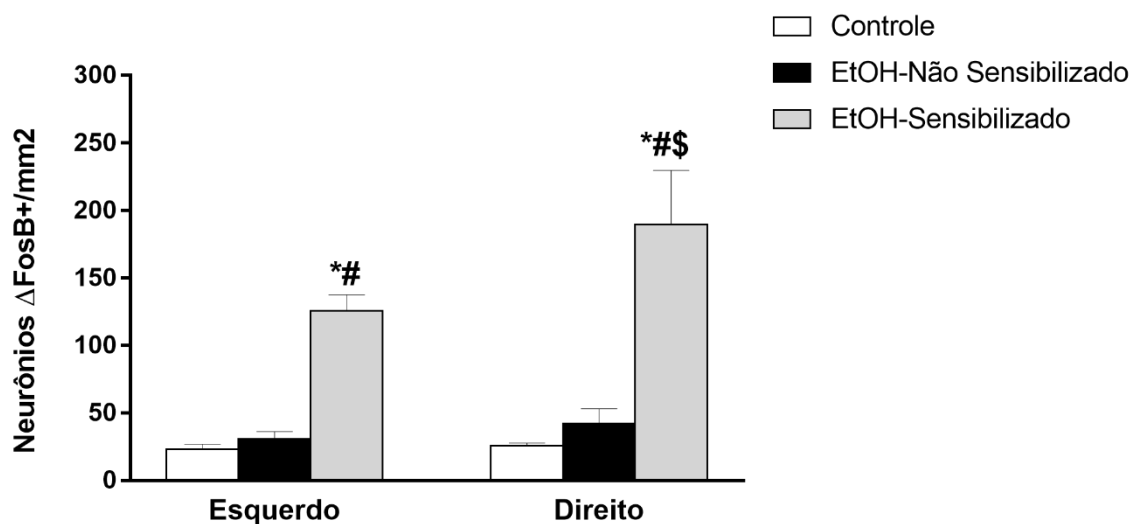
**B**



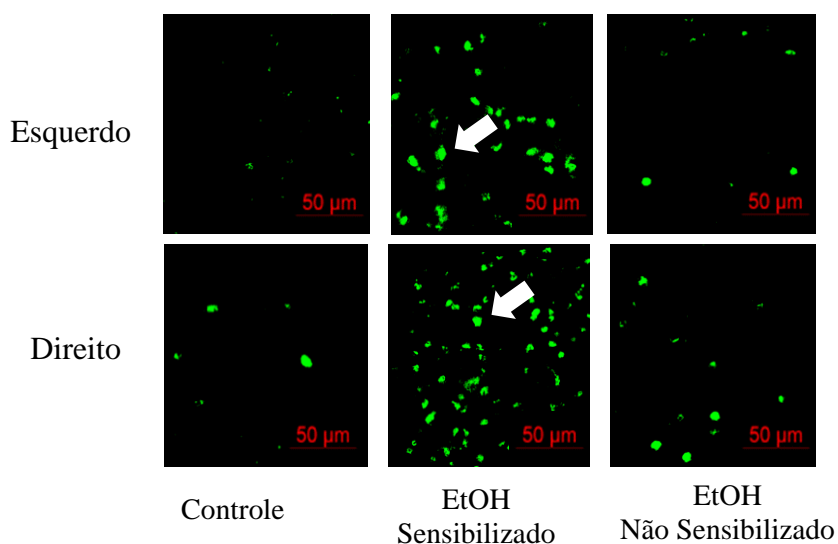
Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

**Figura 11:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito do DmS. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo EtOH-Não Sensibilizado do mesmo lado; \$  $p < 0,05$  em relação ao mesmo grupo no lado esquerdo.

**A**



**B**



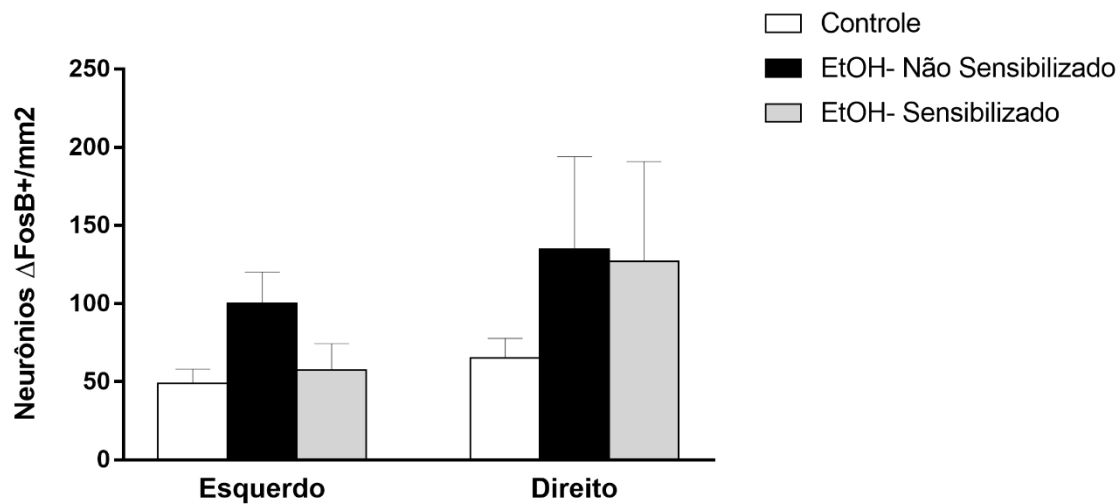
Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.



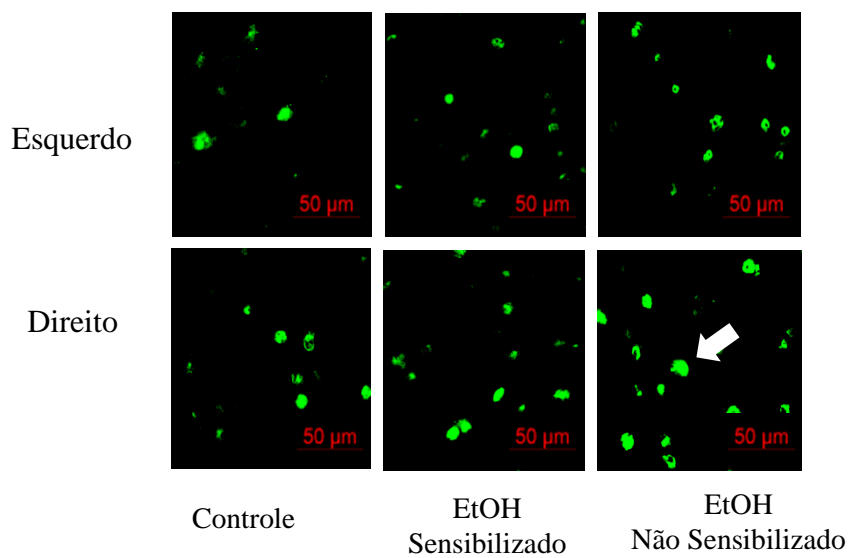
Na região da BLA, a ANOVA de duas vias não apontou diferenças estatísticas quanto ao fator fenótipo ( $F_{2,27} = 1,33$ ;  $p = 0,28$ ) ou fator lado ( $F_{1,27} = 1,69$ ;  $p = 0,20$ ) e nem para a interação entre eles ( $F_{2,27} = 0,25$ ;  $p = 0,78$ ) (Figura 12). No entanto, na sub-região central da amígdala (CeA), a análise de variância demonstrou efeito significativo para o fator fenótipo ( $F_{2,30} = 11,1$ ;  $p < 0,001$ ) e uma tendência ao efeito quanto ao fator lado ( $F_{1,30} = 3,38$ ;  $p = 0,07$ ). Não houve efeito significativo para a interação entre os dois fatores ( $F_{2,30} = 1,48$ ;  $p = 0,24$ ). O teste *post hoc* de Duncan mostrou que os animais dos grupos tratados com etanol, independentemente de estarem sensibilizados ou não, apresentaram aumento da expressão de  $\Delta$ FosB apenas no hemisfério direito ( $p < 0,05$ ) (Figura 13).

**Figura 12:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito da BLA. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência.

**A**



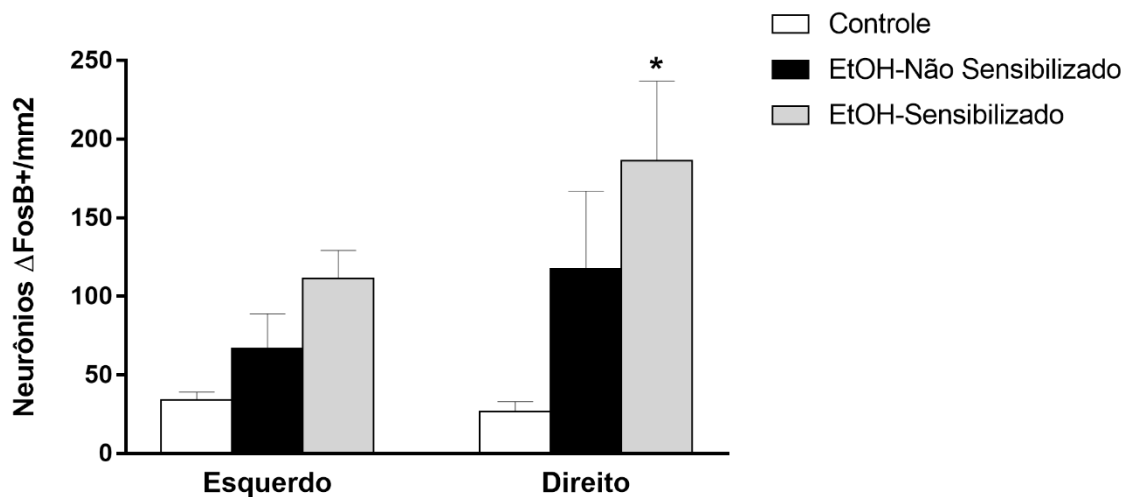
**B**



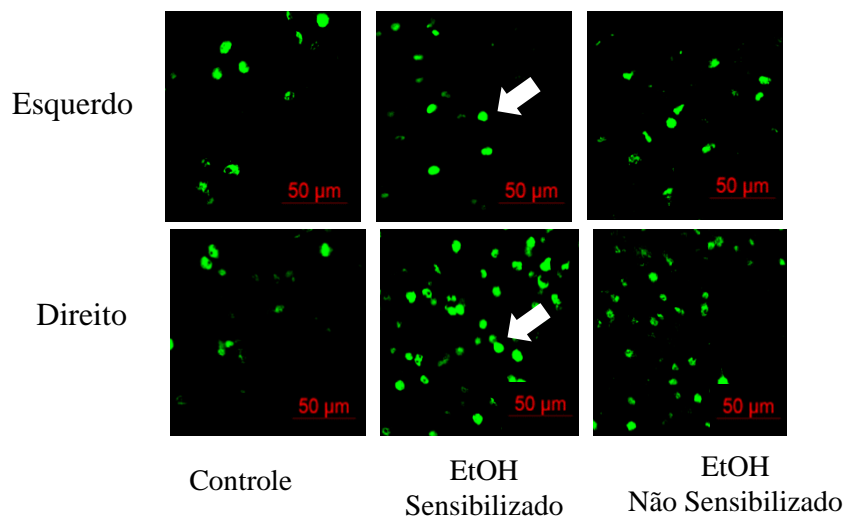
Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

**Figura 13:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito da CeA. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

**A**



**B**



Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

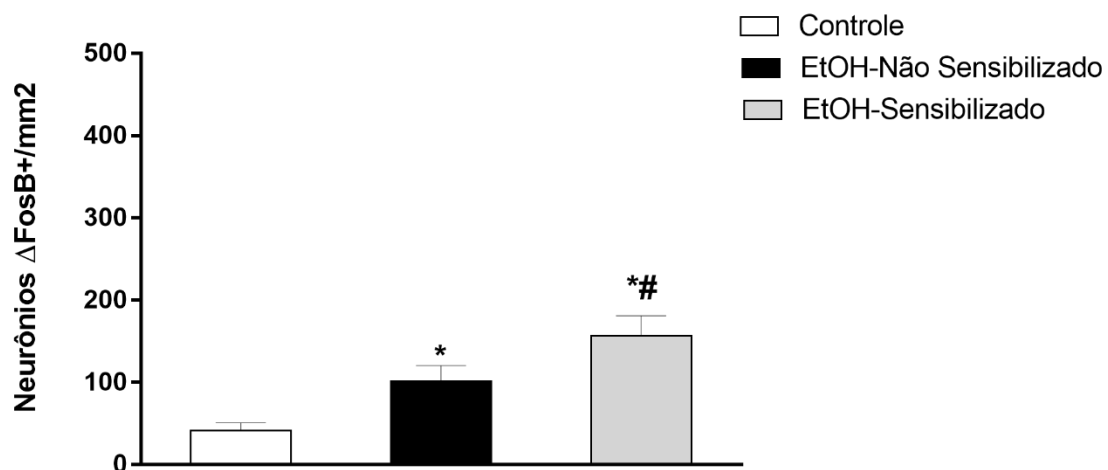
Na sub-região AIV, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo apenas para o fator fenótipo ( $F_{2,40} = 13,4$ ;  $p < 0,001$ ). Não houve alterações significativas quanto ao fator lado ( $F_{1,40} = 0,59$ ;  $p = 0,44$ ) e nem para a interação entre eles ( $F_{2,40} = 0,16$ ;  $p = 0,85$ ). Neste sentido, o *post-hoc* de Duncan foi realizado considerando apenas o fator fenótipo, que demonstrou aumento da expressão de  $\Delta$ FosB nos animais dos grupos tratados com etanol em relação aos animais do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Além disso, o grupo EtOH-Sensibilizado apresentou maior conteúdo de  $\Delta$ FosB quando comparado ao grupo EtOH-Não Sensibilizado ( $p < 0,05$ ) (Figura 14).

Na GDI, a ANOVA apontou diferença significativa quanto ao fator fenótipo ( $F_{2,42} = 9,22$ ;  $p < 0,001$ ) e para a interação entre fenótipo e lado ( $F_{2,42} = 7,35$ ;  $p < 0,001$ ). Não foi observado efeito significativo para o fator lado ( $F_{1,42} = 1,57$ ;  $p = 0,22$ ). No hemisfério esquerdo da GDI houve aumento do conteúdo de  $\Delta$ FosB nos animais do grupo EtOH-Não Sensibilizado quando comparado aos grupos controle e EtOH-Sensibilizado e quando comparado ao mesmo grupo do lado direito ( $p < 0,05$ ). Enquanto que no hemisfério direito, somente os animais sensibilizados apresentaram aumento da expressão de  $\Delta$ FosB em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 15).

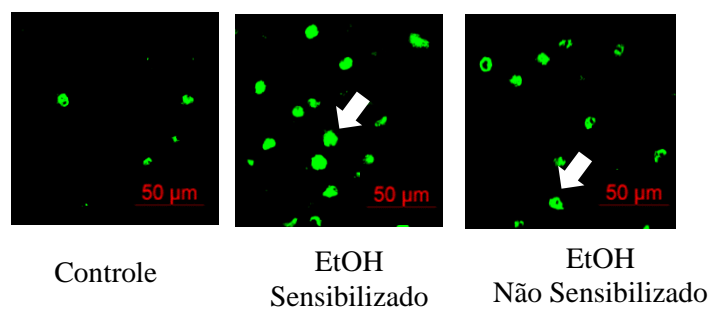
Na região da VTA, a ANOVA apontou efeito significativo para o fator fenótipo ( $F_{2,42} = 4,50$ ;  $p < 0,05$ ) e para a interação entre fenótipo e lado ( $F_{2,42} = 5,50$ ;  $p < 0,05$ ). Não foi demonstrado alterações significativas para o fator lado ( $F_{1,42} = 0,003$ ;  $p = 0,98$ ). O teste *post hoc* de Duncan evidenciou que o grupo EtOH-Não Sensibilizado apresentou maior conteúdo de  $\Delta$ FosB unicamente no hemisfério direito em relação aos grupos controle e EtOH-Sensibilizado e em relação ao mesmo grupo no hemisfério esquerdo ( $p < 0,05$ ) (Figura 16).

**Figura 14:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB na AIV. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

**A**



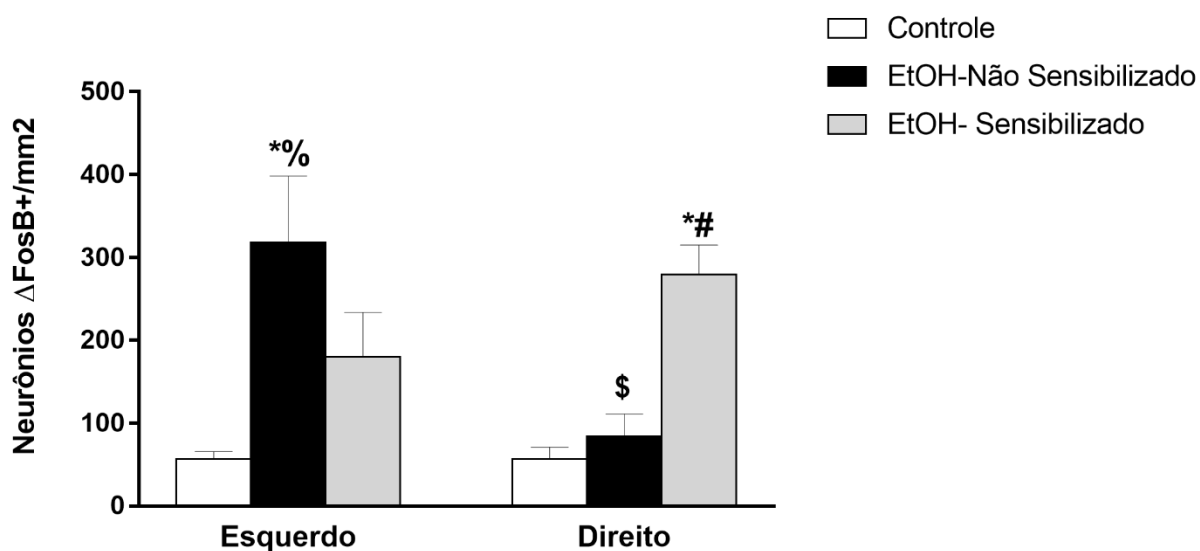
**B**



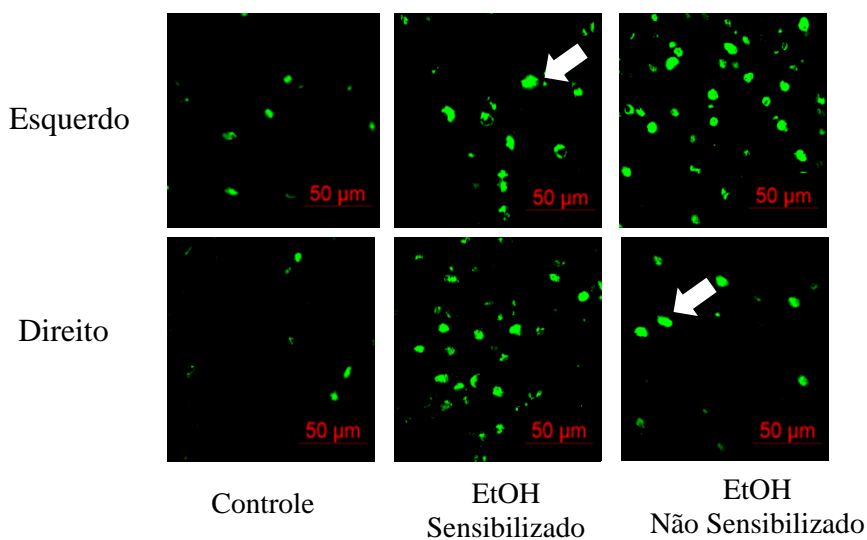
Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

**Figura 15:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito da GDI. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo EtOH-Não Sensibilizado do mesmo lado; %  $p < 0,05$  em relação ao grupo EtOH-Sensibilizado; \$  $p < 0,05$  em relação ao mesmo grupo no lado esquerdo.

**A**



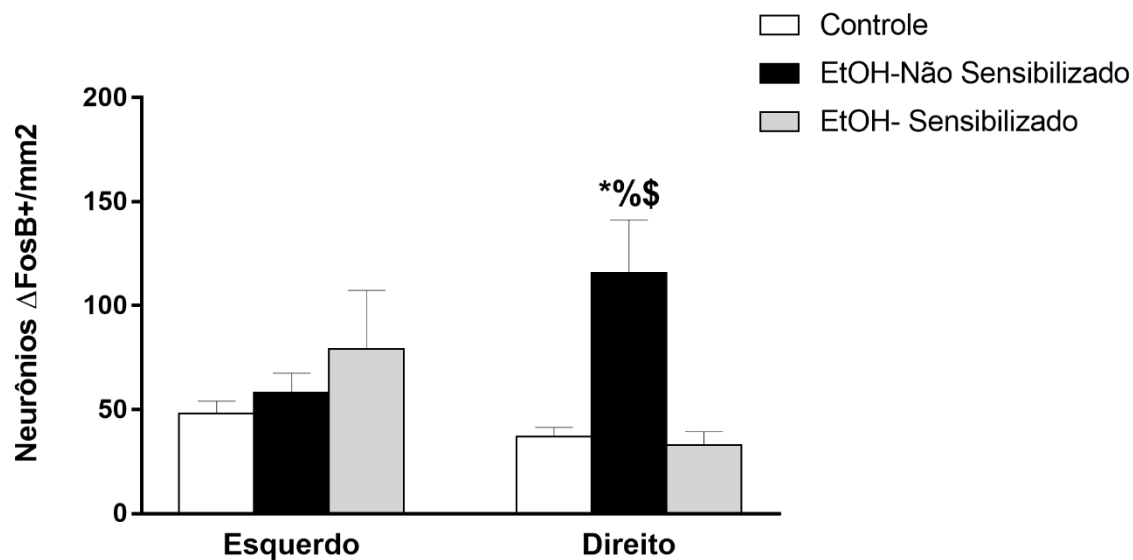
**B**



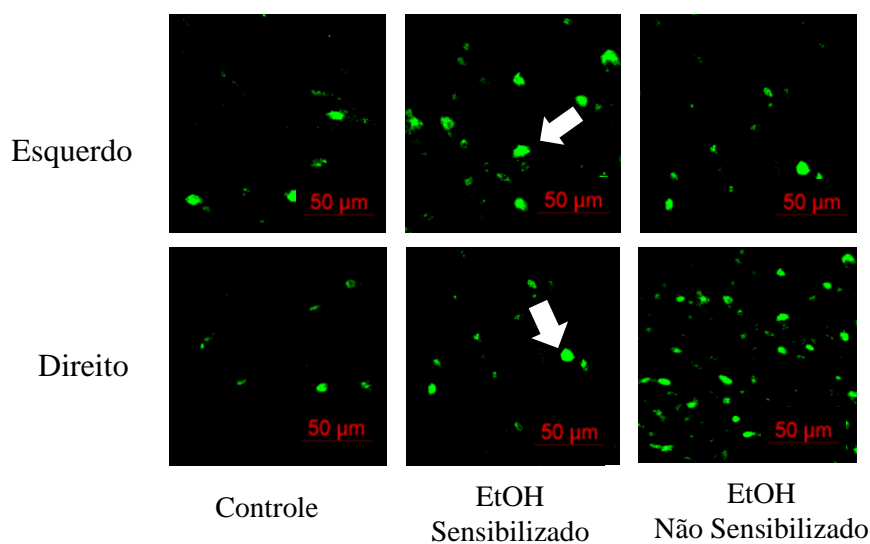
Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

**Figura 16:** **A**, número de neurônios positivos para  $\Delta$ FosB nos hemisférios esquerdo e direito da VTA. **B**, fotomicrografia representativa dos grupos experimentais através da marcação por imunofluorescência. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; %  $p < 0,05$  em relação ao grupo EtOH-Sensibilizado do mesmo lado; \$  $p < 0,05$  em relação ao mesmo grupo no lado esquerdo.

**A**



**B**



Nota: As setas brancas representam os neurônios positivos para  $\Delta$ FosB.

## 5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram uma variabilidade interindividual no desenvolvimento da sensibilização comportamental. Enquanto alguns animais desenvolveram intensa sensibilização locomotora durante o tratamento repetido com etanol, outros não apresentaram sensibilização locomotora significativa, mesmo tendo recebido o mesmo tratamento. Esses achados nos permitiram distribuir os animais tratados com etanol em dois grupos: EtOH-Sensibilizados e EtOH-Não Sensibilizados. Além disso, foi observado que os diferentes grupos apresentaram padrões distintos na expressão de  $\Delta$ FosB em regiões encefálicas relacionadas à dependência e à atividade locomotora, como CPF, Acb, DmS, VTA, CeA, AIV e GDI.

Nem todos os animais expostos a administrações repetidas de substâncias de abuso desenvolvem sensibilização comportamental. Esse fenômeno depende de diversas variáveis, tais como contexto ambiental, estresse, fatores genéticos, protocolos de administração e tipo de substância (PHILLIPS et al., 1997; SANCHIS-SEGURA & SPANAGEL, 2006; MARIN et al., 2009). Especialmente para drogas depressoras do SNC, como o etanol, o desenvolvimento da sensibilização comportamental não é tão simples. Enquanto a sensibilização locomotora é dificilmente induzida em camundongos da linhagem C57BL, em camundongos DBA ela aparece mais facilmente (PHILLIPS et al., 1997). Camundongos com alta preferência pelo etanol (*HAP*, do inglês, *high-alcohol preferring*) também desenvolvem sensibilização locomotora mais facilmente quando comparados aos camundongos com baixa preferência pelo etanol (*LAP*, do inglês, *low-alcohol preferring*) (GRAHAME et al., 2000).

No presente estudo, foi utilizada apenas a linhagem de camundongos Suíços heterogênicos, de modo similar ao que foi feito por Coelho et al. (2013). Através desse procedimento, observou-se uma considerável diferença fenotípica entre os animais tratados repetidamente com etanol, tanto no desenvolvimento da sensibilização comportamental (aumento da atividade locomotora induzida ao longo do tempo) quanto na expressão (resposta ao desafio com etanol uma semana após o término do tratamento crônico).

A sensibilização comportamental compreende um importante método para investigar neuroadaptações relacionadas a escalada da ingestão de etanol (ROBINSON & BERRIDGE, 1993; CAMARINI et al., 2016). Tais neuroadaptações ocorrem



principalmente em regiões que medeiam os comportamentos de reforço positivo, como a via dopaminérgica mesocorticolímbica. Uma vez desenvolvida, a sensibilização comportamental permanece por um longo período de tempo e pode implicar no comportamento de desejo impulsivo e incontrolado de busca pela droga. Este mecanismo, do inglês conhecido como *craving*, é descrito como sendo um dos principais comportamentos de risco relacionados a dependência (AGNOSTARAS et al., 2002; GORDON, 2016).

Em camundongos Suíços, a sensibilização comportamental mais robusta induzida pelo etanol foi associada com um aumento na ligação do receptor de dopamina D<sub>2</sub> na região do estriado (SOUZA-FORMIGONI et al., 1999), enquanto uma sensibilização mais branda foi associada com um aumento na ligação do receptor NMDA na mesma área (QUADROS et al. 2002a). No presente estudo, também observamos essa variabilidade no desenvolvimento da sensibilização comportamental com diferenças nas características moleculares da via mesocorticolímbica e nigroestriatal. Mais especificamente, observamos diferentes conteúdos na expressão de  $\Delta$ FosB em AcbS, DmS, Cg1, PrL, IL, OFC, CeA, VTA, AIV e GDI.

O acúmulo de  $\Delta$ FosB foi encontrado após tratamentos crônicos com cocaína (HOPE et al., 1994), morfina (MULLER; UNTERWALD, 2005), anfetamina (CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2016) e após protocolos de sensibilização comportamental induzida por etanol (DE PAULI et al., 2014). Esse acúmulo ocorre porque a  $\Delta$ FosB é bioquimicamente mais estável que as outras proteínas da família Fos e persiste nos neurônios por pelo menos várias semanas após a interrupção da exposição a substância de abuso, enquanto a FosB retorna aos níveis basais em algumas horas após o estímulo agudo (NESTLER et al., 2008). A estabilidade de  $\Delta$ FosB fornece um mecanismo molecular pelo qual as neuroadaptações induzidas pelas drogas de abuso podem persistir apesar de longos períodos de abstinência. Portanto, a  $\Delta$ FosB é considerada uma proteína sustentada que influencia na iniciação e na manutenção do comportamento dependente (NESTLER et al., 2001; MCCLUNG et al., 2004).

Alguns estudos demonstram a existência de diferenças importantes em regiões encefálicas que compõem as vias dopaminérgicas entre os hemisférios cerebrais direito e esquerdo, as quais podem afetar o comportamento (MOLOCHNIKOV; COHEN, 2014). Em humanos, a maior motivação para estímulos reforçadores está associada com uma maior disponibilidade de receptores de dopamina do tipo D<sub>2</sub> no núcleo estriado do

hemisfério esquerdo em relação ao hemisfério direito (TOMER et al., 2008). Dados obtidos através de tomografia por emissão de pósitrons (PET) demonstraram que a maior liberação de DA no Acb esquerdo estava correlacionado com a sensação de intoxicação por etanol relatada pelos sujeitos experimentais (OBERLIN, 2015).

Já é bem descrito na literatura que o Acb é o principal alvo da via mesocorticolímbica e o centro do sistema cerebral de recompensa (LÜSCHER & MALENKA, 2011). Vários estudos descrevem o acúmulo de  $\Delta$ FosB nessa área após exposição crônica ao álcool (PERROTTI et al., 2005; LOBO et al., 2013; DE PAULI et al., 2014). Em nosso estudo, foi observado que os animais do grupo EtOH-Sensibilizado tiveram um aumento da expressão de  $\Delta$ FosB apenas no hemisfério cerebral esquerdo na subregião do AcbS. Esses resultados corroboram outros estudos que mostraram que o acúmulo de  $\Delta$ FosB no Acb promoveu aumento na sensibilização comportamental induzida por psicoestimulantes em roedores (ROBINSON et al., 2013). O acúmulo de  $\Delta$ FosB no AcbS do lado esquerdo também se relacionada com a observação de Gordon (2016) de que o *craving* ao etanol induzido por dicas ambientais está relacionado à ativação predominante do lado esquerdo do encéfalo. Além disso, nossos dados também são consistentes com a predominância da atividade do hemisfério esquerdo em associar-se ao efeito reforçador positivo, enquanto o hemisfério direito pode estar envolvido com os efeitos reforçadores negativos (TOMER et al., 2008).

A teoria do reforço negativo é baseada nas observações de que indivíduos dependentes mantinham o uso da substância de abuso para evitar o desconforto da retirada (JAFFE, 1990). Diversos estudos apontam a AMY como sendo uma região encefálica envolvida no processamento de estímulos aversivos e estressores, na modulação do medo e nos comportamentos relacionados à ansiedade (SAH et al., 2003; KNAPSKA et al., 2007; SORREGOTTI et al., 2018), sintomas esses que são comumente observados em indivíduos abstinentes.

Ao considerar o período de retirada de substâncias de abuso como sendo um período em que o indivíduo pode desenvolver comportamentos desagradáveis e do tipo ansiogênicos, nossos dados apontaram que os animais tratados com etanol, tanto sensibilizados quanto não sensibilizados, apresentaram aumento da expressão de  $\Delta$ FosB na região da CeA apenas no hemisfério direito. Sendo assim, o aumento de  $\Delta$ FosB observado nos camundongos do grupo EtOH-Não Sensibilizado pode estar relacionado mais fortemente com o período de retirada do que com os efeitos intrínsecos do etanol. Tal dado corrobora estudos que relacionaram maior ativação ou aumento de

FosB/ $\Delta$ FosB em diversas regiões envolvidas na dependência ao período em que os animais estiveram em abstinência ao etanol (DE PAULI et al., 2014) e à nicotina (SUTHERLAND et al., 2013).

No entanto, a ativação das projeções dopaminérgicas para a AMY provocadas pelo uso de substâncias de abuso é um fator considerável no desenvolvimento da sensibilização locomotora (VANDERSCHUREN; KALIVAS, 2000). Além disso, um estudo conduzido por Kaplan et al. (2011) demonstrou aumento da expressão de  $\Delta$ FosB na CeA e BLA de camundongos C57BL/6 e tal efeito foi associado ao desenvolvimento da sensibilização comportamental induzida pela morfina. De maneira semelhante, o aumento de  $\Delta$ FosB na CeA observado em nosso estudo, também pode estar relacionado ao desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol.

Em relação ao grupos, os animais não sensibilizados não apresentaram aumento da atividade locomotora apesar do aumento de  $\Delta$ FosB na CeA. Este resultado pode ser explicado através das projeções de neurônios serotoninérgicos que chegam até a CeA provenientes do núcleo dorsal da rafe e que ao serem ativados diminuem a função locomotora (REN et al., 2018). Portanto, nós hipotetizamos que a CeA no hemisfério direito pode apresentar projeções serotoninérgicas quantitativamente maiores ou mais responsivas aos efeitos do etanol do que o hemisfério esquerdo.

A AMY e ínsula são constituintes do circuito envolvido principalmente na manutenção da dependência (KOOB; VOLKOW, 2010). Essas estruturas são anatomicamente e funcionalmente interconectadas (ROY et al., 2009) e as interações entre elas estão envolvidas em múltiplos estágios da dependência (NAVQI; BECHARA, 2009). O provável papel da ínsula na dependência de substâncias de abuso está relacionada aos comportamentos impulsivos envolvidos na busca pela droga (NAVQI; BECHARA, 2008). A ativação desta estrutura tem sido correlacionada positivamente com o comportamento de *craving* para substâncias como cocaína (BONSON et al., 2002) e nicotina (BRODY et al., 2002). Diversos estudos de imagem revelaram ativação da ínsula durante o uso impulsivo de substâncias de abuso, dentre elas nicotina (BRODY et al., 2007), cocaína (KILTS et al., 2001), heroína (SHELL, 1999) e álcool (MYRICK et al., 2004; TAPERT et al., 2004).

De acordo com um estudo de Bechara (2005), o desenvolvimento da dependência é causado, em partes, por um desequilíbrio entre dois sistemas: o sistema impulsivo que controla a motivação para recompensas imediatas e o sistema reflexivo, que regula o impulsivo de acordo com as sensações prazerosas ou aversivas. O mesmo

autor descreve que a exposição crônica a drogas de abuso promove a sensibilização do sistema impulsivo e a diminuição da atividade do reflexivo (NAQVI; BECHARA, 2010). Neste contexto, a ínsula é descrita como uma importante estrutura envolvida no desequilíbrio desses sistemas. Quando ativada, ela parece intensificar a atividade do sistema impulsivo e impossibilitar sua regulação pelo sistema reflexivo (NAQVI; BECHARA, 2010).

Nossos dados demonstraram que o tratamento crônico com etanol aumentou a expressão de  $\Delta$ FosB em ambos os hemisférios dos animais sensibilizados e não sensibilizados na GDI. Nos animais do grupo EtOH-Sensibilizado o aumento ocorreu no hemisfério direito, logo nossa hipótese envolve este hemisfério como sendo um possível modulador dos comportamentos impulsivos relacionados ao desenvolvimento da dependência. No entanto, nos animais do grupo EtOH-Não Sensibilizado o aumento de  $\Delta$ FosB ocorreu predominantemente no hemisfério esquerdo, o que indica a probabilidade deste hemisfério estar envolvido na modulação da atividade do sistema reflexivo.

O CPF está associado ao processamento cognitivo e emocional e suas estruturas podem desempenhar múltiplos papéis nas tomadas de decisões, no controle das respostas ao estresse e nas alterações comportamentais (LEE et al., 2015). Com exceção do OFC, as subregiões Cg1, PrL e IL formam o CPFm (LASSETER et al., 2010). Assim como a ínsula, o OFC é identificado como um sub-núcleo que é perturbado em situações de abuso de drogas (DOM et al., 2005; FETTER et al., 2017) e está fortemente implicado na impulsividade e compulsividade que caracterizam um estado dependente (KALIVAS; VOLKOW, 2005).

Em indivíduos usuários de cocaína, estudos de imagem revelaram redução da densidade no OFC (MATOCHIK et al., 2003). Adicionalmente, indivíduos dependentes apresentaram uma disfunção nos comportamentos de tomada de decisões e no desenvolvimento da compulsão por substâncias de abuso similar aqueles observados em indivíduos com danos no OFC (BECHARA; VAN DER LINDEN, 2005). A administração crônica de cocaína aumentou a expressão de  $\Delta$ FosB no OFC, o que corrobora a hipótese de que o OFC pode estar envolvido nos déficits de controle de impulsos evidentes na dependência (WINSTANLEY et al., 2007).

Neste estudo, foi observado que diferentes grupos foram responsáveis pelos diferentes padrões de expressão de  $\Delta$ FosB no OFC. No hemisfério esquerdo, os camundongos sensibilizados apresentaram um acúmulo de  $\Delta$ FosB, enquanto no

hemisfério direito, os camundongos não sensibilizados apresentaram um conteúdo elevado de  $\Delta$ FosB. Nossos dados estão em concordância com Winstanley et al. (2009) que demonstrou que ratos que consumiam grandes quantidades de cocaína apresentaram superexpressão de  $\Delta$ FosB no OFC e se tornaram mais impulsivos durante as fases de retirada da droga, o que tornou-os mais vulneráveis a recaída.

Sendo assim, o aumento da expressão de  $\Delta$ FosB no OFC é responsável por potencializar o desenvolvimento e a manutenção da dependência ao facilitar a perda do controle durante o uso frequente de drogas e aumentar a susceptibilidade a recaída. No entanto, ao contrário do que hipotetizado para a região insular, o acúmulo de  $\Delta$ FosB no OFC do hemisfério direito parece estar envolvido no controle dos comportamentos impulsivos, impedindo que os animais se tornassem sensibilizados ao tratamento crônico com etanol.

Assim como a sensibilização locomotora, outros modelos de estudo também distinguem os fenótipos de roedores com base nos diferentes comportamentos apresentados. Por exemplo, camundongos expostos ao procedimento de estresse de derrota social crônica podem ser classificados como resilientes ou suscetíveis, e cada fenótipo apresenta diferentes alterações comportamentais (GOLDEN et al., 2011). O aumento de  $\Delta$ FosB é observado no CPF de camundongos suscetíveis (VIALOU et al., 2014) e também em circuitos límbicos após exposição repetida a drogas (PERROTTI et al., 2004). Logo, pode-se inferir que o período de retirada também poderia desencadear uma elevação da expressão de  $\Delta$ FosB pois representa um período estressante para o animal.

Ao transpor esses resultados para nossos achados, o acúmulo de  $\Delta$ FosB observado na região IL em ambos os hemisférios pode representar um marcador de vulnerabilidade à dependência nos animais sensibilizados. Além disso, o aumento de  $\Delta$ FosB também observado nos animais sensibilizados no córtex PrL sugere que a ativação de tais subregiões do CPFm é importante para o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Neste contexto, animais não sensibilizados mostraram um aumento da expressão de  $\Delta$ FosB apenas no hemisfério cerebral direito do Cg1, semelhante ao que foi observado no OFC direito. Assim, nós hipotetizamos que a ativação mais intensa no hemisfério direito do Cg1 modula a atividade do hemisfério esquerdo no controle do desenvolvimento do estresse e da impulsividade durante a abstinência e seus efeitos na atividade locomotora.

Neurônios do DmS que são expostos por um período prolongado a altas concentrações de dopamina podem aumentar a expressão de  $\Delta$ FosB (KELZ et al., 1999). O aumento do tônus dopaminérgico no DmS tem sido associado a uma atividade locomotora elevada (DO et al., 2012). Nossos resultados estão de acordo com esses achados, pois foi observado que apenas o grupo EtOH-Sensibilizado apresentou níveis elevados de  $\Delta$ FosB em ambos os hemisférios do DmS.

Por fim, a VTA é uma região que possui diversas projeções para outros núcleos e sua participação nos processos de recompensa depende de vários fatores (IKEMOTO et al., 2007). Por exemplo, o sistema endocanabinoide, receptores do tipo GABA-A, receptores dopaminérgicos do tipo D3 e receptores serotoninérgicos 5-HT3, desempenham importantes funções nos comportamentos de busca pela droga (ROOD et al., 2010; MÉLON E BOEHM, 2011; HAUSER et al., 2011). No entanto, é descrito que os processos de recompensa (MOORE; BOEHM, 2009), os efeitos estimulantes da cocaína (PERROTTI et al., 2005) e do etanol (BOEHM et al., 2002) estão mais relacionados com a presença de receptores GABA-B na projeção anterior da VTA.

No presente estudo, nós observamos aumento da expressão de  $\Delta$ FosB apenas no hemisfério direito da VTA de animais do grupo EtOH-Não Sensibilizado. Nossos achados são distintos dos observados por De Pauli et al. (2014), que observou aumento de FosB/ $\Delta$ FosB em animais sensibilizados após a exposição repetida ao etanol e ao período de retirada. Porém, estão de acordo com Perrotti et al. (2005) que demonstrou que a exposição crônica a morfina e ao estresse não aumentaram o conteúdo de  $\Delta$ FosB na VTA. Portanto, é provável que o aumento de  $\Delta$ FosB no hemisfério direito tenha modulado a atividade do hemisfério esquerdo durante o desenvolvimento da sensibilização comportamental e durante a retirada, o que reforça nossa hipótese de que o hemisfério direito parece controlar os comportamentos relacionados a dependência e impedir, pelo menos em parte, que os indivíduos que fazem uso de etanol de maneira recreativa se tornem dependentes.

Dessa maneira, a variabilidade comportamental no desenvolvimento da sensibilização locomotora é acompanhada por neuroadaptações distintas nos sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbico e nigroestriatal. Nossa hipótese é que o hemisfério esquerdo tem papel predominante na sensibilização locomotora e em comportamentos relacionados a dependência, enquanto o hemisfério direito parece controlar e/ou inibir esses comportamentos.

## 6 CONCLUSÃO

Em suma, este trabalho demonstrou que a variabilidade no desenvolvimento da sensibilização comportamental é acompanhada por padrões distintos de expressão de  $\Delta$ FosB em regiões encefálicas envolvidas na dependência (Tabela 2). Também foi observado que os hemisférios cerebrais direito e esquerdo possuem diferentes funções na neuroplasticidade relacionada à dependência, sendo que o lado esquerdo parece estar envolvido no desenvolvimento e expressão da sensibilização locomotora e em comportamentos relacionados a dependência, enquanto o hemisfério direito parece inibir esses comportamentos

**Tabela 2:** Resumo das regiões encefálicas relacionadas a dependência que apresentaram padrões distintos na expressão de  $\Delta$ FosB entre os grupos nos hemisférios esquerdo e direito.

Regiões encefálicas	Controle		EtOH-Não Sensibilizado		EtOH-Sensibilizado	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
<i>Cg1</i>				↑		
<i>IL</i>					↑	↑
<i>OFC</i>				↑	↑	
<i>AcbS</i>					↑	
<i>VTA</i>				↑		
<i>GDI</i>			↑	↑		↑
<i>CeA</i>						↑
<i>DmS</i>					↑	↑

Nota: As setas representam o aumento da quantidade de  $\Delta$ FosB nas regiões encefálicas de estudo em relação ao grupo controle e/ou em relação aos grupos tratados com etanol e hemisférios.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, K.P. et al. Accumbal dopamine D2 receptor function is associated with individual variability in ethanol behavioral sensitization. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 882-889, 2012.

AGNOSTARAS, S.G.; SCHALLERT, T.; ROBINSON, T.E. Memory process governing amphetamine-induced psychomotor sensitization. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. 703-715, 2002.

ARIAS-CARRIÓN, O. et al. Dopaminergic reward system: a short integrative review. **International archives of medicine**, v. 3, p. 24, 2010.

BAUER, L.O. et al. Autonomic and subjective correlates of the risk for alcoholism. **Journal of Studies in Alcohol and Drugs**, v. 54, p. 577-589, 1993.

BECHARA, A. Decision-making, impulse control loss of willpower to resist drugs: a neurocognitive perspective. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 11, 2005.

BECHARA, A.; DAMASIO, H. Decision-making and addiction (part 1): impaired activation of somatic states in substance dependent individuals when pondering decisions with negative future consequences. **Neuropsychobiology**, v. 40, p.1675-1689, 2002.

BECHARA, A.; VAN DER LINDEN, M. Decision-making and impulsive control after frontal lobe injuries. **Current Opinion in Neurology**, v. 18, p. 734-739, 2005.

BELIN, D. et al. Addiction: failure of control over maladaptive incentive habits. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 4, p. 564–572, 2013.

BONSON, K.R. Neural system and cue-induced cocaine craving. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. 376- 386, 2002.

BRODY, A.L. et al. Brain metabolic changes during cigarette craving. **Archives of General Psychiatry**, v. 59, p. 1162-1172, 2002.

BRODY, A.L. et al. Neural substrates of resisting craving during cigarette cue exposure. **Biological Psychiatry**, v. 62, p. 642-651, 2007.

CAMARINI, R.; PAUTASSI, M.R. Behavioral sensitization to ethanol: Neural basis and factors that influences its acquisition and expression. **Brain Research Bulletin** v. 125, p. 53-78, 2016.

CANNON, D.M. et al. Dopamine type-1 receptor binding in major depressive disorder assessed using positron emission tomography and [(11)C]NNC-112. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 1277–1287, 2009.



CARLINI, E. A. (SUP) II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país. São Paulo: CEBRID, 2006.

CARNEIRO DE OLIVEIRA, P.E. et al. Stress-induced locomotor sensitization to amphetamine in adult, but not in adolescent rats, is associated with increased expression of  $\Delta$ FosB in the nucleus accumbens. **Frontiers In Behavior Neuroscience**, v. 10, p. 173, 2016.

CERQUEIRA, J.J.; ALMEIDA, O.F.; SOUSA, N. The stressed prefrontal cortex. Left? Right! **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, p. 630-638, 2008.

CIARLO, B. T.; MASTROIANNI, F. C. Considerações sobre a influência dos meios de comunicação no consumo de bebidas alcoólicas e sua relação com as políticas de saúde pública. **Revista Uniara**, v.13, n.1, julho 2010.

COELHO, C.C. et al. Temporal and behavioral variability in cannabinoid receptor expression in outbred mice submitted to ethanol-induced locomotor sensitization paradigm. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 37, p. 1516-26, 2014.

COSTA, N.S. et al. Functional lateralization of the medial pré-frontal córtex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? **Neuropharmacology**, v. 108, p. 82-90, 2016.

DAVIDSON, R.J. Cerebral asymmetry emotions and affective style. In: Davidson, R.J.; Hugdahl, K. *Brain Asymmetry*, MIT Press, Cambridge, p. 361-387.

DE PAULI, R. F. et al. Withdrawal induces distinct patterns of FosB/ $\Delta$ FosB expression in outbred Swiss mice classified as susceptible and resistant to ethanol-induced locomotor sensitization. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 117, p. 70-8, 2014.

DECKEL, A. W. et al. Anterior brain dysfunctioning as a risk factor in alcoholic behaviors. **Addiction**, v. 90, p. 1323-1334, 1995.

DI CHIARA, G.; BASSAREO, V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. **Current Opinion of Pharmacology**, v.7, p. 69-76, 2007.

DO, J. et al. Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. **Learning and Memory**, v. 20, p. 21-28, 2012.

DOM, G. et al. Substance use disorders and the orbitofrontal cortex: systematic review of behavioral decision-making and neuroimaging studies. **The British Journal of Psychiatry** v.187 p. 209-220, 2005.

EUSTON, D.R. et al. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision-making. **Neuron**, v. 76, p. 1057-1070, 2012.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. From the ventral to the dorsal striatum: Devolving views of their roles in drug addiction. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 9, p. 1946–1954, 2013.

FETTER, P.; SCHULZE, L.; DOWNAR, J. Cortico-striatal-thalamic loop circuits of the orbitofrontal cortex: promising therapeutic target in psychiatry illness. **Frontiers in System Neuroscience**, v. 11(25), 2017.

FLACK, J.N. et al. Identification of chronic stress-activated regions reveals a potential recruited circuit in rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 36, p. 2547-55, 2012.

FORTES, J. R. A.; CARDO, W. N. Alcoolismo Diagnóstico e Tratamento. Edição de Livros Médicos Ltda. Sarvier. p. 11-25, 1991.

GARCÍA-PEREZ, M.D. et al. Glucocorticoids Regulation of FosB/ $\Delta$ FosB expression induced by chronic opiate exposure in the brain stress system. **PLoS One** v. 7p. 11, 2012.

GIGLIOTTI, A.; BESSA, M. A. Síndrome de dependência do álcool: critérios diagnósticos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, p. 11-13, 2004.

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. **Alcohol Research and Health**, v. 31, n. 3, p. 185–195, 2008.

GLICK, S.D. et al. Neurochemical predisposition to self-administer morphine in rats. **Brain Research**, v. 578, p. 215-220, 1992.

GOLDEN, S.A. et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v.6, n. 8, p. 1183-1191, 2011.

GORDON, H.W. Laterality of brain activation for risk factor of addiction. **Current Drug Abuse Reviews**, v. 9, p. 1-18, 2016.

GRAHAME, N.J. et al. Ethanol locomotor sensitization, but not tolerance correlates with selection for alcohol preference in high- and low-alcohol preferring mice. **Psychopharmacology**, v. 151, p. 252-260, 2000.

HILL, S.Y. et al. Right amygdala volume in adolescent and young adult offspring from families at high risk for developing alcoholism. **Biological Psychiatry**, v. 49, p. 894-905, 2001.

HOPE, B. T. et al. Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. **Neuron**, v. 13, n. 5, p. 1235–1244, 1994.

IKEMOTO, S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. **Brain Research Reviews**, v. 56, p. 27–78, 2007.

JAFFE, J.H. et al. Cocaine-induced craving. **Psychopharmacology**, v. 97, n.1, p. 59-64, 1990.

KALIVAS, P.W., VOLKOW, N.D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, p.1403-1413, 2005.

KAPLAN, B.G. et al. Opiate sensitization induces FosB/ $\Delta$ FosB expression in prefrontal cortical, striatal and amygdala brain regions. **PloS One**, v. 6 (8), e23574, 2011.

KARILA, L. et al. New treatments for cocaine dependence: a focused review. **Internacional Journal of Neurophychopharmacology**, v. 11, p. 425-438, 2008.

KELZ, M.B. et al. Expression of transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. **Nature**, v. 401, p. 272-276, 1999.

KILTS, C.D. et al. The neural correlates of cue-induced craving in cocaine-dependent women. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, p. 233-241, 2004.

KNAPSKA, E. et al. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 1113-1173, 2007.

KOOB, G. F. Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 18–31, 2009.

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

KOVÁCS, K. J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochemistry International**, v. 33, n. 4, p. 287–297, 1998.

LAMBERT, N. M.; MCLEOD, M.; SCHENK, S. Subjective responses to initial experience with cocaine: an exploration of the incentive-sensitization theory of drug abuse. **Addiction**, v. 101, p. 713-725, 2006.

LAPATE, V. A independência das drogas – antes que os problemas cheguem. Hora Zero. São Paulo, Scortecci, 2001.

LASSETER, H.C. et al. Involvement of the lateral orbitofrontal cortex in drug context induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, p. 1370-1381, 2009.

LEE, E. et al. Left brain cortical activity modulates stress effects on social behavior. **Nature Scientific Reports**, v. 5, p.13342, 2015.

LI, J.; SUN, H.; YE, J.H. Electroacupuncture decreases excessive alcohol consumption involving reduction of FosB/ $\Delta$ FosB level in reward-related brain regions. **PloS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40347, 2012.

LOBO, M.K. FosB induction in striatal medium spiny neuron subtypes in response to chronic pharmacological, emotional and optogenetic stimuli. **Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 18381-18395, 2013.

LÜSCHER, C.; MALENKA, R.C. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. **Neuron**, v. 69, n.4, p. 650-663, 2011

MARIN, M.T. et al. Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in the rat nucleus accumbens. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, p.1931-1940, 2009.

MARTIN-SOELCK, C. et al. Lateralization and gender differences in the dopaminergic response to unpredictable reward in the human ventral striatum. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 1706, 1715, 2011.

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

MATTSON, B. J. et al. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 202–212, 2007.

McCLUNG, C.A.  $\Delta$ FosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. **Molecular Brain Research**, v. 132, p.146-154, 2004.

MÉLON, L.C.; BOEHM, S.L. GABAA receptors in the posterior, but not anterior, ventral tegmental area mediate Ro15-4513- induced attenuation of binge-like ethanol consumption in C57BL/6J female mice. **Behavior Brain Research**, v. 20, p. 230-237, 2011.

MOLOCHNIKOV, I.; COHEN, D. Hemispheric differences in the mesostriatal dopaminergic system. **Frontiers in System Neuroscience**, v. 8, p. 110, 2014.

MONEY, K., STANWOOD, G. Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 1-14, 2013.

MOORE, E.M.; BOEHM, S.L. Site specific microinjection of baclofen into the anterior ventral tegmental area reduces binge-like ethanol intake in male C57BL/6J mice. **Behavioral Neuroscience**, v. 123, p. 555-563, 2009.

MORAIS-SILVA, G.; ALVES, C.G.; MARIN, M.T. N-acetylcysteine treatment blocks the development of ethanol-induced behavioral sensitization and related  $\Delta$ FosB alterations. **Neuropharmacology**, v. 110, p. 135-142, 2016.

MOST, D.; FERGUSON, L.; HARRIS, R. A. Molecular basis of alcoholism. In: SULLIVAN, E. V; PFEFFERBAUM, A. (Org.). Handbook of clinical neurology. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, p. 89–111, 2014.

MULLER, D.L.; UNTERWALD, E.M. D1 Dopamine receptors modulate  $\Delta$ FosB induction in rat striatum after intermittent morphine administration. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, p. 148-154, 2005.

MYRICK, H. et al. Differential brain activity in alcoholics and social drinkers to alcohol cues: relationship to craving. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 393-402, 2004.

NAVQI, N.H.; BECHARA, A. The insula and drug addiction: an interoceptive view of pleasure, urges, and decision-making. **Brain Structure and Function**, v. 214, p. 435-450, 2010.

NESTLER, E. Cellular basis of memory addiction. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 431-443, 2013.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; SELF, D. W. FosB: A sustained molecular switch for addiction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11042–11046, 2001.

NESTLER, E.J. Transcriptional mechanisms of addiction: role of  $\Delta$ FosB. **Philosophical Transaction Royal Society B: Biological Science**, v. 363, p. 3245-3255, 2008.

NESTLER, E.J.  $\Delta$ FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 66-72, 2015.

NONA, C.N.; GUIRGUIS, S.; NOBREGA, J.N. Susceptibility to ethanol sensitization is differentially associated with changes in pCREB, trkB and BDNF mRNA expression in the mouse brain. **Behavioural Brain Research**, v. 242, p. 25-33, 2013.

NUTT, D. J.; KING, L. A.; PHILLIPS, L. D. Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. **The Lancet**, v. 376, n. 9752, p. 1558-1565, 2010.

OBERLIN, B.G. et l. Beer self-administration provokes lateralized nucleus accumbens dopamine release in male heavy drinkers. **Psychopharmacology**, v. 232, p. 861-870, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global status report on alcohol and health. Genebra, Suíça, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global status report on alcohol and health. Genebra, Suíça, 2014.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2. ed. California: Academic Press, 2001.

- PEACOCK, A. et al. Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. **Addiction** (Abingdon, England), [s. l.], v. 113, n. 10, p. 1905–1926, 2018.
- PERROTTI, L. I. et al. Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. **Synapse**, v. 62, n. 5, p. 358–69, 2008.
- PERROTTI, L.I. et al. DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of ventral tegmental area after psychostimulants treatment. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 2817-2824, 2005.
- PERROTTI, L.I. et al. Induction of  $\Delta$ FosB in reward-related brain structures after chronic stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 10594-10602, 2004.
- PHILLIPS, T. J.; DICKINSON, S.; BURKHART-KASCH, S. Behavioral sensitization to drug stimulant effects in C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. **Behavioral Neuroscience** v. 10, p. 789-803, 1994.
- POST, R. M.; ROSE, H. Increasing effects of repetitive cocaine administration in the rat. **Nature**, v. 260, p. 731-732, 1976.
- QUADROS, I.M. et al. Differential propensity to ethanol sensitization is not associated with altered binding D1 receptors or dopamine transporter in mouse brain. **Addiction Biology**, v. 7, p.291-299, 2002b
- QUADROS, I.M. et al. Resistance to ethanol sensitization is associated with increased NMDA receptor binding in specific brain areas. **European Journal of Pharmacology** v. 442, p. 55-61, 2002a.
- REN, J. et al. Anatomically defined and functionally distinct dorsal raphe serotonin sub-systems. **Cell**, v. 175, p. 472-487, 2018.
- ROBINSON, A.J. et al. Behavioral and structural responses to chronic require a feed forward loop involving DeltaFosB and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the nucleus accumbens shell. **Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 4295-307, 2013.
- 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 Research Reviews**, v. 396, p. 157-198, 1986.
- ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 363, n. 1507, p. 3137–3146, 2008.
- ROBINSON, T. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Research Reviews**, v. 18, n. 3, p. 247–291, 1993.
- ROBINSON, T. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Research Reviews**, v. 18, n. 3, p. 247–291, 1993.

- ROBINSON, T.TE.; BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Research**, v. 18, n. 3, p. 247-291, 1993.
- RODD, Z.A. et al. Intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of male Wistar rats: evidence for involvement of dopamine neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 1050–1057, 2004.
- RODGERS, L.J. et al. Advantages of having a lateralized brain. **Biology Letters**, v. 271, p. 420-422, 2004.
- RODGERS, L.J. Evolution of hemispheric specialization: advantages and disadvantages. **Brain and Language**, v. 73, p. 236-253, 2000.
- RODGERS, L.J.; ANDREWS, R.J. **Comparative vertebrate lateralization**. 1<sup>a</sup> ed, New York, Cambridge University Press, 2002.
- ROY, A.K. et al. Functional connectivity of the human amygdala using resting state fMRI. **Neuroimage**, v. 45, n. 2, p. 614-626, 2009.
- RUFFLE, J. K. Molecular neurobiology of addiction: what's all the (Δ)FosB about? **The American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v. 40, n. 6, p. 428–437, 2014.
- SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 803-834, 2003.
- SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addiction Biology**, v. 11, p. 2-38, 2006.
- SCHRAMM-SAPYTA, N. L. et al. Are adolescents more vulnerable to drug addiction than adults? Evidence from animals models. **Psychopharmacology (Berl.)** v. 206, p. 1-21, 2009.
- SHELL, L.A. et al. Activation of reward circuitry in human opiate addicts. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 1042-1048, 1999.
- SMITH, K. S. et al. Ventral pallidum roles in reward and motivation. **Behavioural Brain Research**, v. 196, n. 2, p. 155–167, 2009.
- SORREGOTTI, T. et al. Amygdaloid involvement in the defensive behavior of mice exposed to the open elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 338, p. 159-165, 2018.
- SOUZA-FORMIGONI, M.L. et al. Sensitization to ethanol's stimulants effects is associated with region-specific increases in brain D2 receptor binding. **Psychopharmacology (Berl.)** v.146, p. 262-267, 1999.
- STRAKOWSKI, S. M. et al. Enhanced response to repeated d-amphetamine challenge: evidence for behavioral sensitization in humans. **Biological Psychiatry**, v. 40, p. 872-880, 1996.

STRAKOWSKI, S. M. et al. Human response to repeated low-dose d-amphetamine: evidence for behavioral enhancement and tolerance. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, p. 548-554, 2001.

STRAKOWSKI, S. M.; SAX, K. W. Progressive behavioral response to repeated d-amphetamine challenge: further evidence for sensitization in humans. **Biological Psychiatry**, v. 44, p. 1171-1177, 1998.

SUTHERLAND, M.T. et al. Down-regulation of amygdala and insula functional circuits by varenicline and nicotine in abstinent cigarette smokers. **Biological Psychiatry**, v. 74, p. 538-546, 2013.

TARPET, S.F. et al. fMRI BOLD response to alcohol stimuli in alcohol dependent young women. **Addictive Behaviors**, v. 29, p. 33-50, 2004.

TOMER, R. et al. Incentive motivation is associated with striatal dopamine asymmetry. **Biological Psychology**, v. 77, p. 98-101, 2008.

TURGEON, S.M.; POLLACK, A.E.; FINK, J.S. Enhanced CREB phosphorylation and changes in c-Fos and FRA expression in striatum accompany amphetamine sensitization. **Brain Research**, v. 749, p. 120-126, 1997.

UJIKE, H.; SATO, M. Clinical features of sensitization to methamphetamine observed in patients with methamphetamine dependence and psychosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1025, p. 279-287, 2004.

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, n. 2-3, p. 99-120, 2000.

VANGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. **British Journal of Pharmacology**, v.154, p.299-315, 2008.

VERNALEKEN, I. et al. Asymmetry in dopamine D(2/3) receptors of caudate nucleus is lost with age. **Neuroimage**, v. 34, p. 870-878, 2007.

VIALOU, V. et al. Prefrontal cortical circuit for depression and anxiety-like behaviors mediated by cholecystokinin: role of  $\Delta$ FosB. **Journal of Neuroscience**, v. 34, p. 3878-3887, 2014.

VIALOU, V. et al.  $\Delta$ FosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 745-752, 2010.

VOLKOW, N.D. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. **Neuropharmacology**, v. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 3-8, 2009.

WINSTANLEY, C.A. et al.  $\Delta$ FosB induction in orbitofrontal cortex mediates tolerance to cocaine-induced cognitive dysfunction. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p.10497-10507, 2007.



WINSTANLEY, C.A. et al. Increased impulsivity during withdrawal from cocaine self-administration: role for  $\Delta$ FosB in the orbitofrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 19, p. 435-444, 2009.

WIZE, R. A., BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological Review**, v. 94, p. 462-469, 1987.

YUAN, P., RAZ, N. Prefrontal cortex and executive functions in healthy adults: a meta-analysis of structural neuroimaging studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 42, p. 180-192, 2014.

## 8 ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araraquara



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Relação entre a quantidade da proteína  $\Delta$ FosB em várias áreas encefálicas e o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol em camundongos heterogênicos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 25/2018, sob a responsabilidade da Pesquisadora Celina Ferrari Laverde, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião de 24 de outubro de 2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro de 2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Suíço
Nº de animais	69
Idade/Peso	7 semanas 25 a 30g
Sexo	macho
P Origem	Biotério Central da Universidade Estadual Paulista / UNESP, Campus UNESP Botucatu - SP.

Araraquara, 24 de outubro de 2018.

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA  
Coordenadora da CEUA