



**Programa de pós-graduação em  
Ciências Fisiológicas  
Convênio UFSCar - UNESP**



**SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL À COCAÍNA E  
NEUROADAPTAÇÕES NA VIA MESOCORTICOLÍMBICA:  
INTERAÇÃO COM ONTOGÊNESE, ESTRESSE E AMBIENTE**

**Marcelo Tadeu Marin**

**SÃO CARLOS**

**2009**



**Programa de pós-graduação em  
Ciências Fisiológicas  
Convênio UFSCar - UNESP**



**SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL À COCAÍNA E  
NEUROADAPTAÇÕES NA VIA MESOCORTICOLÍMBICA:  
INTERAÇÃO COM ONTOGÊNESE, ESTRESSE E AMBIENTE**

**Marcelo Tadeu Marin**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Convênio entre a Universidade Federal de São Carlos e a Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

**Orientadora: Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta**

**SÃO CARLOS**

**2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M337sc

Marin, Marcelo Tadeu.

Sensibilização comportamental à cocaína e neuroadaptações na via mesocorticolímbica : interação com ontogênese, estresse e ambiente / Marcelo Tadeu Marin. -- São Carlos : UFSCar, 2009.  
109 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.


1. Sensibilização comportamental. 2. Cocaína. 3. Adolescência. 4. Estresse. 5. Neuroplasticidade. I. Título.

CDD: 612.82 (20<sup>a</sup>)

Universidade Federal de São Carlos  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Convênio UFSCar/UNESP-Araraquara

Defesa de Tese de Marcelo Tadeu Marin

Profª. Drª. Cleopatra da Silva Planeta .....


Prof. Dr. Moacyr Luiz Aizenstein.....


Profª. Drª. Marcia Gallacci .....



Prof. Dr. Roberto DeLucia .....



Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho.....



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço aos meus pais, **Pascoal Marin e Geraci Gonçalves** pelo apoio durante todos esses anos em que tenho me dedicado aos estudos.

À minha irmã **Marinês**, meu cunhado **Donizete** e minha sobrinha **Cláudia Gabriela**. Três pessoas muito importantes na manutenção dos laços familiares.

Nesses anos de doutorado, uma figura muito importante também foi esposa **Nilva**. Companheira em incontáveis momentos felizes que aconteceram nesses últimos anos. Foi também um grande apoio em momentos importantes, como durante o estágio no exterior ou no período de escrita desse trabalho.

Agradeço à minha orientadora **Cleopatra da Silva Planeta**.

Pessoa que, além de amiga, completa plenamente para mim o significado da palavra orientadora. Dedicada, ela começou a me ensinar farmacologia desde meu segundo mês de faculdade. Ainda calouro, ia cursar Farmacologia somente dois anos mais tarde. No entanto, a “Cleo” me aceitou como estagiário e começou a discutir capítulos de Farmacologia semanalmente comigo. Seu jeito sereno de ensinar me despertou grande interesse por essa disciplina e depois pela pesquisa científica. Desde então, já se passaram mais de 10 anos e ainda tenho pretensões de continuar aprendendo com minha orientadora. Pretendo um dia ser um profissional competente e de sucesso como ela.

Cleo, obrigado pela confiança que depositou em mim todos esses anos.

Aos amigos de laboratório: **Rodrigo** (Vampeta), **Paulão**, **Egberto**, **Roberta**, **Ana Paula**, **Tarciso**, **Alianda**, **Joyce**, **Karina**, **Vanessa**, **Yara**, **Paulo José**, **Eduardo** (Fartura), **Leonardo** (Gaucho), **Lucília**, **Cleslei**, **Gabriela**, **Carol**, **Lyane**, **Andréia**, **Ana Cláudia**, **Bruna**, **Thiago** e vários outros que passaram momentos importantes nesse meu trajeto na tentativa de ser Doutor! Todos contribuíram de algum modo no meu crescimento e sempre serão lembrados.

Um agradecimento especial ao **Fábio** (Quasy), amigo incondicional e parceiro nos desafios que tivemos de enfrentar desde a montagem de projetos até o estágio no exterior.

Aos professores do laboratório de Farmacologia: **Ricardo L. Nunes de Souza**, **Francisco Fracasso** e **Maria do Carmo Longo**, pelo apoio e incentivo sempre presentes.

À **Elizabete** e **Rosana**, amigas e técnicas de exemplar dedicação no laboratório, cujo auxílio contribuiu também para o desenvolvimento desta tese.

À eficiente **Tirene**, sempre prestativa e dedicada. Obrigado também pela amizade.

Agradeço à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP – Araraquara**, em especial ao Laboratório de Farmacologia, pela infra-estrutura necessária ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos professores **Salvador**, **Rosângela** e **Georgino**, do Laboratório de Toxicologia, e também ao professor **Sandro**, do laboratório de Biologia Molecular, por autorizarem o uso de seus laboratórios quando foi necessário.

Agradeço ao **National Institute on Drug Abuse** (NIDA)/NIH, em Baltimore-MD, EUA. Local onde realizei estágio de doutorado e proporcionou infra-estrutura para execução de parte desta tese.

Ao meu co-orientador durante o estágio no exterior, **Bruce T. Hope**. Obrigado pelas orientações, amizade e auxílio numa terra distante.

Aos colegas de laboratório no exterior: **Eisuke Koya, Alexander Berkow, Danielle Guess** e **Sunila Nair**. Agradeço pela amizade.

Por fim, agradeço ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas**, pelo auxílio e oportunidade de doutoramento.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro imprescindível para minha dedicação integral à pós-graduação.

À **CAPES**, pela bolsa de estágio de doutorado no exterior.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIações .....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>CAPÍTULO 1 - Cocaína, dependência e sensibilização comportamental .....</b>	<b>1</b>
1. Histórico e epidemiologia do uso de cocaína .....	2
2. Efeitos farmacológicos da cocaína .....	3
3. Aspectos gerais da dependência.....	4
4. Sensibilização comportamental .....	8
<b>CAPÍTULO 2 - Exposição à cocaína e ao estresse na adolescência: sensibilização comportamental duradoura e neuroadaptações.....</b>	<b>14</b>
1. Introdução.....	15
1.1. Adolescência e vulnerabilidade às substâncias de abuso.....	15
1.2. Estresse e dependência.....	18
1.3. Alterações da neurotransmissão glutamatérgica e da enzima tirosina hidroxilase (TH) relacionadas aos efeitos da cocaína.....	20

2. Objetivos.....	24
3. Materiais e métodos .....	24
3.1. Parecer ético .....	24
3.2. Animais .....	25
3.3. Avaliação comportamental .....	25
3.4. Estresse .....	26
3.5. Dissecção das áreas encefálicas .....	27
3.6. Western Blotting .....	29
4. Delineamento experimental .....	32
4.1. Experimento 1 - Sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de cocaína na adolescência .....	32
4.2. Experimento 2 - Sensibilização comportamental induzida pela exposição repetida ao estresse na adolescência .....	33
4.3. Experimento 3 - Comparação entre animais adolescentes e adultos da sensibilização comportamental duradoura induzida pela exposição repetida ao estresse.....	34
5. Análise estatística.....	35
6. Resultados.....	35
6.1. Experimento 1 – Sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de cocaína na adolescência .....	35
6.1.1. Análise comportamental.....	36
6.1.1.1. Três dias após o tratamento, DPN 37 .....	36

6.1.1.2. Trinta dias após o tratamento, DPN 64 .....	36
6.1.1.3. Sessenta dias após o tratamento, DPN 94 .....	36
6.1.2. Análise das proteínas GluR1, NR1 e TH .....	37
6.2. Experimento 2 - Sensibilização comportamental induzida pela exposição repetida ao estresse na adolescência .....	41
6.2.1. Análise comportamental .....	41
6.2.1.1. Três dias após o tratamento, DPN 37 .....	41
6.2.1.2. Trinta dias após o tratamento, DPN 64 .....	41
6.2.1.3. Sessenta dias após o tratamento, DPN 94 .....	42
6.2.2. Análise das proteínas GluR1, NR1 e TH .....	42
6.3. Experimento 3 - Comparação entre animais adolescentes e adultos da sensibilização comportamental duradoura induzida pela exposição repetida ao estresse .....	47
6.3.1. Animais expostos ao estresse na adolescência .....	47
6.3.2. Animais expostos ao estresse na idade adulta .....	47
7. Discussão .....	49
7.1. Sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de cocaína na adolescência .....	49
7.2. Sensibilização comportamental induzida pela exposição repetida ao estresse na adolescência .....	55
8. Conclusão .....	58

<b>CAPÍTULO 3 – Influência do ambiente na sensibilização comportamental à cocaína e neuroadaptações relacionadas à CREB .....</b>	<b>60</b>
1. Introdução.....	61
1.1. Influência do ambiente na sensibilização comportamental .....	61
1.2. Sensibilização comportamental e neuroadaptações relacionadas à CREB .....	62
2. Objetivos.....	64
3. Materiais e métodos .....	65
3.1. Parecer ético .....	65
3.2. Animais .....	65
3.3. Ambientes do pré-tratamento.....	66
3.4. Pré-tratamento e teste da atividade locomotora.....	67
3.5. Imunocitoquímica e quantificação de células positivas para p-CREB e p-ERK.....	68
3.6. Dissecção do NAc e quantificação das proteínas por Western Blotting.....	69
4. Delineamento experimental .....	71
4.1. Experimento 1 -Avaliação comportamental da sensibilização à cocaína	71
4.2. Experimento 2 -Análise de p-CREB e p-ERK por imunocitoquímica.....	72
4.3. Experimento 3 -Análise da fosforilação de CREB e marcadores da atividade de ERK, PKA, CaMK II e CaMK IV .....	73
5. Análise estatística.....	73

6. Resultados.....	74
6.1. Avaliação do desenvolvimento da sensibilização comportamental à cocaína.....	74
6.2. Experimento 1 - Avaliação comportamental da sensibilização à cocaína	75
6.3. Experimento 2 - Análise de p-CREB e p-ERK por imunocitoquímica.....	78
6.3.1. p-CREB .....	78
6.3.2. p-ERK.....	79
6.4. Experimento 3 – Análise da fosforilação de CREB e marcadores da atividade de ERK, PKA, CaMK II e CaMK IV .....	81
6.4.1. Fosforilação de CREB.....	81
6.4.2. Fosforilação de CaMK IV .....	82
6.4.3. Fosforilação de ERK .....	82
6.4.4. Fosforilação de CaMK II.....	83
6.4.5. Fosforilação da serina 845 de GluR1 .....	84
7. Discussão .....	86
7.1. Desenvolvimento e expressão da sensibilização comportamental à cocaína dependente do ambiente .....	86
7.2. Alteração do número de neurônios imunorreativos a p-CREB e p-ERK por imunohistoquímica .....	87
7.3. Alteração da fosforilação de CREB e marcadores da atividade de ERK, PKA, CaMK II e CaMK IV .....	90
8. Conclusão.....	94

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>96</b>
---	-----------

<b>ANEXOS .....</b>	<b>110</b>
---------------------	------------

- Análise comportamental da sensibilização dependente do ambiente e da fosforilação de proteínas por Western Blotting após administração de dose menor de cocaína (10 mg/kg)
- Artigo publicado com parte dos resultados

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Caixa para medida da atividade locomotora .....	26
<b>Quadro 1:</b> Procedimento de estresse variado .....	27
<b>Figura 2:</b> Matriz de acrílico e agulha usadas para dissecação de áreas do encéfalo de ratos .....	28
<b>Figura 3:</b> Imagem das bandas das proteínas GluR1, NR1 e TH .....	31
<b>Figura 4:</b> Sensibilização comportamental induzida pela administração de cocaína na adolescência .....	38
<b>Figura 5:</b> Quantificação das proteínas GluR1, NR1 e TH no NAc após administração repetida de cocaína na adolescência .....	39
<b>Figura 6:</b> Quantificação das proteínas GluR1 e NR1 no CPFm após administração repetida de cocaína na adolescência .....	40
<b>Figura 7:</b> Sensibilização comportamental induzida pela exposição ao estresse na adolescência .....	44
<b>Figura 8:</b> Quantificação das proteínas GluR1, NR1 e TH no NAc após exposição ao estresse na adolescência .....	45
<b>Figura 9:</b> Quantificação das proteínas GluR1 e NR1 no CPFm após exposição ao estresse na adolescência .....	46
<b>Figura 10:</b> Comparação entre animais adolescentes e adultos da sensibilização comportamental duradoura induzida pela exposição ao estresse	48
<b>Figura 11:</b> Ambientes usados no pré-tratamento com cocaína .....	66

<b>Figura 12:</b> Representação esquemática das regiões encefálicas quantificadas e das imagens de fluorescência .....	71
<b>Figura 13:</b> Desenvolvimento da sensibilização comportamental nos dois ambientes do pré-tratamento .....	76
<b>Figura 14:</b> Expressão da sensibilização comportamental à cocaína dependente do ambiente .....	77
<b>Figura 15:</b> Quantificação por imunocitoquímica de p-CREB e p-ERK .....	80
<b>Figura 16:</b> Quantificação por Western Blotting da fosforilação de CREB e enzimas cinases no NAc .....	85



## LISTA DE ABREVIações

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato

AMPc: monofosfato cíclico de adenosina

ATV: área tegmental ventral

CPFm: córtex pré-frontal medial

CRE: elemento de resposta ao AMPc

CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc

EPM: erro padrão da média

GluR1: subunidade do tipo 1 do receptor glutamatérgico AMPA

NAc: núcleo acumbens

NMDA: n-metil-d-aspartato

NR1: subunidade do tipo 1 do receptor glutamatérgico NMDA

TH: tirosina hidroxilase

$\Delta$  9-THC: tetrahidrocanabinol

## RESUMO

Investigamos a influência da ontogênese, do estresse e do ambiente onde a substância psicoativa é administrada sobre a sensibilização comportamental à cocaína e o desenvolvimento de neuroadaptações. Para tanto, esse trabalho de tese foi dividido em duas partes. Na primeira, avaliamos os efeitos da administração repetida à cocaína ou exposição ao estresse em ratos adolescentes na sensibilização comportamental à cocaína e neuroadaptações dos receptores de glutamato e da enzima tirosina hidroxilase. Essas alterações foram avaliadas durante a adolescência e também acompanhadas até a idade adulta. Demonstramos nesses experimentos que a administração repetida de cocaína durante a adolescência provoca sensibilização comportamental que perdura até a idade adulta e causa aumento da proteína GluR1 dos receptores glutamatérgicos no córtex pré-frontal medial. A exposição ao estresse provoca sensibilização comportamental em adolescentes, mas esse efeito não permanece até a idade adulta. Na segunda parte da tese, avaliamos a influência do pareamento do ambiente onde a cocaína é administrada sobre a expressão da sensibilização comportamental a essa substância e alterações de CREB e enzimas cinases que ativam CREB em ratos adultos. Demonstramos que o pareamento do ambiente com as administrações de cocaína facilita a expressão da sensibilização comportamental. A sensibilização comportamental dependente do ambiente está relacionada ao aumento do número de neurônios com ativação de CREB no núcleo acumbens dos animais. Portanto, nosso estudo pretende contribuir para o entendimento de alterações relacionadas à dependência em animais adolescentes, seus efeitos duradouros e a influência do ambiente onde a substância é administrada.

**Palavras-chave:** sensibilização comportamental, cocaína, adolescência, estresse, neuroadaptações

## ABSTRACT

We investigated the interaction between ontogeny, stress and environment where the drug is administered on the behavioral sensitization to cocaine and related neuroadaptations. This study was divided in two parts. In the first one we evaluated the behavioral sensitization to cocaine and alterations of glutamate receptors and tyrosine hydroxylase enzyme following repeated cocaine administrations or stress exposure on adolescent rats. These alterations were evaluated from adolescence to adulthood. The results showed that cocaine administration during adolescence produced long-term behavioral sensitization to cocaine until adulthood and increased of GluR1 glutamate receptor subunit in the medial prefrontal cortex. The stress-induced behavioral sensitization was evident during adolescence but did not reach adulthood. In the second part, we evaluated the environmental modulation of behavioral sensitization to cocaine and alterations of CREB and upstream kinases activation in adult rats. The results showed that the expression of cocaine-induced behavioral sensitization was specific to the environment paired with previous cocaine administration. Moreover, the number of neurons with CREB activation in the nucleus accumbens was increased in sensitized animals and specific to the paired environment. Thus, our results add new findings on addiction related alterations in adolescent animals, its long-term effects and the environmental modulation of cocaine behavioral and neuronal sensitization.

**Keywords:** behavioral sensitization, cocaine, adolescence, stress, neuroadaptations

**CAPÍTULO 1**

**Cocaína, dependência e sensibilização comportamental**

## 1. Histórico e epidemiologia do uso de cocaína

A cocaína (benzoilmetilecgonina) é um alcalóide extraído da planta *Erythroxylon coca*. Seu uso tem raízes nas civilizações pré-colombianas dos Andes, que há mais de 4.500 anos já mascavam folhas de coca. Esse uso da planta não causava danos muito notáveis à saúde do usuário devido à pequena quantidade de cocaína absorvida nessa forma de consumo (FERREIRA; MARTINI, 2001).

No século XIX as folhas de coca chegaram à Europa, sendo que em 1863, Ângelo Mariani inventou uma mistura de folhas de coca com vinho, denominando-a de “Vin Mariani”. Em 1886, John Styth Pemberton criou uma bebida sem álcool, mas com cocaína, denominando-a de Coca-Cola. A cocaína foi retirada da composição da Coca-Cola somente em 1906. Freud contribuiu de maneira decisiva para a divulgação da nova substância, quando, em 1884, publicou um livro chamado “Uber coca” (sobre a cocaína), no qual defendeu o uso terapêutico da cocaína como estimulante, afrodisíaco, anestésico local e para alívio de outras inúmeras enfermidades. No entanto, episódios de toxicidade, tolerância, dependência e, até mesmo, morte pelo uso de produtos contendo cocaína passaram a ser relatados em revistas médicas no início dos anos 20. Os problemas tornaram-se ainda mais freqüentes e graves quando, na mesma época, surgiram comercialmente seringas hipodérmicas, possibilitando a injeção endovenosa da substância (KARCH, 1999; FERREIRA; MARTINI, 2001).

Atualmente a dependência à cocaína é um problema significativo de saúde pública em todo o mundo, levando a danos à saúde física e mental além de complicações legais e sócio-econômicas (KARILA et al., 2008).

Dados do último relatório mundial sobre drogas (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2008) apontam que uma porção significativa da população desenvolve problemas relacionados ao abuso de substâncias psicoativas. Dentre a população mundial entre 15 e 64 anos, cerca de 4,8% (208 milhões) consumiram substâncias psicoativas ilícitas pelo menos uma vez no ano de 2007. Vinte e seis milhões dessas pessoas desenvolveram problemas de saúde relacionados ao uso dessas substâncias.

O consumo mundial de cocaína alcançou em torno de 16 milhões de pessoas em 2007, sendo que 64% destes usuários estão no continente americano. Estimativas apontam que os principais países produtores (Colômbia, Peru e Bolívia) fabricaram cerca de 990 toneladas de cocaína no ano de 2007 (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2008).

No Brasil, O II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas (CARLINI, 2006) revelou que 22,8% da população (10,75 milhões) usou pelo menos por uma vez na vida substâncias psicoativas de abuso (exceto álcool e tabaco). Vale ressaltar que o uso na vida de cocaína na forma de cloridrato de cocaína atingiu 2,9% da população e o uso da substância na forma de base livre (crack e merla) foi de 0,9%. Isso indica que cerca de 1,96 milhões de pessoas já utilizaram cocaína.

## **2. Efeitos farmacológicos da cocaína**

A cocaína é classificada como um agente dopaminérgico de ação indireta. Essa substância liga-se ao transportador de dopamina, bloqueando a captação desse neurotransmissor para dentro do terminal pré-sináptico

(O'BRIEN, 2006). O bloqueio desse transportador é altamente correlacionado com os efeitos subjetivos da cocaína em humanos (VOLKOW et al., 1997).

A inibição da captação da dopamina induzida pela cocaína resulta no aumento da concentração do neurotransmissor na fenda sináptica. A dopamina acumulada na fenda sináptica interage com seus receptores, iniciando uma seqüência de eventos que modifica a atividade neuronal momentaneamente e também modula alterações plásticas de longo prazo no neurônio (NICOLA et al., 2000). Outros neurotransmissores, como a noradrenalina, serotonina e glutamato também estão envolvidos direta ou indiretamente nos efeitos da cocaína, sendo que o conjunto das alterações momentâneas e duradouras altera a expressão do comportamento (NICOLA et al., 2000; O'DONNELL, 2003).

O principal dano à saúde causado pelo consumo de cocaína é seu potencial de desenvolver dependência. Além disso, outros riscos associados são a indução de arritmias cardíacas, isquemia miocárdica, miocardite, dissecação aórtica, vasoconstrição cerebral e convulsões (O'BRIEN, 2006).

### **3. Aspectos gerais da dependência**

Antes do século XIX, a dependência de substâncias psicoativas era considerada uma deficiência de caráter. Os dependentes eram encarados como pessoas que consumiam a substância psicoativa somente porque gostavam, escolhiam assim serem “indecentes” ou “pecaminosos” por serem de baixa moral (GARCIA-MIJARES; SILVA, 2006)

Atualmente a dependência de substâncias psicoativas é conceituada como um conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que indicam que o indivíduo perdeu o controle do uso da substância

e continua a usá-la apesar de reconhecer as conseqüências adversas deste uso (DACKIS; O'BRIEN, 2001; KARILA et al., 2008). Uma vez dependente, o indivíduo pode apresentar desejo intenso e grande risco de recaída ao consumo da substância mesmo após anos de abstinência (AGUILAR et al., 2009).

O reconhecimento da dependência como uma doença é baseado em dados científicos sobre o mecanismo neuronal, resposta a tratamento, hereditariedade e decurso clínico progressivo (DACKIS; O'BRIEN, 2005). Esse conceito como doença é importante na elaboração de políticas públicas para tratamento do indivíduo dependente e da redução dos danos à sociedade causados pelo consumo abusivo dessas substâncias.

Inicialmente, a pesquisa sobre dependência era focada na teoria do reforço negativo. Essa teoria propunha que o uso da substância psicoativa se mantém para aliviar a síndrome de abstinência, sendo esta caracterizada pelos sintomas desagradáveis desencadeados pela descontinuação do uso da substância (WISE, 1987; ROBINSON; BERRIDGE, 1993). No entanto, essa teoria provou-se pouco efetiva após demonstrações de fatos como: a) a auto-administração das substâncias psicoativas acontece também na ausência da síndrome de abstinência; b) períodos máximos de auto-administração das substâncias não coincidem com os sintomas da síndrome de abstinência; c) muitos fármacos usados clinicamente produzem síndrome de abstinência, mas não levam à dependência; d) o alívio da síndrome de abstinência é pouco efetivo no tratamento da dependência e e) há uma grande tendência à recaída mesmo após períodos longos do fim da síndrome de abstinência (ROBINSON; BERRIDGE, 1993). Essa teoria do reforço negativo baseava-se principalmente



em resultados sobre opióides, que causam intensa síndrome de abstinência, e devido às suas limitações, foi proposta a teoria do reforço positivo.

A teoria do reforço positivo propõe que o uso da substância seria mantido pelo efeito que ela produz (euforia, bem-estar), e não pelo alívio de um estado desagradável (WISE, 1987). Ela baseia-se no fato de que a maioria das substâncias psicoativas auto-administradas por humanos também agem como reforçadores positivos para animais de laboratório. Substâncias como cocaína (AHMED; KOOB, 1999; KNACKSTEDT; KALIVAS, 2007), anfetamina (SHAHBAZI et al., 2008), morfina (MIERZEJEWSKI et al., 2003), nicotina (SHRAM; LÊ, 2008), etanol (CICOCCIOPO et al., 2002) e canabinóides (JUSTINOVA et al., 2005) induzem comportamentos de auto-administração em caixas de Skinner e preferência condicionada por lugar pelos animais. Entretanto, essa teoria também possui limitações, tais como: a) não há correlação clara entre a capacidade de a substância produzir euforia e seu potencial de induzir dependência; b) em indivíduos dependentes, as conseqüências aversivas causadas pelo consumo repetido da substância freqüentemente sobrepõem o prazer de sua administração; c) essa teoria não explica de forma adequada o intenso desejo e recaída induzida pela exposição às dicas ambientais relacionadas ao uso da substância; e d) a auto-administração de substâncias psicoativas em dependentes pode ocorrer mesmo na ausência de efeito prazeroso (ROBINSON; BERRIDGE, 1993).

Uma grande contribuição da teoria do reforço positivo foi o esclarecimento de que apesar das diversas substâncias psicoativas que causam dependência possuírem estruturas químicas distintas, agirem em receptores diferentes e produzirem efeitos diversos, todas elas tem em comum a

capacidade de atuarem em um substrato neurobiológico comum - o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (WISE, 1987). A partir dessas observações, o sistema mesocorticolímbico tornou-se o foco das pesquisas sobre as bases neurais da farmacodependência. Os principais componentes dessa via de recompensa são a área tegmental ventral (ATV, sítio de corpos celulares de neurônios dopaminérgicos) e suas projeções para regiões do sistema límbico, incluindo principalmente o núcleo acumbens (NAc), o tubérculo olfativo, a amígdala e o córtex frontal e límbico (KOOB; Le MOAL, 2001; NESTLER, 2001).

Muitas evidências comprovam o envolvimento do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico no efeito reforçador das substâncias psicoativas de abuso (DiCHIARA; BASSAREO, 2007). Assim, estudos de microdiálise demonstraram que a administração de cocaína, anfetamina, morfina, etanol,  $\Delta$ -9-THC e nicotina aumentam a liberação de dopamina no NAc (Di CHIARA; IMPERATO, 1988; KUCZENSKI et al., 1991; TANDA et al., 2000; SHIM et al., 2001; LÖF et al., 2007).

O efeito reforçador positivo, ou seja, a sensação de prazer causada pela substância psicoativa pode explicar o seu uso ocasional. Entretanto, o desenvolvimento da dependência parece ser um fenômeno mais complexo, que resulta da interação entre a droga, o indivíduo e o ambiente. Além disso, essa teoria não explica as principais características da dependência como ela é conceituada atualmente: a perda do controle do uso da substância e seu uso a despeito das conseqüências adversas (O'BRIEN, 2006).

A fim de preencher essa lacuna deixada pela teoria do reforço positivo, Robinson e Berridge (1993, 2003) propuseram que o uso compulsivo das substâncias psicoativas resultaria de processos neuroadaptativos causados

pelo uso repetido das mesmas. As substâncias psicoativas que causam dependência aumentariam a sensibilidade de vias neurais que controlam o incentivo motivacional e a atenção a estímulos salientes. Isso tornaria os estímulos (uso da substância e comportamentos relacionados) altamente salientes, atrativos e desejados. Com o uso repetido, a própria substância e os estímulos associados ao seu consumo tornam-se progressivamente mais atrativos e se desenvolve um desejo compulsivo (“fissura”) pela substância. O desejo compulsivo seria responsável, então, por controlar o comportamento do indivíduo e provocar a perda do controle do uso da substância psicoativa e recaídas freqüentes.

Portanto, essa teoria de Robinson e Berridge propõe que a dependência decorre de neuroadaptações que aumentam o incentivo motivacional para obter a substância. Essas neuroadaptações ocorrem principalmente na via dopaminérgica mesocorticolímbica e podem ser avaliadas por adaptações neuroquímicas nessa via ou por meio da sensibilização comportamental.

#### **4. Sensibilização comportamental**

Primeiramente, foi demonstrado que as substâncias psicoativas que causam dependência provocam ativação psicomotora quando administradas agudamente em animais. Assim, observa-se aumento da atividade exploratória, que pode ser avaliada facilmente pela atividade locomotora do animal. Em doses elevadas, essa ativação psicomotora também pode ser mensurada por

pequenos movimentos repetitivos (estereotipados) do animal (WISE; BOZARTH, 1987).

A ativação psicomotora causada pelas substâncias psicoativas é mediada por vias neurais que se sobrepõem, pelo menos em parte, com as vias que medeiam o efeito reforçador dessas substâncias, a via dopaminérgica mesocorticolímbica. Assim, foi proposto que alterações do efeito reforçador das substâncias psicoativas podem ser avaliadas pelas alterações do comportamento motor (WISE; BOZARTH, 1987).

É conhecido que os efeitos de substâncias psicoativas se modificam no decorrer do uso prolongado. No caso das substâncias que comprovadamente causam dependência, essas alterações expressam-se tanto como redução quanto como aumento de efeitos independentes.

A redução de determinado efeito de uma substância após a sua administração repetida é chamada de tolerância. Essa alteração resulta de adaptações de vias neurais que medeiam efeitos específicos da substância psicoativa e são responsáveis geralmente pela indução de sinais da síndrome de abstinência na sua retirada (BOZARTH; WISE, 1984; O'BRIEN, 2006).

Por outro lado, o aumento do efeito de uma substância em decorrência de sua administração repetida é chamado sensibilização, ou tolerância inversa. De modo peculiar, uma característica comum das substâncias que produzem dependência é o aumento gradual e progressivo da atividade locomotora observado após sua administração repetida, sendo esse fenômeno denominado sensibilização comportamental (POST; ROSE, 1976; ROBINSON; BECKER, 1986).

A sensibilização comportamental foi descrita para a cocaína (MISERENDINO; NESTLER, 1995; PLANETA; MARIN, 2002; HOPE et al., 2006), anfetamina (KALIVAS; WEBER, 1988; FRAIOLI et al., 1999), fencanfamina (PLANETA et al., 1995), morfina (KALIVAS; DUFFY, 1987), etanol (PHILLIPS et al., 1997), nicotina (DOMINO, 2001; CRUZ et al., 2005) e  $\Delta$ -9-THC (CADONI et al., 2001).

A sensibilização comportamental resulta de adaptações neuroquímicas na via mesocorticolímbica. Classicamente, tem sido demonstrado que a sensibilização da atividade locomotora está relacionada ao aumento da liberação de dopamina no NAc em resposta às substâncias psicoativas (KOLTA et al., 1985; KALIVAS; DUFFY, 1993; WOLF et al., 1993; ZAPATA et al., 2003). A ativação dos receptores dopaminérgicos parece estar envolvida no processo de sensibilização, pois a administração de antagonistas de receptores dopaminérgicos inibe o desenvolvimento da sensibilização comportamental (VEZINA; STEWART, 1989; VEZINA, 1996).

Mais recentemente, a sensibilização comportamental e alterações da auto-administração de psicostimulantes têm sido relacionadas a alterações na liberação de glutamato (PIERCE et al., 1996) e da expressão dos seus receptores (CARLEZON; NESTLER, 2002; BOUDREAU; WOLF, 2005) na via mesocorticolímbica. Além disso, alterações intracelulares, como por exemplo, na quantidade de enzimas, fatores de transcrição e outras proteínas, nos neurônios do NAc e áreas relacionadas a esse núcleo podem resultar na sensibilização da ativação psicomotora induzida pelas substâncias que causam dependência (NESTLER, 2001). Esses tópicos referentes à neurotransmissão

glutamatérgica e alterações intracelulares serão melhor discutidos nos capítulos 2 e 3, respectivamente.

A sensibilização do efeito estimulante psicomotor da cocaína e anfetamina pode ser duradoura e persistir por meses ou anos após o tratamento repetido com essas substâncias em ratos (PAULSON et al., 1991; HOPE et al., 2006). Existem evidências em animais de laboratório que a sensibilização comportamental esteja associada à reinstalação da auto-administração operante (De VRIES et al., 1998) e da preferência condicionada por lugar (LU et al., 2002) induzida por substâncias que causam dependência após longos períodos da administração das mesmas.

Outras alterações comportamentais associadas à dependência, como maior facilidade para aquisição da auto-administração e execução de maior trabalho para auto-administrar as substâncias em esquemas de razão progressiva tem sido demonstradas em animais após a administração repetida de cocaína ou anfetamina (LORRAIN et al., 2000; VEZINA et al., 2002). Essas alterações são devidas ao aumento da sensibilidade de neurônios da via dopaminérgica mesocorticolímbica induzido pela administração repetida dos psicostimulantes (VEZINA, 2004).

A indução da sensibilização comportamental depende do procedimento experimental de administração da substância psicoativa. A via de administração deve promover início rápido do efeito, e as administrações devem ser intermitentes. Geralmente as vias de administração endovenosa ou intraperitoneal são as mais utilizadas (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). Nesse sentido, tem sido demonstrado que a administração intermitente e intraperitoneal de cocaína causa sensibilização da atividade locomotora,

enquanto a administração contínua por meio de minibombas subcutâneas pelo mesmo período de tempo causa tolerância da atividade locomotora (HOPE et al., 2005). Infusões endovenosas rápidas (3 a 16 segundos de infusão) de cocaína produzem também maior sensibilização comportamental do que infusões lentas (maiores que 25 segundos) (SAMAH et al., 2002). A injeção de altas doses de psicostimulantes como cocaína e anfetamina também facilita o desenvolvimento de uma maior sensibilização psicomotora (PAULSON et al., 1991; TODTENKOPF; CARLEZON, 2006).

Além dos fatores acima, o ambiente no qual a substância psicoativa é administrada desempenha importante função na modulação da expressão da sensibilização comportamental (BROWMAN et al., 1998; CROMBAG et al., 2001). A influência do ambiente na sensibilização da atividade locomotora e neuroadaptações relacionadas à cocaína será o foco principal do capítulo 3.

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).

Outro estudo clínico mostrou que ocorre diminuição da 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 se auto-administrarem a substância psicoativa mesmo sem a sensação de prazer nessa ação. A procura e consumo das substâncias ocorreriam então devido ao intenso incentivo motivacional para as substâncias.

Dados recentes de Lambert et al. (2006) reforçam a argumentação anterior. Esses autores observaram que, quando experimentavam da substância, pessoas dependentes ou usuários pesados de cocaína relatavam maior desejo de consumir mais da substância se comparados aos indivíduos não dependentes ou usuários ocasionais. Além disso, indivíduos fumantes e que foram pré-expostos terapeuticamente a psicostimulantes descreviam menor prazer ao consumir pela primeira vez cocaína, mas relatavam maior desejo de consumir mais da substância do que indivíduos não pré-expostos aos psicostimulantes e tabaco.

Os dados em animais de laboratório e em humanos corroboram, portanto, a teoria da sensibilização do incentivo motivacional para explicar a dependência. Desse modo, o seu estudo por meio da sensibilização da atividade locomotora tem sido alvo de inúmeras pesquisas sobre quais fatores endógenos e manipulações ambientais podem afetar o desenvolvimento da dependência (THOMAS et al., 2001, ROBINSON, 2004; BOUDREAU; WOLF, 2005; HYMAN et al., 2006).



**CAPÍTULO 2**

**Exposição à cocaína e ao estresse na adolescência:  
sensibilização comportamental duradoura e neuroadaptações**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Adolescência e vulnerabilidade às substâncias de abuso

A adolescência é o período de transição entre a infância e a maturidade. Adolescentes de várias espécies exibem comportamentos típicos desse período, que incluem o aumento da interação social com seus pares, busca de novidades e o comportamento de risco. Estes comportamentos podem representar adaptações ontogênicas que possibilitam a aquisição das habilidades necessárias para atingir a independência na idade adulta (SPEAR, 2000). A puberdade é uma das várias alterações ontogênicas que ocorrem na adolescência e é caracterizada pelas mudanças fisiológicas e neuroendócrinas características da maturação sexual (SPEAR, 2000).

Em humanos, a busca por novidades e o comportamento de risco trazem também conseqüências negativas durante a adolescência. Podemos citar o alto risco de gravidez não desejada, doenças sexualmente transmissíveis, o abuso de substâncias psicoativas como aspectos negativos. Esses comportamentos podem ser relacionados à dificuldade de controle dos impulsos nesse período do desenvolvimento (CASEY et al., 2008).

Levantamento realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas - CEBRID (GALDURÓZ et al., 2005) revelou que 22,6% dos estudantes de Ensino Fundamental e Médio das capitais brasileiras já haviam experimentado algum tipo de substância psicotrópica, excluindo-se álcool e tabaco. Dentre esses estudantes, 65% encontravam-se na faixa etária entre 10-18 anos. O uso na vida de cocaína e crack atingiu 2,7 % dos

estudantes, sendo a média de idade do primeiro uso das substâncias de 14,4 anos.

O uso de cocaína no Brasil é maior entre crianças e adolescentes em situação de rua. Desses jovens, 24,5% já utilizaram cocaína pelo menos uma vez na vida (NOTO et al., 2003).

Embora seja clara a importância do estudo de alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas à dependência durante a adolescência, a grande maioria dessas pesquisas é realizada somente em animais adultos. Desse modo, tornam-se relevantes estudos dessa área em adolescentes.

Assim como em humanos, é difícil caracterizar com precisão os eventos que desencadeiam e cessam a adolescência em ratos. Contudo, o período entre os dias pós-natais (DPN) 28 a 42 pode ser considerado a adolescência em ratos, pois compreende o período em que ocorre grande aceleração do crescimento, envolve a maturação sexual e ocorrem as principais alterações comportamentais, como a maior interação social e procura por novidade (SPEAR; BRAKE, 1983; SPEAR, 2000). Entretanto, outros autores consideram a adolescência de ratos como um período mais amplo, compreendendo o intervalo entre os DPN 21 - 59 (TIRELLI et al., 2003). Desse modo, seria seguro considerar a idade adulta de ratos somente a partir do DPN 60 (SPEAR, 2000; TIRELLI et al., 2003).

O sistema nervoso central (SNC) de animais adolescentes passa por intenso remodelamento. É observada intensa produção de sinapses e axônios no início da adolescência, seguida da perda de parte dessas estruturas no final deste período para atingir níveis que pouco se alteram durante a idade

adulta (CREWS et al., 2007). Um exemplo importante dessas alterações neurais ocorre com os receptores dopaminérgicos do tipo D1 e D2. Esses receptores aumentam em número no núcleo acumbens (NAc) e caudado putamen durante a adolescência e logo depois tem seu número reduzido para os níveis da idade adulta (TEICHER et al., 1995).

Animais adolescentes e adultos podem apresentar respostas comportamentais e neurais diferentes às substâncias psicostimulantes, como a cocaína e anfetamina. Nesse sentido, ratos adolescentes apresentam menor ativação psicomotora em resposta à cocaína quando comparados a adultos (LAVIOLA et al., 1995). Ratos e camundongos adolescentes também mostram menor atividade locomotora e estereotipia induzidas pela anfetamina (BOLANOS et al., 1998; ADRIANI; LAVIOLA, 2000).

A estimulação da liberação de dopamina induzida pela cocaína passa por maturação durante a adolescência, sendo a liberação desse neurotransmissor maior em ratos adultos quando comparados a ratos jovens que receberam cocaína (CAO et al., 2007).

Heijtz et al. (2003) demonstraram que a administração de baixas doses de anfetamina (0,5mg/kg) no início da adolescência é capaz de aumentar o número e tamanho dos dendritos de neurônios no córtex pré-frontal medial (CPFm) de ratos avaliados 15 dias após o tratamento com essa substância. Isso sugere que a administração de substâncias psicostimulantes na adolescência pode causar alterações duradouras no SNC.

Ratos adolescentes também desenvolvem sensibilização comportamental em resposta à administração repetida de cocaína. Essa alteração comportamental foi observada quando os animais foram testados

ainda na adolescência (2 dias após a administração repetida de cocaína) (LAVIOLA et al., 1995; PLANETA; MARIN, 2002). Entretanto, não há evidências de que a sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de cocaína na adolescência possa ser duradoura, perdurando até a idade adulta.

## **1.2. Estresse e dependência**

Considerando-se as teorias descritas no capítulo 1 desta tese, poderíamos supor que a mera exposição à substância seria o fator de risco crítico para o desenvolvimento da dependência. Entretanto, estudos epidemiológicos mostram que muitos indivíduos experimentam diferentes tipos de substâncias de abuso por períodos variáveis de tempo, mas somente alguns se tornam dependentes. Isso indica que fatores adicionais àqueles relacionados à interação substância-organismo influenciam a progressão para o uso compulsivo (O'BRIEN, 2006).

Estudos clínicos apontam que há correlação entre a história prévia de exposição a eventos estressantes e o abuso ou dependência de substâncias psicoativas (TRIFFLEMAN et al., 1995, MULIA et al., 2008; TATE et al., 2008). Em indivíduos dependentes de cocaína, a exposição ao estresse em condições laboratoriais controladas pode induzir também desejo intenso por consumir a substância (SINHA et al., 1999). Assim, o estresse tem sido destacado como um dos principais fatores relacionados à iniciação e manutenção do uso, assim como recaída à utilização das substâncias psicoativas que causam dependência (PIAZZA; LeMOAL, 1996; SHAHAM et al., 2000; SINHA, 2001; PLANETA et al., 2007).

Estudos em animais de laboratório têm corroborado as informações clínicas sobre a interação entre estresse e dependência.

Covington e Miczek (2001), demonstraram que a sensibilização induzida por estresse causa aumento da quantidade de cocaína auto-administrada e da duração dos episódios de auto-administração. Esse fenômeno corresponderia à perda do controle do uso da substância em humanos.

Outro parâmetro importante relacionado à dependência e que pode ser alterado pelo estresse é a sensibilização comportamental (fenômeno discutido na parte 1 da tese). Assim, vários estudos demonstram que ratos adultos expostos a diferentes tipos de estresse, como choque nas patas, imobilização, privação de alimento, natação forçada ou estresse social apresentam aumento da resposta locomotora à administração de anfetamina ou cocaína (BADIANI et al., 1992; ROUGÉ-PONT et al., 1995; PRASAD et al., 1998; HAILE et al., 2001; De JONG et al., 2005). Isso evidencia a sensibilização comportamental cruzada entre estresse e psicostimulantes.

No nosso laboratório, investigamos a sensibilização cruzada entre estresse e psicostimulantes utilizando protocolos de exposição repetida ao estresse de imobilização ou ao estresse variado (vários tipos de estresse alternadamente). Os resultados demonstraram que a exposição ao estresse repetido de imobilização, mas não o variado, causa sensibilização comportamental cruzada com a cocaína em ratos adultos (ARAUJO et al., 2003). Enquanto isso, em animais adolescentes, a exposição a ambos os protocolos de estresse repetido causa aumento da atividade locomotora induzida pela administração de cocaína (LEPSCH et al., 2005).

A maioria dos estudos que avaliaram os efeitos da exposição ao estresse sobre a sensibilização comportamental à cocaína ou anfetamina é realizada em animais na idade adulta. Esses estudos geralmente testam a sensibilização comportamental após intervalos de 1 a 15 dias após a última exposição ao estresse (ROUGÉ-PONT et al., 1995; PRASAD et al., 1998; COVINGTON; MICZEK, 2001; ARAÚJO et al., 2003). Entretanto, há evidências em ratos adultos de que o efeito do estresse pode ser duradouro. Nesse sentido, Nikulina et al. (2004) mostraram que 4 sessões de estresse de derrota social foram capazes de induzir sensibilização comportamental à anfetamina quando administrada 2 meses após a exposição ao estresse. Apesar disso, não há evidências de estudos em animais adolescentes sobre a sensibilização comportamental duradoura à cocaína induzida nesta idade. Assim, tornam-se importantes estudos sobre os efeitos duradouros até a idade adulta causados pela exposição ao estresse na adolescência.

### **1.3. Alterações da neurotransmissão glutamatérgica e da enzima tirosina hidroxilase (TH) relacionadas aos efeitos da cocaína**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Seus receptores medeiam a maior parte da transmissão excitatória e participam da plasticidade sináptica do SNC de mamíferos (OZAWA et al., 1998).

Como visto anteriormente (na parte 1 desta tese), o efeito neuroquímico primário da cocaína é o aumento da dopamina na fenda sináptica de terminais de neurônios dopaminérgicos (O'BRIEN, 2006). Além disso, a administração aguda de cocaína também provoca aumento da liberação de

glutamato em áreas do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, como a ATV, NAc e CPFm (REID et al., 1997; KALIVAS; DUFFY, 1998; ZHANG et al., 2001).

Diferentemente das observações acima sobre a liberação de glutamato induzida pela administração aguda de cocaína, Pierce et al. (1996) mostraram que a liberação desse neurotransmissor no NAc ocorre somente após administração repetida de cocaína. Esses autores mostraram ainda que esse efeito ocorre apenas em ratos que desenvolveram sensibilização comportamental à cocaína.

Os neurônios glutamatérgicos que se projetam para o NAc são provenientes principalmente do CPFm e amígdala (VANDERSHUREN; KALIVAS, 2000). Sugere-se que o CPFm tenha papel importante na sensibilização comportamental à cocaína, pois lesões dessa região encefálica inibem a expressão da sensibilização comportamental e a ativação da liberação de glutamato no NAc em resposta à cocaína (PIERCE et al., 1998).

A liberação de glutamato no NAc pode mediar também a reinstalação da auto-administração de cocaína após a extinção desse comportamento (CORNISH; KALIVAS, 2000). Esse efeito é dependente do glutamato proveniente de neurônios do CPFm (McFARLAND et al., 2003).

Os efeitos da administração repetida de cocaína sobre a neurotransmissão glutamatérgica podem ocorrer também pela alteração de seus receptores. Os receptores glutamatérgicos estão presentes na membrana celular e são divididos em ionotrópicos (do tipo NMDA, AMPA ou cainato) e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são estruturas tetraméricas ou pentaméricas que variam de acordo com a combinação de suas subunidades. O tipo NMDA é formado pelas subunidades NR1 e NR2 A - C. Os receptores



AMPA são formados pelas subunidades GluR1 - 4, enquanto o tipo cainato apresenta as subunidades GluR5-7 e KA1 e 2 (OZAWA et al., 1998; MELDRUM, 2000).

A administração repetida de cocaína pode alterar a quantidade de determinadas subunidades dos receptores glutamatérgicos. Assim, Fitzgerald et al. (1996) demonstraram aumento da expressão das subunidades GluR1 e NR1 na ATV, mas não no NAc, 24 horas após o tratamento crônico com cocaína.

Churchill et al. (1999) mostraram que as alterações de GluR1 no NAc são tardias, ocorrendo 3 semanas após a administração repetida de cocaína. Esses autores também destacaram que essas alterações moleculares estão restritas aos animais que desenvolveram sensibilização comportamental à cocaína.

Os receptores de glutamato também podem ser alterados após procedimentos de auto-administração de cocaína. No entanto, essas alterações ainda são controversas. Assim, Lu et al. (2003) demonstraram aumento das subunidades GluR1 e NR1 no NAc de ratos por períodos de 1 a 90 dias após a auto-administração de cocaína. Entretanto, Hemby, Horman e Tang (2005) não encontraram alterações no NAc, mas sim aumento de NR1 no CPFm.

O aumento das subunidades GluR1 e NR1 no NAc também foi observado em humanos vítimas de overdose por cocaína (HEMBY et al., 2005).

Além de alterações na neurotransmissão glutamatérgica, a sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de cocaína pode estar relacionada a alterações da quantidade da enzima TH (CARLEZON; NESTLER, 2002). A TH é a enzima que limita a velocidade de síntese neuronal de dopamina (NESTLER, 2001). Alterações dessa enzima no NAc de ratos

adultos podem durar até duas semanas após o tratamento com cocaína (TODTENKOPF et al., 2000; SCHMIDT et al., 2001).

De modo semelhante à cocaína, a exposição ao estresse também pode alterar os receptores de glutamato em neurônios dopaminérgicos. Foi demonstrado que a exposição ao estresse variado por 10 dias aumenta a quantidade de GluR1 e NR1 na ATV (FITZGERALD et al., 1996). Além disso, a exposição ao estresse de natação forçada aumenta a corrente pós-sináptica excitatória mediada pelos receptores AMPA, em neurônios dopaminérgicos da ATV de modo muito semelhante à administração de cocaína e anfetamina (SAAL et al., 2003).

Os efeitos do estresse sobre os receptores glutamatérgicos podem ser duradouros. Como demonstrado por Berger et al. (2002), ratos adultos que foram expostos a estresse pré-natal apresentam maior quantidade de receptores NMDA no NAc. Sugerindo assim, que os efeitos do estresse sobre os receptores de glutamato podem permanecer no decorrer do desenvolvimento.

Tem sido demonstrado também que a exposição ao estresse por 10 dias pode aumentar a imunoreatividade à TH na ATV (ORTIZ et al., 1996).

Embora a literatura seja escassa, esses resultados sugerem que a cocaína e o estresse podem induzir alterações comuns nos receptores de glutamato, as quais podem estar relacionadas ao desenvolvimento da sensibilização comportamental induzida pelo estresse. Além disso, todos os estudos citados acima foram realizados em animais adultos, desconsiderando a adolescência, que é o principal período de contato inicial com as substâncias que causam dependência (GALDURÓZ et al., 2005)

## **2. OBJETIVOS**

Os experimentos apresentados a seguir tiveram como objetivos investigar:

a) se a administração repetida de cocaína ou exposição repetida ao estresse durante a adolescência produz sensibilização comportamental duradoura até a idade adulta.

b) se a sensibilização comportamental induzida em ratos adolescentes está relacionada a alterações das subunidades GluR1 e NR1 dos receptores glutamatérgicos e da enzima TH no NAc e CPFm.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Todo o desenvolvimento experimental deste capítulo da tese foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP-Araraquara.

### **3.1. Parecer ético**

O protocolo experimental (CEP-11/2004) foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de humanos ou animais em pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP - Campus de Araraquara. Os experimentos foram conduzidos seguindo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **3.2. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do nosso laboratório no dia pós-natal (DPN) 21, quando foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e iluminação (12/12 h, luz acesa às 07:00h). Os animais tiveram livre acesso à ração e água, sendo mantidos em grupos de 3 a 5 ratos por gaiola. Toda a manipulação experimental foi realizada na fase clara do ciclo claro/escuro.

### **3.3. Avaliação comportamental**

A atividade locomotora dos animais foi avaliada em uma caixa de atividade (Columbus Instruments-CA, EUA) construída em acrílico transparente com as seguintes dimensões: 44 (comprimento) X 44 (largura) X 20 (altura) cm (Fig. 1). Os animais foram colocados individualmente na caixa de atividade e a locomoção foi registrada automaticamente por meio de fotocélulas localizadas a cada 2,5 cm nas paredes da caixa e distantes 4,5 cm do seu assoalho. Cada unidade da locomoção corresponde à interrupção consecutiva de dois feixes de raios infravermelhos emitidos pelas fotocélulas.



**Figura 1:** Caixa para medida da atividade locomotora (Columbus Instruments-EUA).

### 3.4. Estresse

O procedimento de estresse empregado foi baseado nos trabalhos de Ortiz et al. (1996) e Lepsch et al. (2005) e consiste na exposição a vários tipos de estresse por dez dias consecutivos, como mostra o Quadro 1.

<b>Dia</b>	<b>Tipo de estresse</b>	
<b>1</b>	Serragem úmida à noite (18h dia anterior - 9h)	Imobilização por 60 min (10h)
<b>2</b>	Isolamento/frio por 60min (15h)	Luz acesa à noite (18h)
<b>3</b>	Luz apagada por 180 min (12 h)	Nadar forçado por 4 min (15h)
<b>4</b>	Serragem úmida (8h – 18h)	Privação água e comida à noite (19h)
<b>5</b>	Nadar forçado 3 min (13h)	Isolamento à noite (19h)
<b>6</b>	Isolamento / Frio por 15 min (14h)	Luz apagada por 120 min (15h)
<b>7</b>	Serragem úmida e luz acesa à noite (18h)	
<b>8</b>	Isolamento e privação de água e comida à noite (18h)	
<b>9</b>	Imobilização por 60 min (16h)	Luz acesa à noite (18h)
<b>10</b>	Nadar forçado por 4 min (9h)	Imobilização por 60 min (10h)

**Quadro 1:** Procedimento de estresse variado.

### 3.5. Dissecção das áreas encefálicas

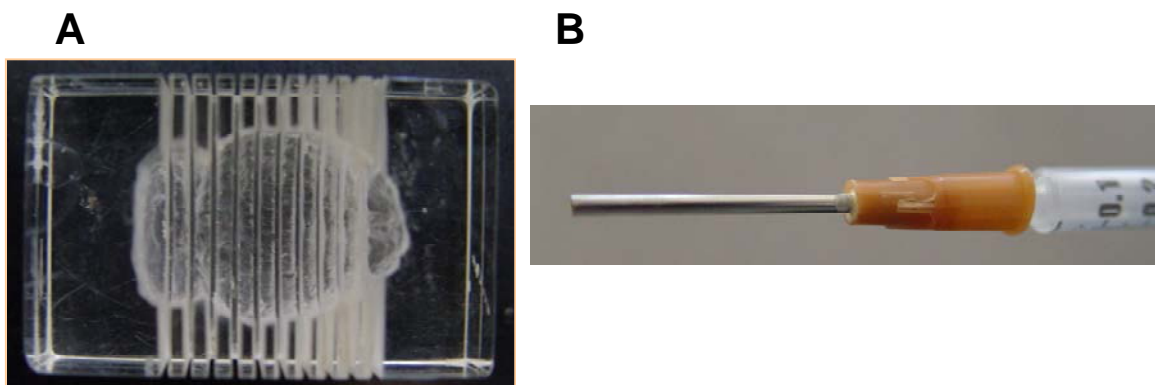
A dissecção das áreas encefálicas de interesse (CPFm e NAc) foi realizada imediatamente após a análise comportamental de cada animal.

Primeiramente, o animal foi decapitado em guilhotina e seu encéfalo extraído depois da retirada dos ossos superiores do crânio. O encéfalo foi então lavado e resfriado rapidamente por imersão em tampão TBS (100 mM de Tris; 0,9% de NaCl em água; pH 7,5) sobre gelo.

Após a lavagem, o encéfalo foi colocado em uma matriz de acrílico (Insight, Ribeirão Preto-SP). A matriz consiste de uma base sulcada com o

formato do encéfalo do rato e fissuras a cada 1,5 mm (Fig. 2A), por onde são introduzidas lâminas de aço para corte do encéfalo em fatias coronais. As fatias contendo o CPFm e NAc foram retiradas, colocadas em lâmina de vidro e as áreas de interesse foram dissecadas com agulha de 14 Gauge sem bixel (Fig. 2B). As fatias apresentavam aproximadamente as seguintes coordenadas a partir do bregma: +4,0 a + 2,5 mm (CPFm) e +2,5 a + 1,0 mm (NAc), segundo atlas de Paxinos e Watson (2005).

Todo esse procedimento foi realizado sobre gelo e em ambiente refrigerado para reduzir a ação de proteases. Após a dissecação o tecido foi colocado em tubo de polipropileno e mantido em gelo seco até seu armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 2:** A) Matriz de acrílico (Insight, Ribeirão Preto-SP) usada para retirada de fatias coronais do encéfalo de ratos. B) Agulha de 14 Gauge sem bixel usada para dissecação de áreas do encéfalo de ratos.

### 3.6. Western Blotting

O método foi baseado nas descrições de Lu et al. (2003), os quais avaliaram as mesmas proteínas em áreas cerebrais semelhantes.

O tecido foi homogeneizado por meio de ondas de ultra-som em 180µl de tampão de homogeneização (250 mM Tris.HCl; 1% SDS; 5 µg/ml Leupeptina; 5 µg/ml Pepstatina-A; 1 mM PMSF; 10 mM EDTA; pH 8). O conteúdo de proteínas nas amostras foi determinado por método colorimétrico semelhante ao de Lowry (DC Protein-Bio-Rad®, CA, EUA) para posterior ajuste da quantidade de proteínas (30 µg para GluR1 e NR1, 15 µg para TH). A quantidade de proteína aplicada foi determinada em ensaios preliminares utilizando-se quantidades situadas dentro da faixa de linearidade de detecção (4 a 30 µg para TH e 15 a 80 µg para GluR1 e NR1). Em seguida as amostras foram misturadas com tampão de amostra (concentração final: 62,5 mM Tris; 2% SDS; 10% glicerol, 0,1 M DTT e 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8) e fervidas por 5 minutos. Alíquotas de 15 µl foram submetidas à eletroforese por 1:20 h a 130V em gel de SDS-poliacrilamida (7,5% acrilamida/0,20% metilbisacrilamida, 10% SDS). No mesmo gel sempre foi adicionado padrão de peso molecular para confirmar a posição das proteínas de interesse.

Ao final da separação, as proteínas foram transferidas eletroforicamente (100 V por 2:30 h) do gel para uma membrana de PVDF (Amersham Biosciences). Após a transferência, as membranas foram incubadas por 1 hora sob agitação em solução de bloqueadora [TTBS (TBS + 0,1% de Tween-20) e 5% de leite em pó desnatado] e lavadas (5 X 5 minutos em TTBS).



Após essa etapa, as membranas foram incubadas por 14-16h com o anticorpo primário anti-GluR1 (1:3000, Santa-Cruz Biotechnology); anti-NR1 (1:3500, Santa-Cruz Biotechnology) ou anti-TH (1:6000, Santa-Cruz Biotechnology); diluído em TTBS e 2% leite desnatado sob agitação. As membranas foram então novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com “horseradish” peroxidase (1:2000, Amersham Biosciences) por 1hora. Após outra lavagem as membranas foram então submetidas à revelação utilizando-se o kit de quimioluminescência ECL<sup>®</sup> Amersham. A luminescência foi detectada indiretamente por meio do filme Kodak Biomax Light<sup>®</sup>. A Fig.3 mostra imagem representativa das bandas de cada proteína quantificada.

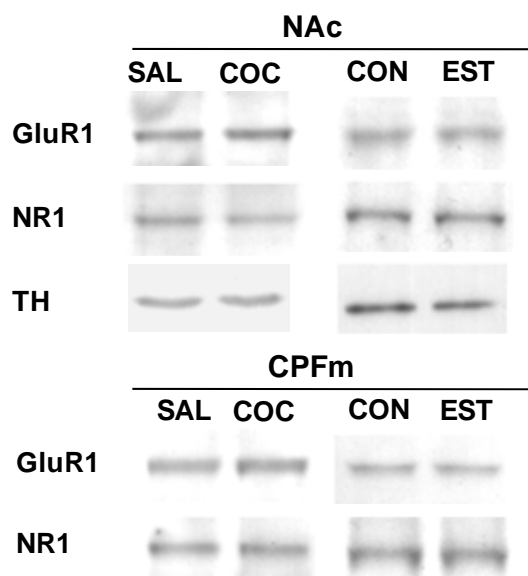
Após a revelação das proteínas de interesse no estudo, foi realizado controle da quantidade de proteína aplicada (“loading”). Os anticorpos presentes nas membranas foram retirados por meio de incubação por 30 minutos sob agitação periódica a 50°C em tampão de ressonagem (62,5 mM Tris.HCl; 2% SDS e 100 mM mercaptoetanol, pH 6,7). Posteriormente, a membrana foi lavada, bloqueada com solução de leite desnatado e incubada com anticorpo para a proteína  $\beta$ -actina (1:500, Santa-Cruz Biotechnology). Em seguida, a incubação com anticorpo secundário e revelação era realizada de maneira idêntica a descrita anteriormente.

Os filmes foram escaneados em modo transparência e a intensidade das bandas foi quantificada utilizando-se o programa Image-Master<sup>®</sup> (Amersham Pharmacia Biotech) com subtração da marcação de fundo. A intensidade das bandas de GluR1, NR1 ou TH foram divididas pela intensidade das bandas de  $\beta$ -actina na mesma amostra. Desse modo, erros na dosagem de

proteínas após a homogeneização ou extravasamentos das amostras no momento da aplicação no gel são corrigidos. Amostras cujo valor da banda de  $\beta$ -actina foi superior a 130% ou inferior a 70% da média das amostras da mesma membrana foram repetidas em outro ensaio.

Em cada membrana foram analisadas aproximadamente as amostras de quatro animais controle e quatro submetidas ao estresse ou administração repetida de cocaína. Assim, foram analisadas no mínimo duas membranas para cada proteína em cada grupo experimental. Em caso de falhas na banda de interesse, a amostra era repetida.

Os valores finais da quantificação das proteínas foram expressos como porcentagem, considerando-se 100% a média das intensidades das bandas do grupo controle.



**Figura 3:** Imagem representativa das bandas das proteínas GluR1, NR1 e TH após revelação em filme fotográfico. SAL (administração repetida de salina), COC (administração repetida de cocaína), CON (animais do grupo controle para o estresse) EST (animais expostos ao estresse).

## 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. Experimento 1- Sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de cocaína na adolescência

Foi utilizado o protocolo de sensibilização à cocaína padronizado anteriormente para animais adolescentes (PLANETA; MARIN, 2002). Esse procedimento consiste na administração intraperitoneal (i.p.) de solução salina (NaCl 0,9%) (1mL/kg) ou cocaína (10 mg/kg), 2 vezes ao dia (9:00 h e 17:00 h), durante 5 dias consecutivos (pré-tratamento). Os animais foram retirados de suas gaiolas, receberam as injeções e foram recolocados imediatamente nas gaiolas.

A administração repetida de cocaína para indução da sensibilização foi realizada durante a adolescência (DPN 30-34) e os testes comportamentais foram realizadas em grupos independentes nos seguintes períodos:

- 3 dias após o pré-tratamento (DPN 37, adolescência)
- 30 dias após o pré-tratamento (DPN 64, idade adulta).
- 60 dias após o pré-tratamento (DPN 94, idade adulta).

Nos DPN 37, 64 e 94 (teste) os animais foram colocados na caixa de atividade para habituação por 20 minutos e logo após receberam injeção i.p. de salina ou cocaína (10 mg/kg) e tiveram suas atividades locomotoras registradas em intervalos de 5 minutos durante 40 minutos (N = 7-8 animais por grupo em cada idade). Desse modo, constituímos os seguintes grupos:

- SAL+SAL: salina no pré-tratamento e salina no teste.
- SAL+COC: salina no pré-tratamento e cocaína no teste.
- COC+COC: cocaína no pré-tratamento e cocaína no teste.

Imediatamente após o registro da atividade locomotora, os animais foram decapitados, sendo o NAc e o CPFm dissecados e armazenados a -80°C para posterior análise por Western Blotting.

#### **4.2. Experimento 2- Sensibilização comportamental induzida pela exposição repetida ao estresse na adolescência**

Foi utilizado o protocolo de estresse variado que induziu sensibilização comportamental à cocaína em ratos adolescentes (LEPSCH et al., 2005).

A exposição repetida ao estresse variado (Quadro 1) foi realizada durante a adolescência (DPN 25-34). O grupo controle consistiu de animais de mesma idade, mantidos nas mesmas condições laboratoriais, mas não expostos ao estresse.

A avaliação comportamental em resposta à cocaína (teste), idades e retirada das amostras de tecido nervoso foi idêntica ao procedimento descrito acima para a sensibilização induzida pela administração repetida de cocaína (N = 7-8 animais por grupo em cada idade). Assim, constituímos os seguintes grupos:

- Controle+SAL: Não submetidos ao estresse e testados com salina.
- Estresse+SAL: Submetidos ao estresse e testados com salina.
- Controle+COC: Não submetidos ao estresse e testados com cocaína.
- Estresse+COC: Submetidos ao estresse e testados com cocaína.

### **4.3. Experimento 3- Comparação entre animais adolescentes e adultos da sensibilização comportamental duradoura induzida pela exposição repetida ao estresse**

Após análise dos resultados do Experimento 2, esse experimento foi delineado para avaliar se a ausência da sensibilização comportamental duradoura à cocaína induzida pelo estresse na adolescência é devida à idade dos animais. Para isso, tanto ratos na adolescência e na idade adulta foram expostos ao mesmo procedimento de estresse e testados com cocaína após longo período de intervalo.

Ratos adolescentes (DPN 25-34) foram expostos ao estresse e a sensibilização comportamental à cocaína foi analisada 36 dias depois (DPN 70, idade adulta; N = 8-9 animais por grupo). Paralelamente, ratos já adultos (DPN 65-74) foram expostos ao mesmo procedimento de estresse e a sensibilização comportamental destes foi também analisada 36 dias depois (DPN 110, idade adulta; N = 8-9 animais por grupo). O grupo controle consistiu de animais de mesma idade, mantidos nas mesmas condições laboratoriais, mas não expostos ao estresse (N = 8-9 animais, adolescentes ou adultos, por grupo).

Para análise comportamental (teste), tanto animais controle, como expostos ao estresse de ambas as idades foram colocados na caixa de atividade para habituação por 30 minutos e logo após receberam injeção i.p. de salina ou cocaína (15mg/kg) e tiveram suas atividades locomotoras registradas por 20 minutos. Desse modo, constituímos os seguintes grupos em cada idade:

- Controle+SAL: não expostos ao estresse e testados com salina.
- Estresse+SAL: expostos ao estresse e testados com salina.

- Controle+COC: não expostos ao estresse e testados com cocaína.
- Estresse+COC: expostos ao estresse e testados com cocaína.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados comportamentais do experimento 1 foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) unifatorial para cada idade dos animais, considerando-se o fator grupo (SAL+SAL, SAL+COC ou COC+COC). Nos experimentos 2 e 3 foi realizada ANOVA bifatorial em cada idade, considerando-se os fatores estresse (Controle e Estresse) e substância teste (salina e cocaína). Nos casos em que ANOVA mostrou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foi realizado o teste post hoc de Newman-Keuls.

Os resultados da quantificação das proteínas por Western Blotting foram analisados pelo teste *t*-Student para amostras independentes, considerando significativo  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Experimento 1- Sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de cocaína na adolescência

Os resultados desse experimento encontram-se publicados no periódico *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* (exemplar ANEXO).

### **6.1.1. Análise comportamental**

#### *6.1.1.1. Três dias após o tratamento, DPN 37:*

ANOVA revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $F_{2,19}=7,16$ ;  $p<0,01$ ). O teste post hoc Newman-Keuls revelou diferenças significativas entre os grupos SAL+COC e COC+COC ( $p<0,05$ ), demonstrando a expressão de sensibilização comportamental nesta idade. O mesmo teste post hoc não revelou diferença significativa entre os grupos SAL+SAL e SAL+COC ( $p=0,28$ ), evidenciando assim ausência de efeito agudo significativo da cocaína nesses animais adolescentes (Fig. 4A e B).

#### *6.1.1.2. Trinta dias após o tratamento, DPN 64:*

ANOVA revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $F_{2,18}=12,47$ ;  $p<0,001$ ). O teste Newman-Keuls revelou diferenças significativas entre os grupos SAL+COC e COC+COC ( $p<0,05$ ), demonstrando a expressão sensibilização comportamental no DPN 64 causada pela administração repetida de cocaína na adolescência. O mesmo teste Post Hoc mostrou diferenças significativas entre os grupos SAL+SAL e SAL+COC ( $p<0,05$ ) evidenciando efeito agudo da cocaína nesta idade (Fig. 4C e D).

#### *6.1.1.3. Sessenta dias após o tratamento, DPN 94:*

ANOVA revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $F_{2,19}=11,65$ ;  $p<0,001$ ). Nesta idade, o teste post hoc Newman-Keuls não mostrou diferenças significativas entre os grupos SAL+COC e COC+COC ( $p=0,85$ ), demonstrando a ausência de expressão de sensibilização

comportamental no DPN 94 após administração repetida de cocaína na adolescência. O mesmo teste post hoc mostrou diferença significativa entre os grupos SAL+SAL e SAL+COC ( $p < 0,001$ ), evidenciando o efeito agudo significativo da cocaína nesses animais (Fig. 4E e F).

### **6.1.2. Análise das proteínas GluR1, NR1 e TH**

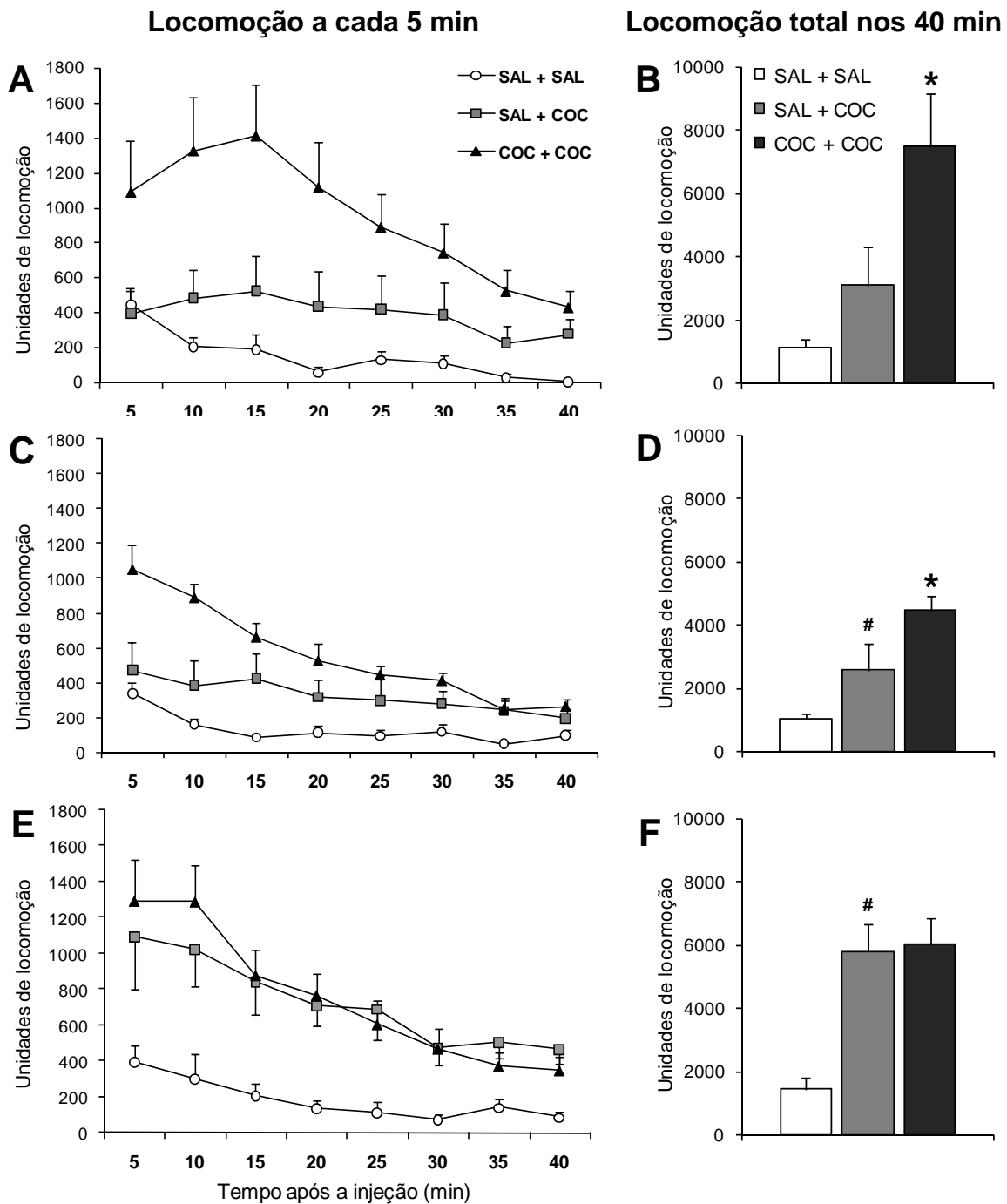
O objetivo dessa análise foi investigar o efeito do pré-tratamento com injeções repetidas na adolescência sobre as alterações moleculares nos dias dos testes. Para essa análise, foram quantificadas por Western Blotting somente as amostras dos grupos SAL+COC e COC+COC. A razão disso se deve ao curto intervalo de tempo entre a injeção teste e o momento de retirada das amostras (40 minutos). Esse intervalo de tempo é insuficiente para a produção de proteínas complexas como as em análise nesse experimento. Assim, o desafio com salina ou cocaína não deve alterar a quantidade dessas proteínas, somente o pré-tratamento com injeções repetidas por 5 dias pode ter produzido alterações.

No NAc, não houve alterações estatisticamente significativas das proteínas GluR1, NR1 e TH ( $p > 0,05$ ) em nenhuma das idades testadas (Fig. 5).

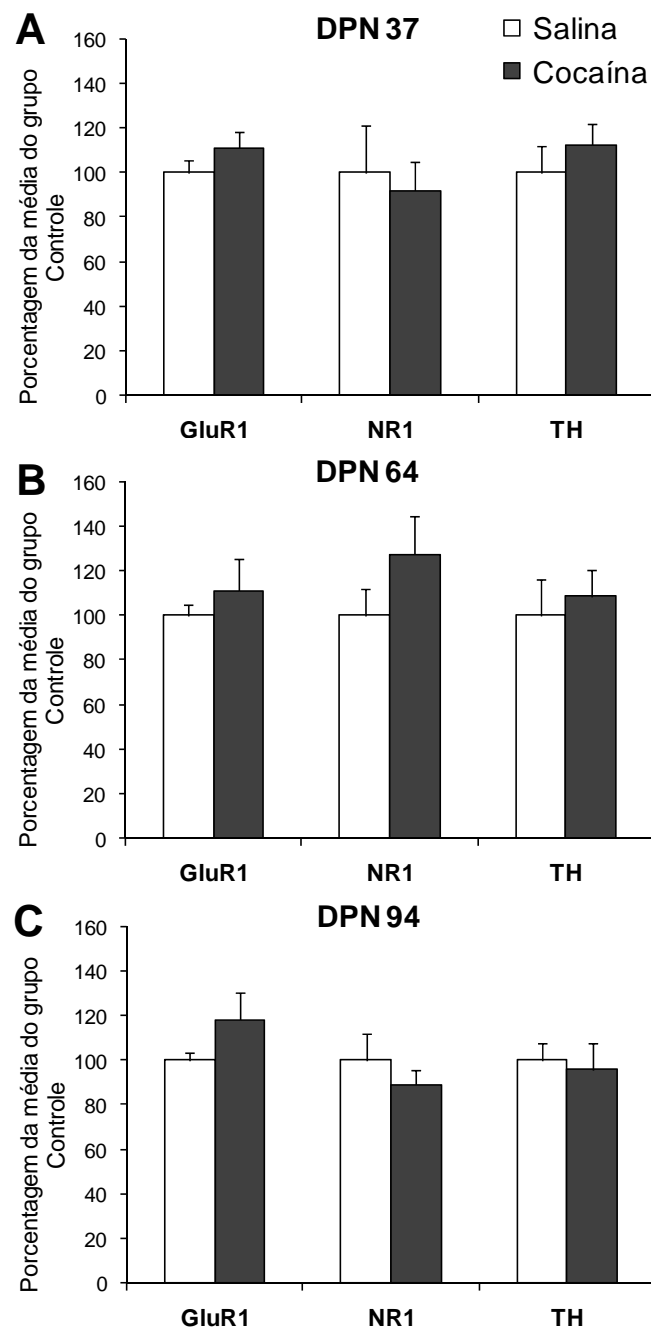
No CPFm foi observado aumento significativo da proteína GluR1 no DPN 37 ( $p < 0,05$ ). Nenhuma outra alteração significativa foi encontrada nas outras idades ou na quantificação das outras proteínas ( $p > 0,05$ ) (Fig. 6).

A proteína TH não foi detectável nas amostras de CPFm apesar de tentativas com maior quantidade de amostra aplicada nos géis ou alterações da concentração dos anticorpos. Isso deve refletir a pequena quantidade dessa enzima no CPFm.

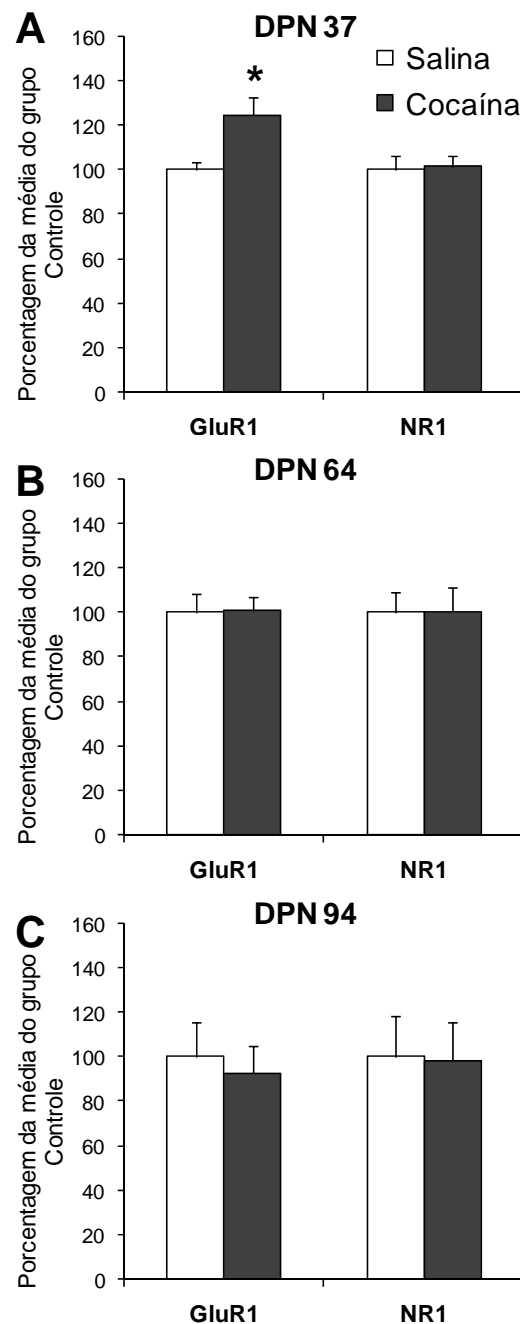




**Figura 4:** Atividade locomotora a cada 5 minutos (coluna da esquerda) e total em 40 minutos (coluna da direita) induzida pela administração de salina ou cocaína (10 mg/kg) 3 (A, B), 30 (C, D) ou 60 (E, F) dias depois do tratamento durante a adolescência. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da locomoção nos grupos SAL+SAL (pré-tratados com salina e testados com salina), SAL+COC (pré-tratados com salina e testados com cocaína) e COC+COC (pré-tratados com cocaína e testados com cocaína). #  $p < 0,05$ : SAL+SAL vs SAL+COC; \*  $p < 0,05$ : SAL+COC vs COC+COC (Newman-Keuls).



**Figura 5:** Quantificação das proteínas GluR1, NR1 e tirosina hidroxilase (TH) no núcleo acumbens após tratamento repetido (5 dias, duas vezes ao dia) com cocaína (10 mg/Kg) ou salina. **A)** três dias após o tratamento (DPN 37), **B)** trinta dias após o tratamento (DPN 64) e **C)** sessenta dias após o tratamento (DPN 94). As barras representam a média  $\pm$  EPM da quantidade das proteínas em relação à média do grupo salina (7 - 8 animais por grupo).



**Figura 6:** Quantificação das proteínas GluR1 e NR1 no córtex pré-frontal medial após tratamento repetido (5 dias, duas vezes ao dia) com cocaína (10 mg/Kg) ou salina. **A)** três dias após o tratamento (DPN 37), **B)** trinta dias após o tratamento (DPN 64) e **C)** sessenta dias após o tratamento (DPN 94). As barras representam a média  $\pm$  EPM da quantidade das proteínas em relação à média do grupo salina (7 - 8 animais por grupo). \*  $p < 0,05$ : GluR1 entre salina vs cocaine (teste *t*-Student).

## 6.2. Experimento 2- Sensibilização comportamental induzida pela exposição repetida ao estresse na adolescência

### 6.2.1. Análise comportamental

#### 6.2.1.1. Três dias após o tratamento, DPN 37:

ANOVA revelou diferenças estatisticamente significativas para os fatores estresse ( $F_{1,27}=5,87$ ;  $p<0,05$ ) e substância teste ( $F_{1,27}=64,67$ ;  $p<0,001$ ). Além disso, houve interação significativa entre os dois fatores ( $F_{1,27}=5,52$ ;  $p<0,05$ ), indicando influência do fator estresse sobre os efeitos da substância teste. A análise pelo teste Newman-Keuls mostrou diferença significativa entre os grupos Controle-Cocaína e Estresse-Cocaína ( $p<0,01$ ) evidenciando sensibilização comportamental induzida pelo estresse nesta idade. Foram encontradas também diferenças significativas entre os grupos: Controle-Salina e Controle-Cocaína ( $p<0,01$ ), assim como entre os grupos Estresse-Salina e Estresse-Cocaína ( $p<0,001$ ); evidenciando efeito agudo significativo da cocaína (Fig. 7A e B).

#### 6.2.1.2. Trinta dias após o tratamento, DPN 64:

ANOVA revelou ausência de diferenças estatisticamente significativas para o fator estresse ( $F_{1,24}=0,01$ ;  $p=0,91$ ). No entanto, houve diferença significativa para o fator desafio ( $F_{1,24}= 24,96$ ;  $p<0,001$ ). Não houve interação significativa somente entre os dois fatores ( $F_{1,24}=0,38$ ;  $p=0,54$ ). A comparação pelo teste Newman-Keuls revelou que não houve diferenças significativas entre os grupos Controle-Cocaína e Estresse-Cocaína ( $p=0,73$ )

evidenciando a ausência de sensibilização comportamental induzida pelo estresse nesta idade. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos: Controle-Salina e Controle-Cocaína ( $p < 0,01$ ), assim como entre os grupos Estresse-Salina e Estresse-Cocaína ( $p < 0,001$ ); evidenciando efeito agudo significativo da cocaína (Fig. 7C e D).

#### 6.2.1.3. Sessenta dias após o tratamento, DPN 94:

ANOVA revelou ausência de diferenças estatisticamente significativas para o fator estresse ( $F_{1,24} = 0,66$ ;  $p = 0,42$ ). Entretanto, houve diferença significativa para o fator desafio ( $F_{1,24} = 28,61$ ;  $p < 0,001$ ). Não houve interação significativa somente entre os dois fatores ( $F_{1,24} = 1,17$ ;  $p = 0,29$ ). A comparação pelo teste Newman-Keuls apontou que não houve diferenças significativas entre os grupos Controle-Cocaína e Estresse-Cocaína ( $p = 0,19$ ) evidenciando a ausência de sensibilização comportamental induzida pelo estresse nesses animais. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos: Controle-Salina e Controle-Cocaína ( $p < 0,001$ ), assim como entre os grupos Estresse-Salina e Estresse-Cocaína ( $p < 0,01$ ); evidenciando efeito agudo significativo da cocaína (Fig. 7E e F).

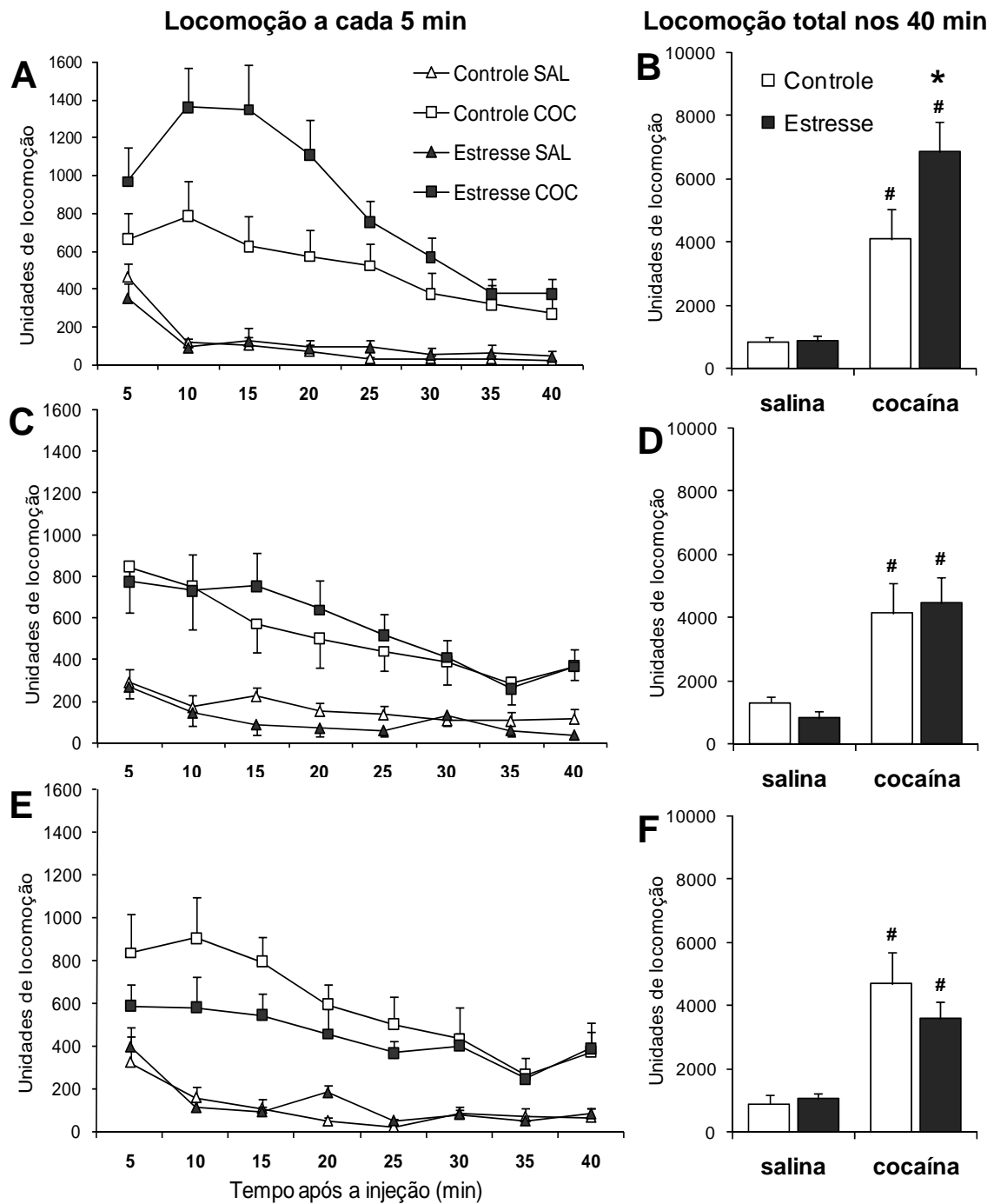
#### 6.2.2. Análise das proteínas GluR1, NR1 e TH

O objetivo dessa análise foi investigar o efeito do estresse durante a adolescência sobre as alterações moleculares nos dias de teste. Como

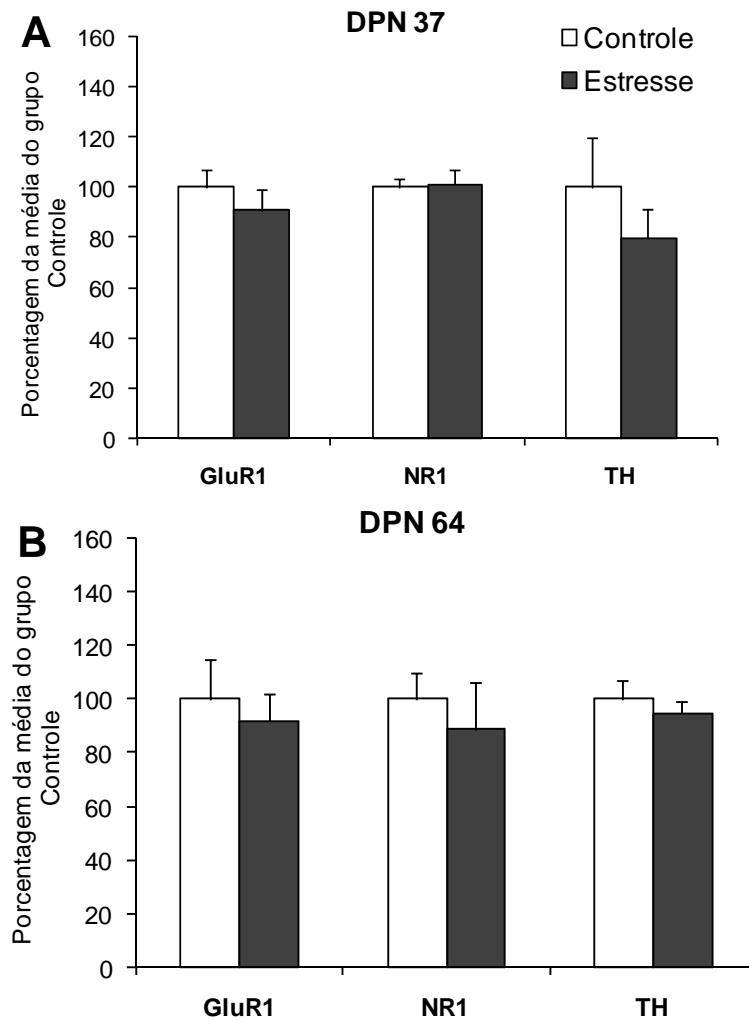
descrito no item 6.1.2 para essa análise, foram quantificadas somente as amostras dos grupos Controle-cocaína e Estresse-cocaína.

A comparação pelo teste *t*-Student entre os animais controle e expostos ao estresse revelou que nos DPN 37 e 64 não houve alterações significativas ( $p>0,05$ ) das proteínas GluR1, NR1 ou TH no NAc (Fig. 8) ou CPFm (Fig. 9) nos DPN 37 e 64.

As amostras do DPN 94 não foram analisadas, pois a sensibilização comportamental não estava presente desde o DPN 64 e nenhuma alteração na quantidade das proteínas investigadas foi encontrada mesmo com a sensibilização comportamental no DPN 37.

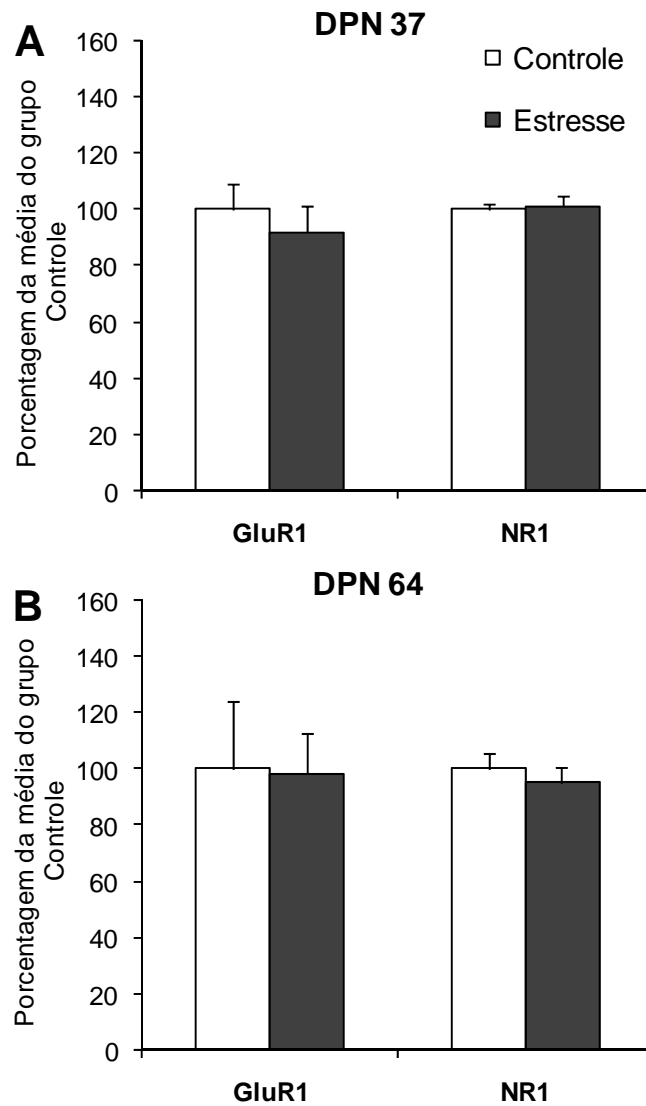


**Figura 7:** Atividade locomotora a cada 5 minutos (coluna da esquerda) e total em 40 minutos (coluna da direita) induzida pela administração de salina ou cocaína (10 mg/kg) 3 (A, B), 30 (C, D) ou 60 (E, F) dias depois da exposição ao estresse durante a adolescência. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da locomoção. SAL= salina, COC= cocaína. #  $p < 0,01$ : diferente do respectivo grupo desafiado com salina; \*  $p < 0,01$ : diferente do grupo controle desafiado com cocaína (Newman-Keuls).



**Figura 8:** Quantificação das proteínas GluR1, NR1 e tirosina hidroxilase (TH) no núcleo acumbens após exposição repetida ao estresse durante a adolescência. **A)** três dias após o estresse (DPN 37), **B)** trinta dias após o estresse (DPN 64) e **C)** sessenta dias após o estresse (DPN 94). As barras representam a média  $\pm$  EPM da quantidade das proteínas em relação à média do grupo salina (7 - 8 animais por grupo).





**Figura 9:** Quantificação das proteínas GluR1 e NR1 no córtex pré-frontal medial após exposição repetida ao estresse durante a adolescência. **A)** três dias após o estresse (DPN 37), **B)** trinta dias após o estresse (DPN 64) e **C)** sessenta dias após o estresse (DPN 94). As barras representam a média  $\pm$  EPM da quantidade das proteínas em relação à média do grupo salina (7 - 8 animais por grupo).

### **6.3. Experimento 3- Comparação entre animais adolescentes e adultos da sensibilização comportamental duradoura induzida pela exposição repetida ao estresse**

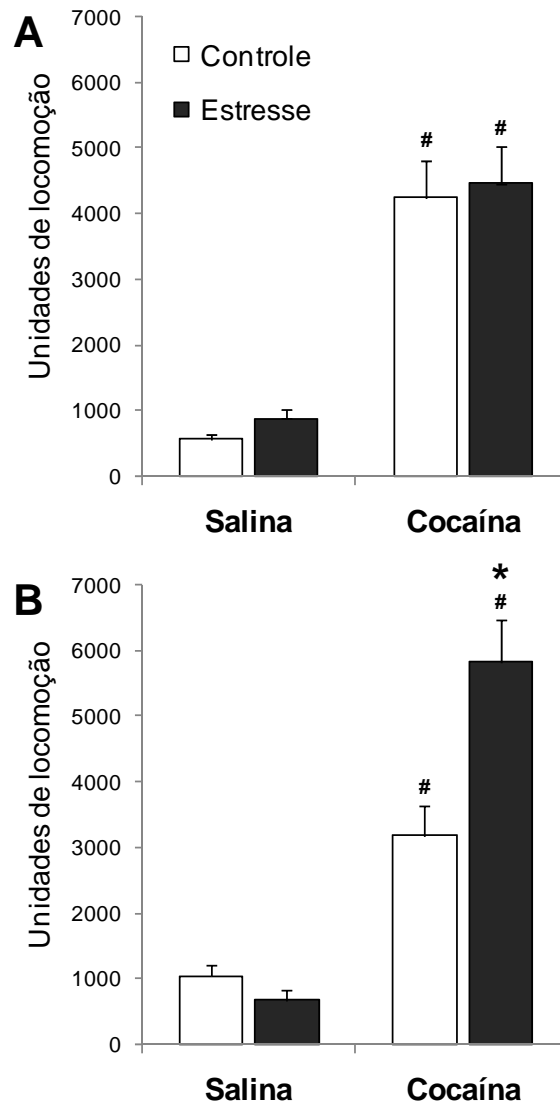
#### **6.3.1. Animais expostos ao estresse na adolescência:**

Nesses animais ANOVA não detectou diferenças estatisticamente significativas para o fator estresse ( $F_{1,30}=0,39$ ;  $p=0,54$ ). Entretanto, o fator substância teste causou alterações significativas ( $F_{1,30}=68,92$ ;  $p<0,001$ ), mas não houve interação significativa entre os dois fatores ( $F_{1,30}=0,01$ ;  $p=0,92$ ). A análise seguinte pelo teste Newman-Keuls mostrou que não houve sensibilização comportamental nesses animais, pois a diferença entre os grupos Controle-Cocaína e Estresse-Cocaína não foi significativa ( $p=0,71$ ). O efeito agudo da cocaína foi observado nesses animais, pois a locomoção do grupo Controle-Cocaína foi maior do que Controle-Salina ( $p<0,001$ ) e do grupo Estresse-Cocaína foi maior do que o Estresse-Salina ( $p<0,001$ ) (Fig. 10A).

#### **6.3.2. Animais expostos ao estresse na idade adulta:**

ANOVA detectou diferenças estatisticamente significativas para os fatores estresse ( $F_{1,29}=6,81$ ;  $p<0,05$ ) e substância teste ( $F_{1,29}=70,03$ ;  $p<0,001$ ). Houve interação significativa entre os dois fatores ( $F_{1,29}=12,03$ ;  $p<0,01$ ). A análise seguinte pelo teste Newman-Keuls revelou a expressão de sensibilização comportamental duradoura nesses animais, pois a diferença entre os grupos Controle-Cocaína e Estresse-Cocaína foi significativa ( $p<0,001$ ). O efeito agudo

da cocaína foi observado nesses animais, pois a locomoção do grupo Controle-Cocaína foi maior do que Controle-Salina ( $p < 0,01$ ) e do grupo Estresse-Cocaína foi maior do que o Estresse-Salina ( $p < 0,001$ ) (Fig. 10B).



**Figura 10:** Atividade locomotora induzida pela administração de salina ou cocaína (15 mg/kg). **A)** Animais expostos ao estresse durante a adolescência e testados 36 dias após. **B)** Animais expostos ao estresse durante a idade adulta e testados 36 dias após. As barras representam a média  $\pm$  EPM da locomoção durante 20 minutos. #  $p < 0,001$ : diferente do respectivo grupo desafiado com salina; \*  $p < 0,01$ : diferente do grupo controle desafiado com cocaína (Newman-Keuls).

## **7. DISCUSSÃO**

### **7.1. Sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de cocaína na adolescência**

Primeiramente, os resultados demonstraram diferença na resposta aguda à cocaína entre adolescentes e adultos. A administração aguda de cocaína (10mg/kg) em animais adolescentes (grupo SAL-COC, DPN 37) não induziu aumento significativo da locomoção. No entanto, a mesma administração em ratos adultos (DPN 64 e 94) causou aumento significativo. Isso indica que ratos adolescentes são menos sensíveis, comparados a adultos, aos efeitos estimulantes psicomotores da cocaína. Esse dado está de acordo com outros estudos que mostraram hiporesponsividade de adolescentes aos efeitos da cocaína ou anfetamina (LAVIOLA et al., 1995; BOLANOS et al., 1998; ADRIANI; LAVIOLA, 2000). Alterações naturais do desenvolvimento, como redução de receptores dopaminérgicos e aumento de transportadores de monoaminas no NAc e caudado putamen ocorrem durante a adolescência (TEICHER et al., 1995; TARAZI et al., 1998). Essas alterações em vias neurais, que estão relacionadas à modulação do comportamento motor e recompensa às substâncias psicoativas, podem resultar na diferente sensibilidade aguda aos psicostimulantes entre adolescentes e adultos.

Nossos resultados demonstraram ainda que a administração repetida de cocaína durante a adolescência induz sensibilização comportamental nos animais quando testados 3 dias após a suspensão do tratamento (DPN 37, ainda adolescentes). Esta observação corrobora resultados anteriores do nosso

laboratório (PLANETA; MARIN, 2002) e de outros grupos de pesquisa (LAVIOLA et al., 1995; FRANTZ et al., 2007). Assim, de modo semelhante a animais adultos, administrações repetidas de cocaína em ratos adolescentes também causam adaptações que resultam na sensibilização comportamental.

Além disso, observamos que a sensibilização é duradoura e se expressa até 30 dias (DPN 64, idade adulta) após a suspensão de tratamento repetido com a substância. Esta observação é particularmente relevante considerando a falta estudos sobre os efeitos em longo prazo induzidos pela administração de cocaína na adolescência. Somente um estudo (UJIKE et al., 1995) mostrou que a administração de cocaína entre os DPN 28 - 32 produziu sensibilização comportamental até próximo da idade adulta (DPN 53). Desse modo, nosso estudo estendeu o intervalo de tempo entre a indução da sensibilização na adolescência e a sua expressão, demonstrando o aumento do efeito da cocaína além da idade mínima considerada idade adulta (DPN 60).

De modo semelhante, McPherson e Lawrence (2006) demonstraram que a administração de anfetamina durante a adolescência também induz sensibilização comportamental duradoura até a idade adulta.

A sensibilização comportamental tem sido relacionada ao desenvolvimento da dependência às substâncias psicoativas e a episódios de recaída do consumo dessas substâncias (ROBINSON; BERRIDGE, 1993; De VRIES et al., 1998; VEZINA, 2004). Considerando o grande risco de início do abuso de substâncias psicoativas durante a adolescência (SPEAR, 2000; GALDURÓZ et al., 2005), os presentes resultados sugerem que a exposição à cocaína nesse período ontogênico pode predispor os indivíduos à dependência e recaída ao consumo de substância psicoativas em idades posteriores, na vida

adulta. Além disso, esses resultados destacam a importância de estudos sobre os efeitos de psicostimulantes ao longo da ontogênese.

No DPN 94 (quando o teste foi realizado 60 dias após as administrações repetidas de cocaína) a sensibilização comportamental não foi mais detectada. Essa ausência da resposta sensibilizada à cocaína pode estar relacionada ao fato de que nesta idade o efeito estimulante agudo da cocaína sobre a locomoção (grupo SAL-COC) foi maior do que em idades anteriores, e podem ter ocorrido comportamentos estereotipados, os quais podem ter prejudicado a observação da sensibilização avaliando-se somente a atividade locomotora dos animais. No entanto, a dose de cocaína utilizada (10mg/kg) é conhecida por não induzir comportamentos estereotipados (USHIJIMA et al., 1995) e foi demonstrada, sensibilização comportamental à cocaína em ratos adultos nas mesmas condições experimentais (ARAUJO et al., 2003). Portanto, podemos sugerir que, no teste comportamental 60 dias após o tratamento com cocaína, as alterações neurais não estão presentes na mesma intensidade do que 3 ou 30 dias após a interrupção do tratamento dos animais. Esse decurso temporal da sensibilização à cocaína é semelhante ao observado por Henry e White (1995) em ratos adultos. Esses autores mostraram que a sensibilização à cocaína, quando não pareada a um ambiente, foi evidente 30 dias após o tratamento repetido com 10mg/kg dessa substância, mas não 60 dias após o mesmo procedimento.

A maioria dos estudos sobre sensibilização comportamental à cocaína é realizada em ratos adultos, sendo o comportamento avaliado entre 1 e 30 dias após o término do tratamento repetido (UJIKE et al., 1995; De VRIES et al., 1998; CADONI et al., 2000; SCHEGGI et al., 2002; HOPE et al., 2005).

Porém, há evidências de que a sensibilização comportamental à cocaína pode durar por mais de 6 meses quando o procedimento de administrações repetidas da substância é pareado com o ambiente de teste (HOPE et al., 2006). O procedimento de administrações repetidas de cocaína no presente estudo foi realizado nas gaiolas moradia dos animais, ambiente esse diferente, não pareado, ao ambiente de teste, que foi a caixa de atividade. Assim, poderíamos supor que se a sensibilização fosse realizada de modo pareado com o ambiente ela poderia ser ainda mais duradoura, mesmo sendo os animais adolescentes.

As neuroadaptações responsáveis pelo desenvolvimento da sensibilização comportamental têm sido o foco de muitas pesquisas sobre dependência (VANDERSHUREN; KALIVAS, 2000; NESTLER, 2001). Nossos resultados mostraram que a quantidade da enzima TH não foi alterado no NAc de ratos que recebem cocaína na adolescência. Dados semelhantes foram descritos por Hope et al. (2005) em animais adultos. Esses autores não encontraram alterações da TH no NAc 1, 7 ou 21 dias após o tratamento com cocaína, mesmo com a demonstração da sensibilização comportamental nesses animais. Assim, a sensibilização comportamental pode se desenvolver mesmo sem alterações da TH no NAc. Entretanto, resultados díspares foram encontrados por outros autores. Todtenkopf et al. (2000) mostraram, também em ratos adultos, redução da TH no centro do NAc 2 dias após o tratamento repetido com cocaína e aumento da TH na concha do NAc 14 dias após o mesmo tratamento. Por outro lado, Schmidt et al. (2001) demonstraram redução da TH na concha do NAc 7 dias após procedimento de auto-administração de cocaína. Além disso, outros estudos têm indicado que as alterações da TH ocorrem principalmente nos corpos celulares de neurônios dopaminérgicos na ATV

(SORG et al., 1993; MASSERANO et al., 1996). Deste modo, não podemos excluir a possibilidade no presente estudo de alterações da TH em sub-regiões do NAc ou em outras áreas encefálicas, como a ATV.

A respeito das subunidades GluR1 e NR1 dos receptores de glutamato, o presente estudo não encontrou alterações na quantidade dessas proteínas no NAc 3, 30 ou 60 dias após o tratamento com cocaína. Fitzgerald et al. (1996) mostrou, em animais adultos, ausência de alterações dessas proteínas no NAc 16-18h após um regime de tratamento com cocaína por 14 dias. No mesmo sentido, Churchill et al. (1999) mostrou que não há alteração de GluR1 e NR1 no NAc 1 dia após a interrupção do tratamento repetido por 7 dias com cocaína. Por outro lado, os mesmos autores demonstraram maior expressão de GluR1 no NAc de ratos adultos 3 semanas após o tratamento com cocaína. Essa alteração de GluR1 foi evidenciada somente nos animais que desenvolveram sensibilização comportamental. Outro estudo demonstrou que ambas as subunidades, GluR1 e NR1, estão acima dos níveis do grupo controle 17 dias após o tratamento com cocaína por 14 dias (SCHEGGI et al., 2002). Desse modo, parece que o aumento de GluR1 ou NR1 não ocorre após um curto prazo da retirada da administração não contingente de cocaína. Esta observação pode explicar a ausência e alterações dos receptores de glutamato 3 dias após o tratamento com cocaína empregado no nosso estudo. De qualquer modo, a ausência de alterações 30 dias após o tratamento com cocaína pode ser devido às inúmeras neuroadaptações que os animais adolescentes passam até alcançar a idade adulta (SPEAR, 2000; CREWS et al., 2007). Além disso, os estudos que demonstram aumento de GluR1 e NR1 no NAc (CHURCHILL et al.; 1999; SCHEGGI et al., 2002) usaram doses de cocaína entre 30 a 40 mg/kg



diários, as quais são maiores que as usadas nos presentes experimentos (10 mg/kg, duas vezes ao dia).

Boudreau e Wolf (2005) quantificaram separadamente as subunidades dos receptores glutamatérgicos dentro e na superfície de neurônios no NAc. Eles mostraram que a sensibilização comportamental à cocaína está relacionada ao aumento das subunidades de GluR1 e GluR2/3 dos receptores AMPA especificamente na superfície neuronal. Nenhuma alteração na quantidade total dessas proteínas (superfície + citosol) foi encontrada. Desse modo, como a técnica empregada no presente estudo quantifica tanto as proteínas na superfície quanto dentro do neurônio, não podemos descartar a possibilidade de que ocorram alterações especificamente nas proteínas GluR1 na superfície neuronal dos animais sensibilizados à cocaína.

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com cocaína induziu aumento significativo da subunidade GluR1 dos receptores glutamatérgicos AMPA no CPFm de ratos adolescentes. Esse aumento foi evidenciado três dias após o tratamento com a cocaína e não foi mais detectado após 30 ou 60 dias, quando os animais já eram adultos. Assim, a proteína GluR1 no CPFm pode estar relacionada ao desenvolvimento ou a expressão a curto-prazo da sensibilização comportamental à cocaína. No entanto, devido ao fato de que a sensibilização comportamental nesses animais perdurou até o DPN 64, ou seja, 30 dias após o tratamento, os presentes resultados revelam que a expressão duradoura da sensibilização comportamental não está relacionada a alterações prolongadas da quantidade de GluR1 no CPFm.

Estudos da sensibilização comportamental induzida pela cocaína em animais adultos não tem mostrado alterações de GluR1 no CPFm

(FITZGERALD et al., 1996; CHURCHILL et al., 1999; SCHEGGI et al., 2002). Desse modo, o aumento dessa proteína no CPFm pode ser específico da adolescência.

## **7.2. Sensibilização comportamental induzida pela exposição repetida ao estresse na adolescência**

Os resultados do experimento 2 demonstraram que ratos adolescentes expostos ao estresse desenvolvem sensibilização comportamental à cocaína quando testados à essa substância ainda durante a adolescência (3 dias após a última exposição ao estresse). Além disso, a sensibilização induzida pelo estresse não foi relacionada a alterações das proteínas GluR1, NR1 e TH no NAc ou CPFm.

Esses resultados comportamentais corroboram estudo anterior do nosso laboratório que também mostrou sensibilização comportamental à cocaína em animais adolescentes 3 dias após o término da exposição ao mesmo protocolo de estresse variável (LEPSCH et al. 2005).

Os estudos que avaliaram o efeito do estresse nas proteínas GluR1, NR1 e TH quantificaram essas proteínas somente na ATV. Fitzgerald et al. (1996) demonstraram que a exposição repetida ao estresse em ratos adultos aumenta a quantidade de GluR1 e NR1 na ATV 16-18 horas após a última sessão de estresse. Com um procedimento semelhante, Ortiz et al. (1996) mostraram que o estresse variado também causa aumento da quantidade de TH na ATV 24 horas após a última exposição ao estresse em ratos adultos. Assim,

as proteínas avaliadas podem estar alteradas em outras áreas encefálicas, como a ATV, mas não no NAc ou CPFm.

Os resultados comportamentais da exposição ao estresse na adolescência revelaram também que os efeitos do estresse em ratos adolescentes são de curto prazo, pois a sensibilização comportamental não se expressou nos DPN 64 e 94. Isso mostra que a sensibilização comportamental induzida pelo estresse nos animais adolescentes não persiste até a idade adulta.

Em animais adultos, a exposição ao estresse pode causar sensibilização a psicostimulantes quando os animais são testados entre 1 e 15 dias após a última exposição ao estresse (ROUGÉ-PONT et al., 1995; PRASAD et al., 1998; COVINGTON; MICZEK, 2001; ARAÚJO et al., 2003). Além disso, há evidências em ratos adultos de que o efeito do estresse pode ser duradouro. Nesse sentido, Nikulina et al. (2004) mostraram que o estresse de derrota social é capaz de induzir sensibilização comportamental à anfetamina quando administrada 2 meses após a última exposição ao estresse.

Poucos estudos têm se focado no período da adolescência para investigar as conseqüências do estresse sobre o efeito de psicostimulantes. Nesse sentido, Kabbaj et al. (2002) investigaram a influência do estresse durante a adolescência sobre o efeito da anfetamina na idade adulta e não observaram alterações na locomoção após administração aguda da droga. No entanto, o procedimento de estresse executado por Kabbaj e colaboradores não se restringe à adolescência e também não avaliou o efeito duradouro do estresse, pois os autores expuseram os animais ao estresse por 28 dias seguidos (DPN 28-56) e administraram anfetamina somente 24 horas após a última exposição ao estresse.

Foi demonstrado anteriormente, utilizando um modelo de estresse neonatal (separação materna), realizado entre o DPN 2 e 6, que o estresse nessa idade pode causar efeitos que perduram até a adolescência. Nesse estudo observamos que o estresse neonatal induz sensibilização comportamental à cocaína quando o animal foi testado durante a adolescência (31 dias após o estresse). Entretanto, nos animais adultos previamente expostos ao mesmo estresse neonatal, a sensibilização não estava mais presente (MARIN; PLANETA, 2004). Desse modo, sugerimos que as alterações do efeito de psicostimulantes decorrentes da exposição ao estresse podem ser de longo prazo. Contudo, no final período da adolescência parece ocorrer reversão das alterações induzidas pela exposição repetida ao estresse, restaurando a resposta normal aos psicostimulantes quando na idade adulta.

O experimento 2 demonstrou a ausência de sensibilização duradoura à cocaína em animais adolescentes. No entanto, ele não evidenciou se o período da adolescência é a causa dessa ausência de efeito duradouro do estresse. Assim, com objetivo de investigar essa questão realizamos a comparação entre adolescentes e adultos que foram expostos ao estresse variável e receberam cocaína 36 dias após a última exposição (Experimento 3). Os resultados desse experimento mostram que ratos expostos ao estresse durante a adolescência não estavam sensibilizados à cocaína quando testados na idade adulta (DPN 70). Isso confirma a ausência de sensibilização comportamental duradoura à cocaína induzida pela exposição ao estresse na adolescência. Entretanto, o mesmo procedimento de estresse, quando realizado em animais adultos (DPN 65-74), induziu sensibilização duradoura à cocaína. Desse modo, foi constatado que o período da adolescência é o responsável pela

não retenção em longo prazo da sensibilização comportamental à cocaína induzida pelo estresse.

A adolescência é marcada por inúmeras alterações hormonais e mudanças neuroquímicas no sistema nervoso central (SPEAR, 2000; CREWS, 2007). Assim, essas modificações características da idade podem se sobrepor àquelas alterações induzidas pelo estresse, fazendo com que os animais não mais apresentem sensibilização comportamental no início da idade adulta.

## **8. CONCLUSÃO**

Ratos adolescentes são sensíveis ao desenvolvimento de sensibilização comportamental à cocaína induzida pela administração repetida dessa substância ou exposição ao estresse. A administração repetida de cocaína durante a adolescência causa aumento transitório da proteína GluR1 no CPFm e sensibilização comportamental que perdura até a idade adulta. No entanto, a sensibilização induzida pelo estresse na adolescência não permanece até a idade adulta.

Estudos sobre as consequências da exposição às substâncias psicoativas de abuso ou estresse durante a adolescência ainda são escassos. No entanto, esse período ontogênico é caracterizado pela intensa busca por novidades e comportamentos de risco que levam frequentemente ao consumo de substâncias que causam dependência. Desse modo, este estudo contribui para o entendimento dos efeitos da exposição à cocaína ou ao estresse durante

a adolescência e suas conseqüências nessa alteração relacionada à dependência, que é a sensibilização comportamental.

**CAPÍTULO 3**

**Influência do ambiente na sensibilização comportamental à  
cocaína e neuroadaptações relacionadas à CREB**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Influência do ambiente na sensibilização comportamental

O ambiente onde a substância psicoativa é administrada é muito importante no desenvolvimento da sensibilização comportamental. A administração repetida de cocaína ou anfetamina pode ser realizada na gaiola moradia do animal, sendo este devolvido à sua gaiola imediatamente após a injeção, ou a administração pode ocorrer em um ambiente novo (diferente da sua gaiola-moradia) no qual o animal permanece por um período após a injeção. Quando as administrações da substância psicoativa ocorrem no ambiente novo, a sensibilização comportamental é maior se comparada ao mesmo tratamento na gaiola moradia (BADIANI et al., 1995, BROWMAN et al., 1998). Administrações de doses baixas de anfetamina podem ainda não induzirem nenhuma sensibilização na gaiola moradia, mas provocarem sensibilização significativa no ambiente novo (FRAIOLI et al., 1999).

O intervalo de tempo no qual o animal permanece no ambiente novo após a administração da substância psicoativa também é importante no processo de sensibilização comportamental. A sensibilização comportamental é maior quando o animal permanece no ambiente novo durante todo o período da estimulação motora da substância, mas esse período não pode exceder o término do efeito (TODTENKOPF; CARLEZON, 2006).

Além do efeito do ambiente novo, há evidências de que a sensibilização possa ser específica do ambiente pareado com os efeitos da substância psicoativa. Anagnostaras e Robinson (1996) mostraram que a



administração de anfetamina em um ambiente novo causa sensibilização do comportamento rotacional quando a substância é posteriormente administrada nesse mesmo ambiente. No entanto, essa sensibilização não ocorre quando o animal é testado em outro ambiente novo, não pareado. Assim, um conjunto específico de características ambientais associadas com o efeito da substância parece modular a expressão da sensibilização comportamental.

## **1.2. Sensibilização comportamental e neuroadaptações relacionadas à CREB (sigla em inglês para proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico)**

O desenvolvimento de dependência requer a administração repetida da substância psicoativa e causa alterações comportamentais que podem perdurar por toda a vida do indivíduo (ROBINSON; BERRIDGE, 2003). Isso sugere que mudanças extremamente estáveis no SNC são responsáveis pelo desenvolvimento da dependência.

A administração repetida de substâncias psicoativas de abuso, como por exemplo, a cocaína, causa adaptações desde a quantidade de neurotransmissor na fenda sináptica até alterações nas vias de transdução de sinal intracelular e na expressão gênica. Essa alteração gênica pode então modular a atividade e morfologia do neurônio e em última análise alterar de maneira muito duradoura circuitos neuronais (NESTLER, 2001).

Uma das proteínas moduladoras da expressão gênica mais estudada é o CREB. Essa proteína é um fator de transcrição muito importante na

mediação de respostas nucleares a estímulos relacionados ao desenvolvimento, função e plasticidade do SNC (LONZE; GINTY, 2002).

O fator de transcrição CREB é ativado pela fosforilação do aminoácido serina 133. Essa forma ativa de CREB (p-CREB) liga-se a sítios CRE (elementos de resposta ao AMP cíclico) presentes em centenas de genes no SNC, ativando assim a transcrição gênica (MAYR; MONTMINY, 2001). O nível de fosforilação de CREB na sua serina 133 está diretamente relacionado à indução de genes responsivos à CREB (HAGIWARA et al., 1993). Desse modo, um método eficiente de quantificar quanto dessas proteínas está ativa é a determinação da forma fosforilada, além da sua quantidade total.

A fosforilação de CREB é mediada por diferentes vias de proteínas cinases, dentre elas, a proteína cinase A (PKA), proteínas cinases dependentes de cálcio/calmodulina (CaMK) II e IV e a via da cinase regulada por sinal extracelular (ERK) (MATTHEWS et al., 1994; SUN et al., 1996; MAYR; MONTMINY, 2001; LU et al., 2006).

Várias evidências apontam para a relação da ativação de CREB com processos de neuroadaptação induzido por substâncias de abuso. A fosforilação de CREB em áreas da via mesocorticolímbica é ativada pela administração aguda de substâncias psicoativas, tais como cocaína, anfetamina e morfina (WALTERS et al., 2003; SIMPSON et al., 1995). Além disso, a administração repetida dessas substâncias pode potencializar a fosforilação de CREB (COLE et al., 1995; HYMAN et al., 2006; BRENHOUSE et al., 2007).

A sensibilização comportamental também parece estar relacionada à ativação de CREB, pois o aumento de p-CREB no NAc é demonstrado na sensibilização comportamental à anfetamina (TURGEON et al., 1997) e à

cocaína (MATTSON et al., 2005). No entanto, não há estudos sobre a modulação do ambiente de administração das substâncias psicoativas na ativação de CREB, ou das cinases que fosforilam CREB.

Somente dados indiretos apontam para a influência do ambiente na ativação de CREB. Assim, a administração de cocaína ou anfetamina em um ambiente novo induz maior transcrição do gene *c-fos* (um gene ativado por CREB) se comparado a administração dessas substâncias na gaiola moradia (USLANER et al., 2001). A sensibilização comportamental à cocaína pareada a um ambiente também está relacionada ao maior aumento da proteína Fos (produto do gene *c-fos*) no NAc de ratos, se comparado à sensibilização não pareada (CROMBAG et al., 2002; BERKOW et al., 2007).

## 2. OBJETIVOS

Os experimentos apresentados a seguir tiveram como objetivo investigar:

- a) a influência do ambiente na expressão da sensibilização comportamental à cocaína
- b) a relação da sensibilização comportamental dependente do ambiente com a atividade de CREB e das enzimas cinases ERK, PKA, CaMKII e IV no NAc.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

O desenvolvimento experimental deste capítulo da tese foi realizado durante o estágio de doutorado no exterior, realizado no *Behavioral Neuroscience Branch, National Institute on Drug Abuse, NIH* – Baltimore-MD, EUA. Esse estágio teve co-orientação de Bruce T. Hope, PhD.

#### **3.1. Parecer ético**

Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios do *National Institutes of Health (NIH)*, sendo o protocolo experimental (04-BNRB-55) aprovado pelo Comitê de cuidado e uso animal do *National Institute on Drug Abuse (NIDA) - Intramural Research Program - NIH*.

#### **3.2. Animais**

Foram utilizados ratos machos Sprague-Dawley (Charles River, Raleigh, NC, EUA) com massa corpórea entre 250 e 320g no início dos experimentos. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de plástico transparente em biotério com temperatura e umidade controlada. Eles foram mantidos sob ciclo claro/escuro invertido (luz acesa às 19:00 h), com livre acesso à comida e água. Os ratos foram aclimatados às condições do biotério por pelo menos 7 dias antes do início dos tratamentos.

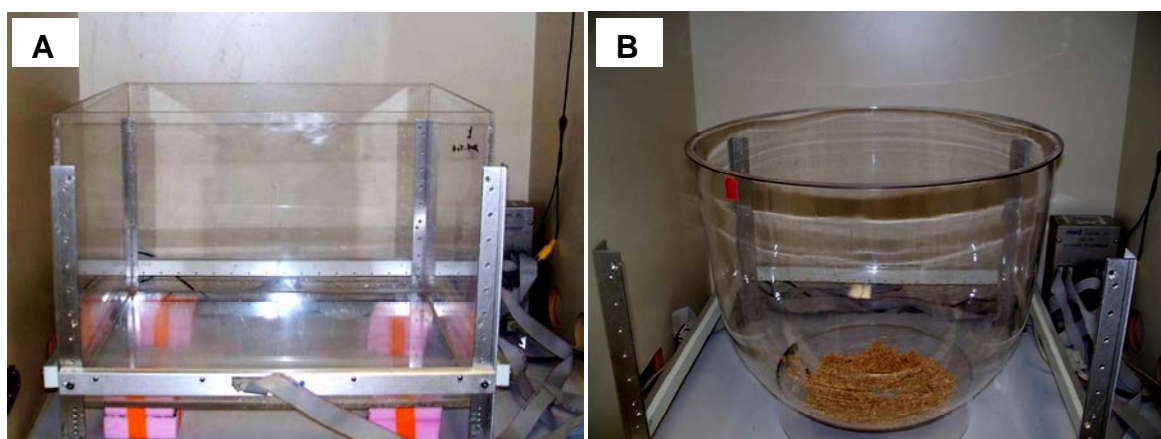
### 3.3. Ambientes do pré-tratamento

O pré-tratamento dos animais foi realizado separadamente em dois ambientes fora das gaiolas-moradias. Esses ambientes possuíam características táteis, visuais e sonoras distintas um do outro, como segue:

- **Ambiente A**: consistiu de uma caixa construída em acrílico transparente com as dimensões de 44 X 44 X 20 cm (comprimento X largura X altura) e assoalho liso (Fig. 11A). Cada caixa ficava dentro de uma câmara de isolamento acústico localizada em uma sala escura e sem ruídos.

- **Ambiente B**: consistiu de um cilindro de assoalho côncavo, medindo 35 X 38 cm (altura X diâmetro) e construído em acrílico transparente (Fig. 11B). O cilindro tinha o assoalho coberto de maravalha e era localizado em uma sala iluminada e com música alta tocando ao fundo.

Cada caixa ou cilindro era cercado por 16 pares de fotocélulas, as quais permitiam a determinação da distância percorrida pelo animal usando programa da empresa Medical Associates (St. Albans - VT, EUA).



**Figura 11:** Ambientes do pré-tratamento. **A)** Ambiente A (designado como ambiente pareado no dia do teste). **B)** Ambiente B (designado como ambiente não pareado no dia do teste).

### 3.4. Pré-tratamento e teste da atividade locomotora

Em ambos ambientes, grupos distintos de animais receberam injeções i.p. de cocaína (15 mg/kg) ou salina (0,9% NaCl) (1mL/kg) diariamente por 7 dias. Imediatamente após as injeções os animais eram colocados nos seus respectivos ambientes (**A** ou **B**), onde a distância percorrida por eles era registrada por 60 minutos. Ao final de cada sessão os animais eram devolvidos às suas gaiolas-moradias.

A distância percorrida pelos animais durante cada sessão de pré-tratamento foi registrada no próprio ambiente da administração para a demonstração do desenvolvimento da sensibilização comportamental.

Depois da última sessão os animais foram mantidos nas suas gaiolas-moradias por um intervalo de 7 dias até as avaliações comportamentais ou neuroquímicas no dia do teste.

No dia do teste (expressão da sensibilização) todos os animais recebiam injeções de cocaína ou salina dentro do ambiente **A**. Desse modo, animais pré-tratados no ambiente **A** foram testados no mesmo ambiente (grupos no ambiente pareado) e os animais pré-tratados no ambiente **B** foram testados em um ambiente com características sensoriais diferentes (grupos no ambiente não pareado). Esse procedimento foi o mesmo para os experimentos 1 a 3, diferindo somente no tipo de análise empregada.

### 3.5. Imunocitoquímica e quantificação de células positivas para p-CREB e p-ERK

Nesse experimento, foram quantificados separadamente o número de neurônios imunorreativos às formas ativas de CREB (p-CREB, CREB fosforilado na serina 133) e de ERK (p-ERK, ERK fosforilada na tirosina 204) (MAYR; MONTMINY, 2001; MATTSON et al., 2005; KATZ et al., 2007).

Os encéfalos foram fatiados em criostato e fatias coronais de 30  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1,8 mm anterior ao Bregma (PAXINOS; WATSON, 2005) foram coletadas em tampão salina (PBS). Elas foram então colocadas em líquido crioprotetor (20% de glicerol e 2 % de dimetilsulfóxido em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4) e armazenadas a -80 °C até utilização.

As fatias foram lavadas por 3 X 10 minutos em PBS com 0,25% de Triton X-100 e então mantidas por 1 hora em solução de bloqueio. A solução de bloqueio consistia de PBS, 0,25% de Triton X-100 e 3% de soro de cabra. Depois disso, elas foram incubadas com anticorpo anti p-CREB (1:500, Cell Signaling) ou anti p-ERK (1:500, Cell Signaling) por 12 a 16 horas a 4°C em solução de bloqueio. Em seguida, as fatias foram lavadas por 3 X 10 minutos em PBS e 0,25% de Triton X-100 e incubadas por 1 hora com anticorpo biotilado anti IgG de coelho (1:100, Vector Laboratories). As fatias foram lavadas em PBS e processadas com o kit ABC Elite (Vector Laboratories) usando diluição 1:80 dos reagentes A e B. As fatias foram lavadas novamente em PBS e reveladas em solução contendo 0,035% de diaminobenzidina e 0,04% de peróxido de hidrogênio em 0,1 M de PBS, pH 7,4.

As imagens do NAc (Fig. 12A) foram capturadas com câmera CCD (Coolsnap Photometrics) e microscópio Zeiss Axioscop-2 (Zeiss). A área quantificada possuía 1,76 X 1,36 mm em cada hemisfério cerebral. O número de neurônios marcados dentro dessa área foi quantificado usando o programa IPLab (Scanalytics, Fairfax-VA).

### **3.6. Dissecção do NAc e quantificação das proteínas por Western Blotting**

Nesse experimento foi avaliada a quantidade total das proteínas CREB, ERK, CaMK II, CaMK IV e suas formas ativas fosforiladas: p-CREB, p-ERK, p-CaMK II (proteína CaMK II fosforilada na treonina 286, a qual é auto-fosforilada quando a enzima está ativa) e p-CaMK IV (proteína CaMK IV ativada por fosforilação na treonina 196 pela CaMK cinase) (MATTSON et al., 2005; WAYMAN et al., 2008). A atividade endógena da PKA foi avaliada quantificando-se a fosforilação de um substrato específico da PKA, a serina 845 da proteína GluR1 (ROCHE et al., 1996; CHAO et al., 2002).

Primeiramente, o NAc foi dissecado a partir do encéfalo congelado mantido em criostato a -20°C. Uma fatia coronal de 1 mm de espessura e face rostral a aproximadamente 2,1 mm anterior ao Bregma (PAXINOS & WATSON, 2005) foi retirada do encéfalo. Desta fatia, o NAc (Fig. 12B) foi dissecado com agulha de 14 Gauge sem bixel e mantido em gelo seco. A amostra foi então homogeneizada em 150 µL de solução de 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) para utilização na técnica de Western Blotting.

As concentrações totais de proteínas das amostras foram quantificadas utilizando kit BCA (Pierce Chemical Company, Rockford - IL, EUA)

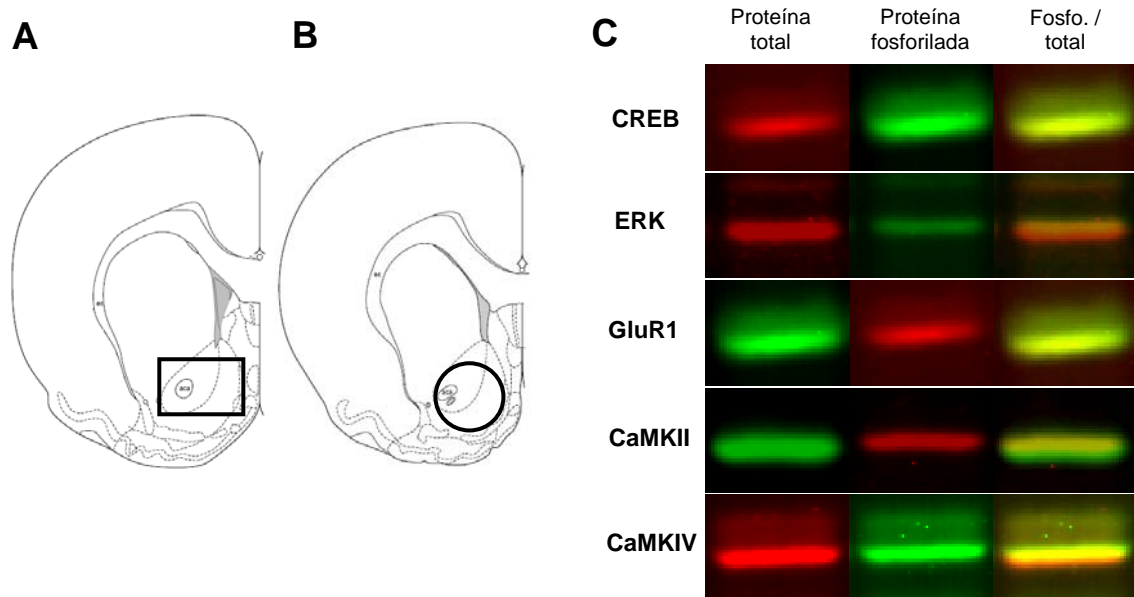


e ajustadas para 30 µg/25 µL diluindo-as com SDS 1% e tampão de amostra. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de SDS poliacrilamida por 3 horas a 200 V. Após isso, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para membrana de PVDF para fluorescência (Immobilon-FL, Millipore) a corrente constante de 0,3 A por 3,5 horas.

As membranas foram bloqueadas por 1 hora sob agitação em solução de bloqueio (Li-Cor Biosciences) e incubadas por 12 a 16 horas a 4°C com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio. Essas incubações foram realizadas com dois anticorpos na mesma solução, um que reconhece a forma natural da proteína (chamado aqui de Total, independente do seu estado de fosforilação) e outro anticorpo específico para a proteína na sua forma fosforilada.

Os anticorpos primários utilizados foram anti t-CREB (1:500, Cell Signaling), anti p-CREB (1:1000, Upstate Biotechnology), anti t-ERK (1:2000, Cell Signaling), anti p-ERK (1:1 000, Santa Cruz), anti t-CaMKII (1:2000, Upstate Biotechnology), anti p-CaMKII (1:500, Upstate Biotechnology), anti t-CaMKIV (1:300, Cell Signaling), anti p-CaMKIV (1:10, Tokumitsu et al., 2004), anti t-GluR1 (1:200, Santa Cruz), anti p-GluR1 (Serina 845 fosforilada; 1:500, Chemicon).

Depois da incubação com os anticorpos primários as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários marcados com fluoróforo (IRDye™ 700 anti-IgG de coelho e IRDye™ 800 anti-IgG de camundongo, Li-Cor Biosciences) por 1 hora. A fluorescência das membranas foi detectada com o escâner Odyssey® e a intensidade das bandas (Fig. 12C) de cada proteína foi quantificada pelo programa Odyssey® 2.0 (Li-Cor Biosciences).



**Figura 12:** Representação esquemática das regiões encefálicas quantificadas e das imagens de fluorescência. **A)** Fatia coronal (aproximadamente 1,8 mm anterior ao Bregma) empregada no experimento de imunocitoquímica. O retângulo representa a área de quantificação de p-CREB e p-ERK. **B)** Face rostral (aproximadamente 2,1 mm anterior ao Bregma) da fatia coronal de 1 mm utilizada para retirada do núcleo acumbens. O círculo representa a área retirada para quantificação. **C)** Exemplo das bandas fluorescentes das proteínas analisadas pela técnica de Western Blotting. Desenho das fatias de encéfalo e coordenadas obtidas do atlas de Paxinos e Watson (2005).

#### 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os experimentos seguintes foram realizados após a fase de pré-tratamento descrita no item 3.4.

##### 4.1. Experimento 1- Avaliação comportamental da sensibilização à cocaína

Neste primeiro experimento os ratos foram retirados das suas gaiolas moradia, receberam injeção i.p. de salina e foram colocados no ambiente **A**. A distância percorrida pelos animais foi mensurada em intervalos de 10 minutos durante uma sessão de 60 minutos. Imediatamente após essa primeira sessão os ratos receberam cada uma das seguintes doses de cocaína: 5, 10 e 20 mg/kg i.p. (uma injeção por hora nesta mesma seqüência para todos os animais). Após cada injeção os animais eram devolvidos para o ambiente **A** e a distância percorrida por eles avaliada por 60 minutos (N = 8 por grupo).

#### **4.2. Experimento 2- Análise de p-CREB e p-ERK por imunocitoquímica**

Baseado nos resultados do experimento anterior, a dose de 20 mg/kg foi escolhida para o teste nesse experimento.

Os ratos foram retirados de suas gaiolas moradia e mantidos no ambiente **A** para habituação por 30 minutos. Após esse período os animais receberam injeção de cocaína (20 mg/kg) ou salina i.p. e retornaram para o ambiente **A**. Após 20 minutos das injeções, cada rato foi anestesiado com isoflurano e perfundido com tampão PBS (pH 7,4) seguido de paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram então extraídos e mantidos em paraformaldeído por 2 horas antes de serem transferidos para solução de sacarose 30% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 a 4 °C. Após 48 horas na solução de sacarose os encéfalos foram congelados sobre gelo seco em pó e armazenados a -80 °C até a análise do número de neurônios imunorreativos a p-CREB e p-ERK por imunocitoquímica (item 3.5) (N = 6-8 por grupo).

### **4.3. Experimento 3- Análise da fosforilação de CREB e marcadores da atividade de ERK, PKA, CaMK II e CaMK IV**

Os ratos foram retirados de suas gaiolas moradia e mantidos no ambiente **A** para habituação por 30 minutos. Após esse período os animais receberam injeção de cocaína (20 mg/kg) ou salina i.p. e retornaram para o ambiente **A**. Após 20 minutos das injeções, os ratos foram sacrificados por decapitação, seus encéfalos foram extraídos (em 30 a 45 segundos) e congelados em isopentano (-50 °C) sobre gelo seco. Esses encéfalos foram então armazenados a -80 °C até a análise das proteínas por Western Blotting (item 3.6) (N = 8 por grupo).

## **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os dados foram analisados utilizando-se ANOVA bifatorial para os grupos de animais testados no ambiente pareado ou no não pareado (separadamente).

Os resultados da distância percorrida pelos animais durante o pré-tratamento (desenvolvimento da sensibilização) foram analisados considerando-se os fatores: pré-tratamento (cocaína vs salina) e dias das sessões (dia 1 a 7).

Os dados do teste comportamental da expressão da sensibilização comportamental (Experimento 1) foram analisados pela ANOVA bifatorial considerando-se os fatores pré-tratamento (cocaína vs salina) e tempo (cada intervalo de 10 minutos desde a injeção de salina).

Para os dados dos experimentos 2 e 3 os fatores comparados foram pré-tratamento (cocaína vs salina injetadas durante 7 dias) e dose desafio (cocaína vs salina injetadas no dia do teste).

Após ANOVA, foram executadas comparações específicas entre pares de grupos utilizando-se a análise de contrastes ou o teste post hoc Newman-Keuls, quando apropriado. Os efeitos foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Avaliação do desenvolvimento da sensibilização comportamental à cocaína**

A distância percorrida durante os 7 dias de pré-tratamento dos animais de todos os experimentos (N = 48 por grupo) foi analisada para verificar se os ambientes de pré-tratamento afetaram a fase de desenvolvimento da sensibilização comportamental.

No ambiente **A**, ANOVA mostrou diferenças significativas para o fator pré-tratamento ( $F_{1,89}=190,49$ ;  $p<0,001$ ) e dia das sessões ( $F_{6,534}=5,22$ ;  $p<0,001$ ). A interação entre esses fatores também foi observada ( $F_{6,534}=10,57$ ;  $p<0,001$ ). Análise de contraste revelou que a distância percorrida pelos animais tratados com cocaína no dia 7 foi maior que no dia 1 ( $p<0,001$ ). Nenhuma alteração foi encontrada nos animais tratados com salina ( $p>0,05$ ). Assim, o desenvolvimento da sensibilização comportamental foi observado no ambiente

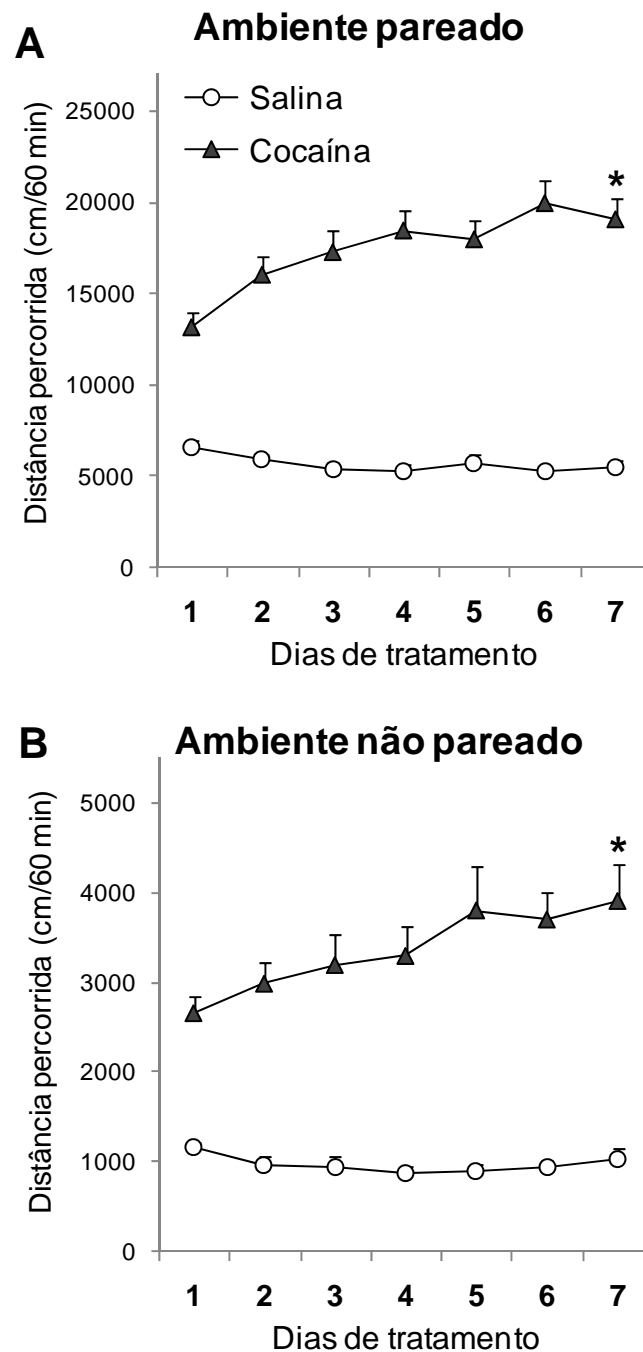
**A**, com o aumento do efeito da cocaína com o decorrer dos dias de tratamento (Fig. 13A).

No ambiente **B** a ANOVA mostrou diferenças significativas para o fator pré-tratamento ( $F_{1,79}=59,25$ ;  $p < 0,001$ ) mas não para os dias das sessões ( $F_{6,474}=1,75$ ;  $p = 0,109$ ). A interação entre esses fatores foi observada ( $F_{6,474}=2,89$ ;  $p < 0,001$ ). Análise de contrastes revelou que a distância percorrida pelos animais tratados com cocaína no dia 7 foi maior do que no dia 1 ( $p < 0,001$ ). Nenhuma alteração foi encontrada nos animais tratados com salina ( $p > 0,05$ ). Desse modo, o desenvolvimento da sensibilização comportamental foi também observado no ambiente B (Fig. 13B).

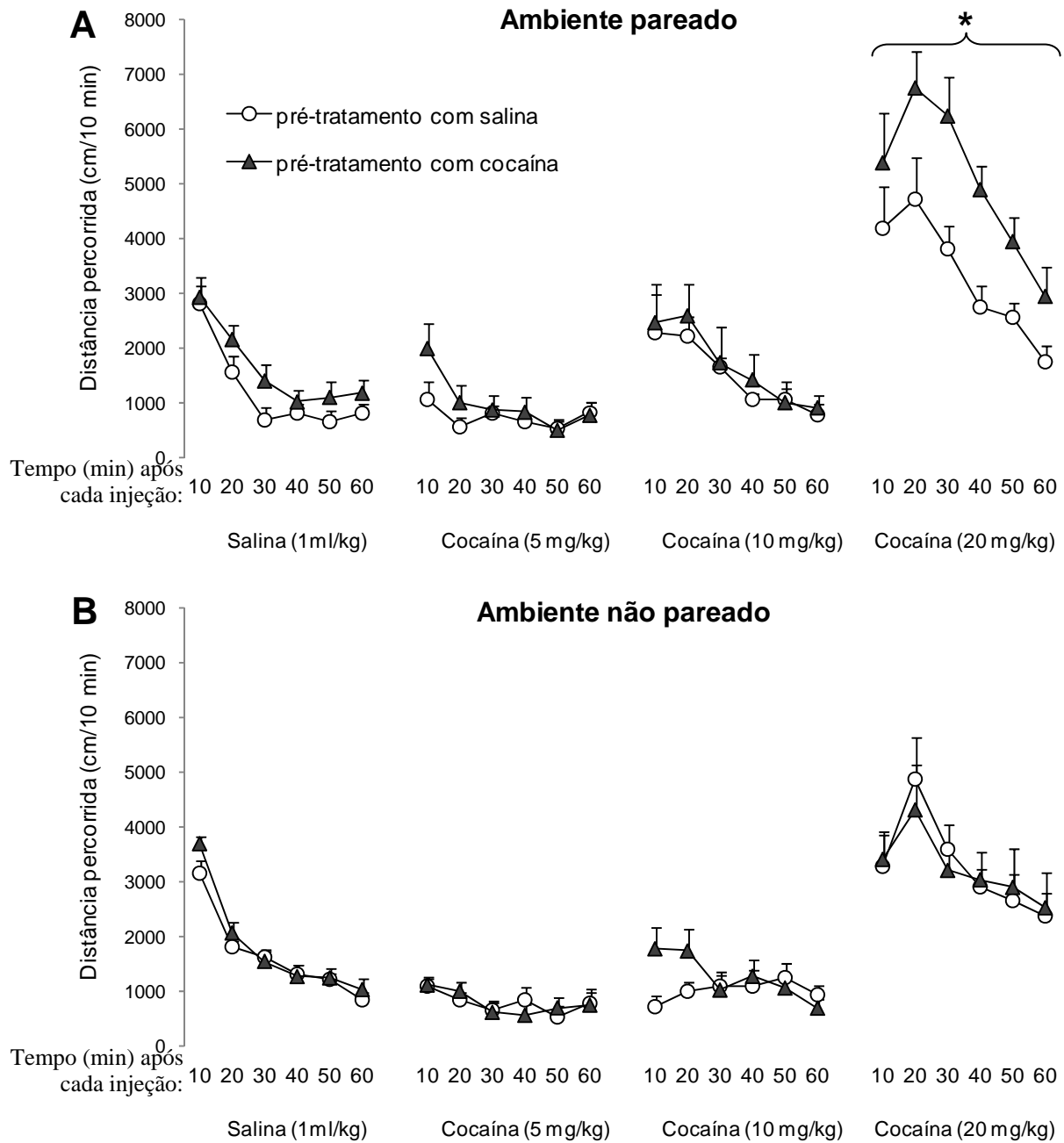
## 6.2. Experimento 1- Avaliação comportamental da sensibilização à cocaína

Para os animais testados no ambiente pareado, ANOVA mostrou efeito significativo do pré-tratamento ( $F_{1,14}=6,83$ ;  $p < 0,05$ ) e tempo ( $F_{23,322}=33,19$ ;  $p < 0,001$ ). Interação significativa também foi observada ( $F_{23,322}=1,91$ ;  $p < 0,01$ ). Análise de contraste revelou diferença significativa entre os animais pré-tratados com salina e cocaína tomando-se o intervalo entre 10 e 60 minutos depois da injeção de cocaína, 20 mg/kg ( $p < 0,01$ ), mas não após outras doses (Fig. 14A). Isso indica a expressão da sensibilização comportamental em resposta à cocaína na dose de 20 mg/kg.

No ambiente não pareado não houve efeito significativo do pré-tratamento ( $F_{1,14}=0,25$ ;  $p=0,62$ ). O fator tempo produziu diferenças significativas ( $F_{23,322}=23,57$ ;  $p < 0,001$ ) mas não houve interação entre esses fatores ( $F_{23,322}=0,56$ ;  $p=0,95$ ). Nenhuma diferença entre os pré-tratamentos foi encontrada comparando-se os intervalos de 60 minutos após cada injeção ( $p > 0,05$ ), evidenciando a ausência de sensibilização comportamental quando os animais foram testados no ambiente não pareado (Fig. 14B).



**Figura 13:** Desenvolvimento da sensibilização comportamental durante os 7 dias de pré-tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (N = 48 animais por grupo) da distância percorrida em resposta à salina ou cocaína (15 mg/kg). O comportamento foi analisado no (A) ambiente A (chamado de posteriormente de ambiente pareado no dia do teste) e (B) no ambiente B (chamado de posteriormente de ambiente não pareado no dia do teste). \*  $p < 0,001$ : dia 7 vs dia 1 (Comparação Planejada).



**Figura 14:** Expressão da sensibilização comportamental à cocaína. Os animais receberam injeções de salina, cocaína 5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg (1 injeção por hora nesta seqüência) e tiveram a distância percorrida por eles avaliada em intervalos de 10 minutos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (N = 8 animais por grupo) da distância percorrida dos animais pré-tratados por 7 dias com salina ou cocaína (15 mg/kg) no mesmo ambiente do teste (ambiente pareado) **(A)** e no ambiente diferente do teste (ambiente não pareado) **(B)**. \*  $p < 0,01$ : distância percorrida durante os 60 minutos no grupo pré-tratado com cocaína vs grupo pré-tratado com salina (Comparação Planejada).



### 6.3. Experimento 2- Análise de p-CREB e p-ERK por imunocitoquímica

#### 6.3.1. p-CREB

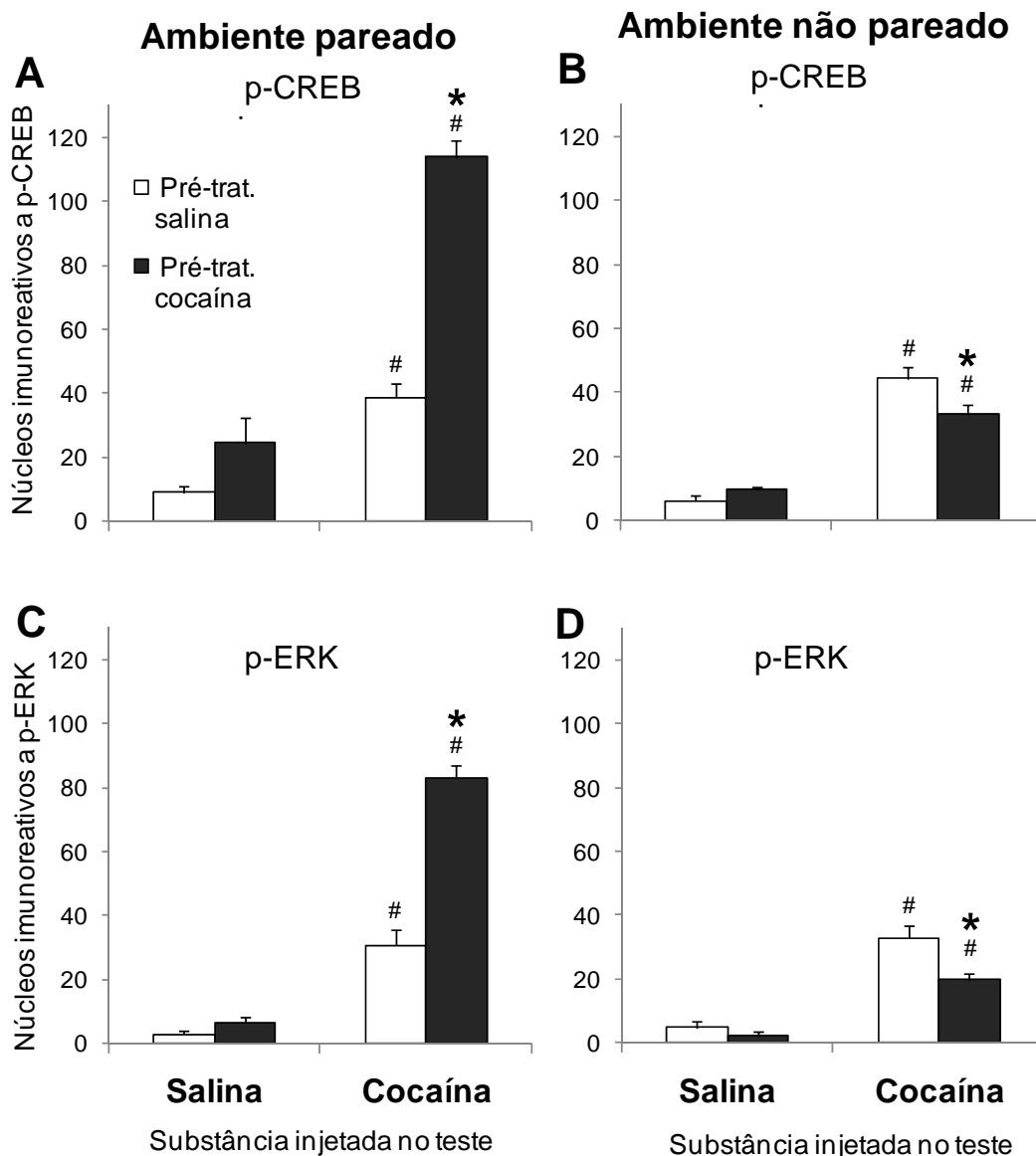
ANOVA do número de neurônios imunorreativos a p-CREB no NAc dos animais testados no ambiente pareado mostrou efeito significativo do pré-tratamento ( $F_{1,27}=65,36$ ;  $p<0,001$ ), dose desafio ( $F_{1,27}=112,92$ ;  $p<0,001$ ) e interação entre esses fatores ( $F_{1,14}=28,26$ ;  $p<0,001$ ). A análise post hoc Newman-Keuls revelou efeito agudo da cocaína, pois a administração dessa substância no dia do teste aumentou a imunoreatividade ao p-CREB em relação à administração de salina, independente do pré-tratamento ( $p<0,001$ ). Observou-se também que o pré-tratamento com cocaína aumentou a imunoreatividade ao p-CREB quando os animais receberam novamente cocaína no dia do teste ( $p<0,001$ ), demonstrando sensibilização da ativação de CREB no ambiente pareado (Fig. 15A).

No ambiente não pareado, a imunoreatividade ao p-CREB não foi alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,23}=1,97$ ;  $p=0,17$ ), enquanto que a dose desafio ( $F_{1,23}=115,60$ ;  $p<0,001$ ) e a interação entre esses fatores ( $F_{1,23}=6,62$ ;  $p<0,05$ ) foi significativa. A análise post hoc Newman-Keuls revelou efeito agudo da cocaína, pois a administração dessa substância no dia do teste aumentou a imunoreatividade ao p-CREB no NAc em relação à administração de salina, independente do pré-tratamento ( $p<0,001$ ). Ao contrário do ambiente pareado, o pré-tratamento com cocaína diminuiu a imunoreatividade ao p-CREB no NAc quando os animais foram testados com cocaína no ambiente não pareado ( $p<0,01$ ) (Fig. 15B).

### 6.3.2. p-ERK

ANOVA do número de neurônios imunorreativos a p-ERK dos animais testados no ambiente pareado mostrou efeito significativo do pré-tratamento ( $F_{1,27}=67,34$ ;  $p<0,001$ ), dose desafio ( $F_{1,27}=231,22$ ;  $p<0,001$ ) e interação entre esses fatores ( $F_{1,27}=50,51$ ;  $p<0,001$ ). De modo semelhante aos resultados de p-CREB, a análise post hoc Newman-Keuls indicou efeito agudo da administração de cocaína, pois essa substância aumentou o número de neurônios imunorreativos a p-ERK nos animais pré-tratados com salina ou cocaína ( $p<0,01$ ). Observou-se também que o pré-tratamento com cocaína aumentou a imunoreatividade a p-ERK em resposta ao teste com cocaína ( $p<0,001$ ), demonstrando sensibilização da ativação de ERK no ambiente pareado (Fig. 15C).

No ambiente não pareado, a imunoreatividade a p-ERK foi alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,23}=8,61$ ;  $p<0,01$ ) e dose desafio ( $F_{1,23}=74,02$ ;  $p<0,001$ ). A interação entre esses fatores foi próxima do valor significativo ( $F_{1,23}=3,92$ ;  $p=0,059$ ). A análise post hoc Newman-Keuls revelou efeito agudo da cocaína, pois a administração dessa substância no dia do teste aumentou a imunoreatividade ao p-ERK no NAc em relação à administração de salina, independente do pré-tratamento ( $p<0,001$ ). Ao contrário do ambiente pareado, o pré-tratamento com cocaína reduziu a imunoreatividade a p-ERK no NAc quando os animais foram testados com cocaína no ambiente não pareado ( $p<0,01$ ) (Fig. 15D).



**Figura 15:** Quantificação por imunocitoquímica de p-CREB (A e B) e p-ERK (C e D) no núcleo acumbens dos animais testados em resposta à salina ou cocaína (20 mg/kg). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (N = 6 - 8 por grupo) do número de neurônios imunorreativos dos animais pré-tratados por 7 dias com salina ou cocaína (15 mg/kg) no mesmo ambiente do teste (ambiente pareado) ou no ambiente diferente do teste (ambiente não pareado). #  $p < 0,01$ : diferente do grupo de mesmo pré-tratamento e testado com salina; \*  $p < 0,01$ : diferente do grupo pré-tratado com salina e testado com cocaína (Newman-Keuls).

#### 6.4. Experimento 3- Análise da fosforilação de CREB e marcadores da atividade de ERK, PKA, CaMK II e CaMK IV

A quantidade total de todas as proteínas investigadas não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento, ambiente ou dose desafio (dados não mostrados). Desse modo, o nível de fosforilação delas foi calculado como sendo a razão: quantidade da proteína na sua forma fosforilada / proteína total. Os valores dessa razão serão comparados nos resultados.

##### 6.4.1. Fosforilação de CREB

A fosforilação de CREB no NAc dos animais testados no ambiente pareado não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,28}=1,48$ ;  $p=0,23$ ). No entanto, foi detectado efeito significativo da dose desafio ( $F_{1,28}=58,09$ ;  $p<0,001$ ) e interação entre esses fatores ( $F_{1,28}=8,28$ ;  $p<0,01$ ). A análise post hoc Newman-Keuls revelou que a administração de cocaína no dia do teste reduziu a fosforilação de CREB tanto nos animais pré-tratados com salina quanto nos pré-tratados com cocaína ( $p<0,01$ ). Além disso, o grupo de animais pré-tratados com cocaína no ambiente pareado mostrou menor redução da fosforilação de CREB induzida pelo desafio com cocaína ( $p<0,01$ ) (Fig. 16A).

No ambiente não pareado, ANOVA mostrou que a fosforilação de CREB não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,28}=1,93$ ;  $p=0,18$ ), enquanto o fator dose desafio ( $F_{1,28}=18,99$ ;  $p<0,001$ ) foi significativo. A interação entre esses fatores não foi detectada ( $F_{1,28}<0,01$ ;  $p=0,99$ ). A análise post hoc Newman-Keuls revelou que a administração de cocaína reduziu a

fosforilação de CREB tanto nos animais pré-tratados com salina quanto pré-tratados com cocaína ( $p < 0,01$ ) (Fig. 16B).

#### **6.4.2. Fosforilação da CaMK IV**

O padrão de alterações da fosforilação da CaMK IV foi muito semelhante ao de CREB.

No ambiente pareado, ANOVA mostrou que a fosforilação da CaMK IV foi significativamente alterada pelos fatores pré-tratamento ( $F_{1,28}=8,72$ ;  $p < 0,01$ ) e dose desafio ( $F_{1,28}=57,33$ ;  $p < 0,001$ ). A interação entre esses fatores também foi significativa ( $F_{1,28}=6,79$ ;  $p < 0,05$ ). A análise post hoc Newman-Keuls revelou que a administração de cocaína no dia do teste reduziu a fosforilação da CaMK IV tanto nos animais pré-tratados com salina quanto naqueles pré-tratados com cocaína ( $p < 0,01$ ). Além disso, o grupo de animais pré-tratados com cocaína no ambiente pareado mostrou menor redução da fosforilação da CaMK IV induzida pela dose desafio de cocaína ( $p < 0,01$ ) (Fig. 16C).

No ambiente não pareado, a fosforilação da CaMK IV não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,28}=2,75$ ;  $p=0,11$ ) enquanto o fator dose desafio ( $F_{1,28}=29,41$ ;  $p < 0,001$ ) foi significativo. A interação ( $F_{1,28}=0,06$ ;  $p=0,81$ ) não foi observada. O teste Newman-Keuls revelou que a administração de cocaína no dia do teste reduziu a fosforilação da CaMK IV tanto nos animais pré-tratados com salina quanto pré-tratados com cocaína ( $p < 0,01$ ) (Fig. 16D).

#### **6.4.3. Fosforilação de ERK**

A fosforilação de ERK no NAc dos animais testados no ambiente pareado não mostrou efeito significativo do pré-tratamento ( $F_{1,27}=0,08$ ;  $p=0,77$ )

enquanto o fator dose desafio provocou alterações significativas ( $F_{1,27}=13,97$ ;  $p<0,001$ ). A interação entre esses fatores não foi significativa ( $F_{1,27}=2,48$ ;  $p=0,13$ ). A análise post hoc Newman-Keuls detectou aumento significativo da fosforilação de ERK induzido pela administração de cocaína no dia do teste nos animais pré-tratados com salina ( $p<0,01$ ). A comparação entre outros grupos não foi significativa (Fig. 16E).

No ambiente não pareado, a fosforilação de ERK não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,28}=0,41$ ;  $p=0,53$ ). O fator dose desafio provocou alterações significativas ( $F_{1,28}=6,06$ ;  $p<0,05$ ), mas não houve interação entre esses fatores ( $F_{1,28}=0,03$ ;  $p=0,86$ ). Nenhuma diferença significativa entre pares de grupos foi detectada pela análise Newman-Keuls (Fig. 16F).

A enzima ERK possui duas isoformas: ERK-1 de 44 kDa e ERK-2 de 42 kDa (LU *et al.*, 2006). Elas foram quantificadas conjuntamente devido à proximidade das bandas de cada uma.

#### **6.4.4. Fosforilação da CaMK II**

A fosforilação da CaMK II no NAc dos animais testados no ambiente pareado não mostrou efeito significativo do pré-tratamento ( $F_{1,28}=0,06$ ;  $p=0,81$ ) ou dose desafio ( $F_{1,28}=1,24$ ;  $p=0,28$ ). No entanto, a interação entre esses fatores foi significativa ( $F_{1,28}=4,44$ ;  $p<0,05$ ). A análise entre os pares de grupos pelo teste Newman-Keuls não detectou qualquer diferença significativa (Fig. 16G).

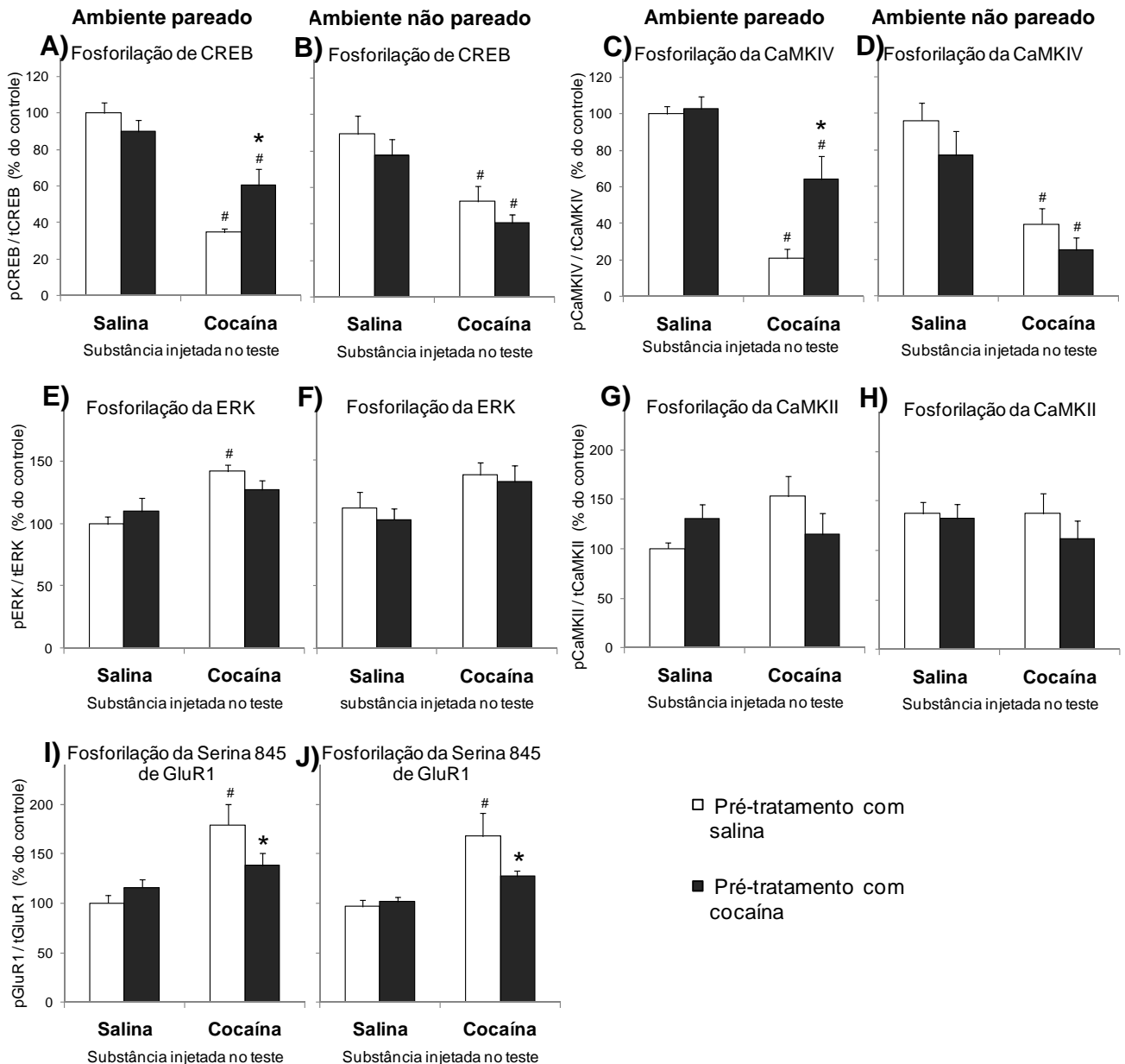
No ambiente não pareado, ANOVA não mostrou alterações significativas da fosforilação da CaMK II considerando-se os fatores pré-

tratamento ( $F_{1,28}=0,90$ ;  $p=0,35$ ) ou dose desafio ( $F_{1,28}=0,39$ ;  $p=0,54$ ). A interação entre esses fatores também não foi significativa ( $F_{1,28}=0,39$ ;  $p=0,54$ ). Nenhuma diferença significativa entre pares de grupos foi detectada (Fig. 16H).

#### **6.4.5. Fosforilação da serina 845 de GluR1**

A fosforilação da serina 845 de GluR1 (substrato específico da PKA) dos animais testados no ambiente pareado não mostrou efeito significativo do pré-tratamento ( $F_{1,28}=0,86$ ;  $p=0,36$ ). No entanto, o fator dose desafio ( $F_{1,28}=14,10$ ;  $p<0,001$ ) e a interação entre esses fatores ( $F_{1,28}=3,38$ ;  $p<0,05$ ) foram significativos. A análise post hoc Newman-Keuls revelou que a administração de cocaína no dia do teste aumentou a fosforilação da serina 845 de GluR1 nos animais pré-tratados com salina ( $p<0,01$ ), mas não nos pré-tratados com cocaína ( $p=0,25$ ). Além disso, a fosforilação da serina 845 de GluR1 em resposta a cocaína nos animais pré-tratados com cocaína foi menor do que os pré-tratados com salina ( $p<0,05$ ) (Fig. 16I).

No ambiente não pareado, ANOVA não mostrou alteração significativa da fosforilação da serina 845 de GluR1 considerando-se o fator pré-tratamento ( $F_{1,27}=1,81$ ;  $p=0,19$ ). O fator dose desafio foi significativo ( $F_{1,27}=13,45$ ;  $p<0,01$ ) e a interação entre esses fatores foi próxima da diferença significativa ( $F_{1,27}=2,93$ ;  $p=0,09$ ). Os resultados da análise post hoc Newman-Keuls foram semelhantes aos do ambiente pareado. O teste com cocaína aumentou a fosforilação da serina 845 de GluR1 nos animais pré-tratados com salina ( $p<0,01$ ), mas não nos pré-tratados com cocaína ( $p=0,18$ ). Além disso, a fosforilação da serina 845 de GluR1 em resposta a cocaína nos animais pré-tratados com cocaína foi menor do que os pré-tratados com salina ( $p<0,05$ ) (Fig. 16J).



**Figura 16:** Quantificação por Western Blotting da fosforilação de CREB e cinases no núcleo acumbens dos animais testados em resposta à salina ou cocaína (20 mg/kg). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (N = 8 por grupo) da fosforilação de CREB (A e B), CaMK IV (C e D), ERK (E e F), CaMK II (G e H) e da serina845 de GluR1 (I e J) dos animais pré-tratados por 7 dias com salina ou cocaína (15 mg/kg) no mesmo ambiente do teste (ambiente pareado) ou no ambiente diferente do teste (ambiente não pareado). #  $p < 0,01$ : diferente do grupo de mesmo pré-tratamento e testado com salina; \*  $p < 0,05$ : diferente do grupo pré-tratado com salina e testado com cocaína (Newman-Keuls).



## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Desenvolvimento e expressão da sensibilização comportamental à cocaína dependente do ambiente

A análise comportamental mostrou que apesar das características sensoriais diferentes entre os ambientes **A** e **B**, os ratos desenvolveram sensibilização comportamental em ambos os ambientes durante os 7 dias de pré-tratamento. Entretanto, após uma semana de intervalo os ratos expressaram o comportamento sensibilizado somente no ambiente pareado com o pré-tratamento de cocaína.

Os resultados comportamentais corroboram o estudo de Anagnostaras e Robinson (1996), que demonstrou que a expressão da sensibilização comportamental à anfetamina é específica ao ambiente pareado com a substância. No entanto, esses pesquisadores não mostraram que a administração de anfetamina no ambiente não pareado permitiu o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Além disso, a avaliação comportamental de Anagnostaras e Robinson (1996) consistiu na medida dos comportamentos rotacionais em ratos previamente lesionados com 6-OHDA no feixe nigroestriatal. Esse método confere vantagens na medida comportamental, como por exemplo, a relação dose-efeito linear entre uma grande extensão de doses, mas levanta dúvidas se o mesmo fenômeno ocorreria em animais intactos.

No presente estudo, foi demonstrado que os animais desenvolveram sensibilização comportamental em ambos os ambientes, mas

após um período de retirada, eles expressaram a sensibilização comportamental somente no ambiente pareado com as administrações de cocaína. Além disso, as demonstrações foram realizadas em animais intactos, evitando que as manipulações prévias das vias dopaminérgicas possam afetar as alterações comportamentais.

Outros estudos mostraram que a administração de cocaína (BADIANI et al., 1995; BROWMAN et al., 1998) ou anfetamina (ROBINSON et al., 1998; FRAIOLI et al., 1999; CROMBAG et al., 2001) em um ambiente novo pode aumentar a sensibilização comportamental se comparada à administração dessas substâncias na gaiola-moradia. Além de afetar o desenvolvimento da sensibilização, a exposição à novidade também pode aumentar o efeito agudo dos psicostimulantes (USLANER et al., 2001).

O presente estudo excluiu o efeito do ambiente novo no desenvolvimento da sensibilização comportamental, pois ambos os ambientes das administrações repetidas de cocaína eram diferentes das gaiolas-moradias. Desse modo, as alterações observadas refletem somente a influência do pareamento ambiental.

Assim sendo, os resultados comportamentais demonstraram que estímulos ambientais associados com as administrações de cocaína afetam a expressão da sensibilização comportamental.

## **7.2. Alteração do número de neurônios imunorreativos a p-CREB e p-ERK por imunohistoquímica**

A análise imunohistoquímica do p-CREB mostrou que a administração de cocaína no dia do teste aumentou o número de neurônios imunorreativos a essa proteína fosforilada no NAc de ratos, independente do pré-tratamento. Outros estudos também observaram que a administração aguda de cocaína aumenta o número de neurônios imunorreativos a p-CREB no NAc de ratos (BRENHOUSE et al., 2007) ou camundongos (WALTERS et al., 2003). Efeito semelhante também ocorre em resposta à administração aguda de anfetamina (SIMPSON et al., 1995). De tal modo, o aumento do número de neurônios com CREB fosforilado no NAc é um efeito conhecido em resposta à administração aguda de psicostimulantes.

O pré-tratamento com cocaína teve seus efeitos dependentes do ambiente. Quando o teste foi realizado no ambiente pareado, o pré-tratamento com cocaína induziu grande aumento do número de neurônios imunorreativos a p-CREB em resposta à administração da mesma substância. Assim, de modo semelhante à sensibilização da atividade locomotora, ocorreu sensibilização do número de neurônios imunorreativos a p-CREB no NAc. Isso sugere que a sensibilização comportamental está relacionada ao aumento do número de neurônios que sofrem ativação de p-CREB. Dados anteriores mostraram que o mesmo pré-tratamento com cocaína aumentou o número de neurônios imunorreativos a p-CREB em resposta ao desafio com cocaína no ambiente pareado (MATTSON et al., 2005). Esse estudo de Mattson e colaboradores reforça o presente resultado, porém eles não haviam investigado a mesma alteração no ambiente não pareado.

Quando o teste foi realizado no ambiente não pareado, o pré-tratamento com cocaína reduziu a imunoreatividade a p-CREB em resposta à

nova administração de cocaína. Assim, de modo semelhante à análise comportamental, na qual não houve sensibilização nesse ambiente, o número de neurônios imunorreativos a p-CREB não é aumentado no ambiente não pareado. Pelo contrário, ocorreu uma redução do número de neurônios com ativação de CREB nesse ambiente.

Comparando-se os resultados de ambos os ambientes, parece que o pré-tratamento com cocaína induz alterações opostas, dependendo se o ambiente da nova administração de cocaína é o mesmo ou não do pré-tratamento. Esse resultado implica que o ambiente é um fator preponderante na ativação de vias neurais responsáveis pelos efeitos das substâncias de abuso.

O padrão de alterações do número de neurônios imunorreativos à p-ERK foi muito semelhante ao de p-CREB. Ocorreu aumento da imunoreatividade a p-ERK em resposta à administração de cocaína no dia do teste e também sensibilização especificamente no ambiente pareado. Isso sugere que a enzima ERK pode ser responsável pelo aumento da imunoreatividade a p-CREB.

A ativação de ERK pela administração de cocaína (VALJENT et al., 2000) e sua modulação sobre o efeito reforçador, sensibilização comportamental e recaída à cocaína já são conhecidas (LU et al., 2006; KOYA et al., 2009). Demonstramos aqui que os efeitos dessa enzima na sensibilização comportamental são dependentes do ambiente e podem estar relacionados à ativação de CREB.

BERKOW et al. (2007) demonstraram, empregando imunocitoquímica para detecção da proteína Fos (marcador da ativação neuronal), que o mesmo procedimento experimental empregado no presente

estudo causou sensibilização da expressão de Fos no NAc de animais testados no ambiente pareado à cocaína. Esse efeito não foi observado no ambiente não pareado. Considerando que o gene da proteína Fos é ativado por p-CREB (McCLUNG; NESTLER, 2003), isso sugere que as alterações de p-ERK e p-CREB detectadas aqui são funcionais e se manifestam alterando a atividade neuronal.

### **7.3. Alteração da fosforilação de CREB e marcadores da atividade de ERK, PKA, CaMK II e CaMK IV**

Para analisar outras proteínas cinases que fosforilam CREB e também a quantidade total de cada proteína foi realizada análise por Western Blotting de amostras do NAc.

A administração de cocaína no dia do teste reduziu a fosforilação de CREB nessa análise, independente do pré-tratamento. Este resultado parece oposto ao observado no experimento de imunohistoquímica. Entretanto, a razão dessa discrepância pode ser devida ao fato de que a imunohistoquímica permite a quantificação do número de células com aumento da proteína detectada. Nesse caso, a contagem é baseada no número de neurônios que apresentam aumento suficiente de p-CREB que permite distingui-los dos demais neurônios ao redor. Por outro lado, a técnica de Western Blotting não permite a distinção entre os neurônios com ativação de CREB daqueles sem ativação. No homogenato do NAc usado no Western Blotting, o aumento da fosforilação de CREB em uma minoria de neurônios pode ser diluída pelos neurônios ao redor, os quais podem não estar alterados, ou mesmo sofrerem redução da fosforilação de CREB. Assim, com base nos resultados da imunohistoquímica, podemos

sugerir que a administração de cocaína no dia do teste aumenta o número de neurônios com CREB fosforilado. No entanto, a maioria dos neurônios ao redor mostra algum nível de redução da fosforilação de CREB. Quando a quantificação se dá no homogenato do NAc, o resultado mostra a somatória das alterações, a qual resulta em diminuição devido à redução da fosforilação de CREB na maioria deles. Pode ser proposto que os neurônios que sofrem ativação pela cocaína são a minoria, baseado em recente trabalho de Mattson et al. (2008), o qual mostrou que o número de neurônios estriatais repetidamente ativados por dose semelhante de cocaína corresponde a somente 1,7 a 2,5%.

Embora a administração de cocaína no dia do teste diminua a fosforilação de CREB no NAc, no ambiente pareado os animais pré-tratados com cocaína 7 dias antes e testados também com cocaína mostraram maior fosforilação de CREB quando comparados aos pré-tratados com salina e testados com cocaína. Desse modo, apesar do efeito do desafio com cocaína ser a redução da fosforilação de CREB, os animais pré-tratados com cocaína continuam mostrando maior fosforilação de CREB quando comparados com os pré-tratados com salina, especificamente no ambiente pareado.

Outros estudos têm mostrado resultados contraditórios quando analisaram a fosforilação de CREB por Western Blotting. A redução da fosforilação de CREB foi evidenciada em culturas de células expostas à cocaína (FENG et al., 2006). Em ratos, a administração de cocaína (15 ou 30 mg/kg) aumentou agudamente a fosforilação de CREB no NAc (NAZARIAN et al., 2009). No entanto, nesse mesmo estudo é mostrado que após tratamento repetido com cocaína, uma nova administração dessa substância não mais aumentou a fosforilação de CREB. Resultados semelhantes foram demonstrados por

Edwards et al. (2007), revelando aumento da fosforilação de CREB induzido pela administração aguda de cocaína, mas ausência desse efeito em animais após auto-administração crônica de cocaína. Além disso, Matthews et al. (2005) demonstraram ausência de efeito agudo da cocaína sobre a fosforilação de CREB no NAc, mas observaram aumento nos animais pré-tratados com cocaína. Tem sido demonstrado também que outro psicostimulante, a anfetamina, provocou uma tendência de redução da fosforilação de CREB no estriado de ratos após sua administração aguda, enquanto sua administração crônica aumentou a fosforilação de CREB (TURGEON et al., 1997). A razão da incoerência entre esses resultados ainda não é conhecida.

A ativação de enzimas fosfatases, como por exemplo, a PP1 e a PP2A (enzimas que retiram o fosfato da serina 133 de p-CREB) podem também ser responsáveis pela redução da fosforilação de CREB. Entretanto, o mecanismo de regulação dessas enzimas ainda é pouco entendido (LONZE; GINTY, 2002).

Com o objetivo de verificar o efeito da dose de cocaína na redução da fosforilação de CREB, o experimento 3 foi replicado com uma dose menor de cocaína no teste (10 mg/kg). Esses dados são mostrados nos anexos desta tese e revelaram novamente redução da fosforilação de CREB induzida pela administração de cocaína no dia do teste. Essa redução ocorreu em menor intensidade, evidenciando que este efeito foi replicável e parece ser proporcional à dose de cocaína.

A administração de cocaína (20 mg/kg) no dia do teste aumentou a fosforilação de ERK no NAc, mas esse aumento não foi relacionado ao pré-tratamento ou ambiente. Assim, a fosforilação de ERK no homogenato do NAc

parece não estar relacionada à fosforilação de CREB. Nesse caso, a enzima cinase que parece regular a fosforilação de CREB é a CaMK IV.

A fosforilação da CaMK IV foi alterada do mesmo modo que o CREB no homogenato do NAc. Ambos efeitos do pré-tratamento, desafio e a alteração específica do ambiente foram os mesmos. Essa semelhança de alterações sugere que CaMK IV pode regular a fosforilação de CREB na maioria dos neurônios do NAc nessas condições experimentais.

A fosforilação da CaMK II parece não estar relacionada aos efeitos da cocaína na fosforilação de CREB ou na sensibilização comportamental.

A atividade da PKA (medida pela fosforilação da serina 845 de GluR1) foi aumentada pela administração aguda de cocaína no dia do teste. No entanto, após o pré-tratamento com cocaína esse aumento não foi mais evidenciado, revelando tolerância da ativação dessa enzima. Resultado semelhante de tolerância da ativação da PKA foi observado logo após a administração de cocaína em animais após longo período de auto-administração da substância (EDWARDS et al., 2007). Outros estudos demonstraram aumento da atividade da PKA após administração crônica de cocaína, sendo ainda esse aumento relacionado à sensibilização comportamental (MISERENDINO; NESTLER, 1995, NESTLER, 2001, LU et al., 2003). Um fator importante que pode explicar essa diferença para os presentes resultados é que nestes estudos o teste da atividade da PKA após a fase de tratamento crônico foi realizado sem a administração de cocaína antes da retirada das amostras. Outro fator importante é o aumento da atividade da PKA que é observado mais facilmente após 1 dia do tratamento crônico com a cocaína, sendo pouco evidente após 7 dias (HOPE et al., 2005). Como o teste com cocaína nos nossos experimentos



ocorreu após 7 dias do término do pré-tratamento, isso pode ter colaborado para a não observação de sensibilização da atividade da PKA.

Amostras do caudado-putamen, parte dorsal e parte ventral do CPFm também foram analisadas por Western Blotting (dados não mostrados) nos mesmos animais das amostras do NAc. Nessas outras áreas encefálicas ocorreu também redução da fosforilação de CREB após administração de cocaína (20 mg/kg) no dia do teste. No entanto, esses dados não foram mostrados, pois eles não foram alterados pelo pré-tratamento ou ambiente de teste.

## **8. CONCLUSÃO**

A sensibilização comportamental à cocaína e mudanças neuronais relacionadas a essa alteração comportamental são moduladas pelo ambiente onde a substância é administrada. Após administração repetida de cocaína, a sensibilização comportamental foi expressa somente quando os animais foram testados no mesmo ambiente do pré-tratamento.

A expressão da sensibilização comportamental foi acompanhada pelo aumento do número de neurônios com ativação de CREB no NAc, sendo esse aumento de CREB relacionado à ativação de ERK. No entanto, a fosforilação de CREB é reduzida quando considerada a somatória de todas as células do NAc. Nesse caso, a fosforilação de CREB está relacionada à atividade da enzima CaMK IV, a qual também é reduzida pelo desafio com cocaína. Desse modo, as alterações neuroquímicas em resposta à cocaína não

acontecem de forma igual em todos os neurônios, sendo o tipo de análise neuroquímica utilizada muito importante na interpretação dos resultados.

Portanto, o ambiente onde ocorre a administração de cocaína é importante na observação das alterações relacionadas ao desenvolvimento da dependência. Essas alterações expressas como sensibilização comportamental ou adaptações neuroquímicas são mais evidentes quando o animal recebe cocaína no ambiente pareado ao pré-tratamento. Assim, este estudo contribui para a elucidação de como o ambiente pode afetar o efeito de substâncias psicoativas e modular alterações relacionadas à dependência de cocaína.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADRIANI, W.; LAVIOLA, G.A Unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 334-46, 2000.
- AHMED, S.H.; KOOB, G.F. Long-lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. **Psychopharmacology**, v. 146, p. 303-312, 1999.
- AGUILAR, M. A.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M.; MIÑARRO, J. Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. **Brain Res. Rev.**, v. 59, p. 253-277, 2009.
- ANAGNOSTARAS, S. G.; ROBINSON, T. E. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. **Behav. Neurosci.**, v. 110, p. 1397-1414, 1996.
- ARAUJO, A.P.N.; DeLUCIA, R.; SCAVONE, C.; PLANETA, C.P. Repeated predictable or unpredictable stress: effects on cocaine-induced locomotion and cyclic AMP-dependent protein kinase activity. **Behav. Brain. Res.**, v. 139, p. 75-81, 2003.
- BADIANI, A.; BROWMAN, K. E.; ROBINSON, T. E. Influence of novel versus home environments on sensitization to the psychomotor stimulant effects of cocaine and amphetamine. **Brain Res.**, v. 674, p. 291-298, 1995.
- BADIANI, A.; CABIB, S.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Chronic stress induces strain-dependent sensitization to the behavioral effects of amphetamine in the mouse. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 43, p. 53-60, 1992.
- BERGER, M. A. et al. Long-term effects of prenatal stress on dopamine and glutamate receptors in adult rat brain. **Neurochem. Res.**, v. 27, p. 1525-1533, 2002.
- BERKOW, A.; HOPE, B. T. Cocaine-induced sensitization of locomotor activity and nucleus accumbens Fos expression in drug-paired versus non-paired (third world) environments. In: NEUROSCIENCE 2007, San Diego. **Abstracts...** San Diego, 2007. 1 CD-ROM.
- BOLANOS, C. A.; GLATT, S. J.; JACKSON, D. Subsensitivity to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. **Develop. Brain. Res.**, v. 111, p. 25-33, 1998.
- BOUDREAU, A. C.; WOLF, M. E. Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 9144-9151, 2005.
- BOZARTH, M. A.; WISE, R. A. Anatomically distinct opiate receptor fields mediate reward and physical dependence. **Science**, v. 224, p. 516-517, 1984.
- BRENHOUSE, H. C.; HOWE, M. L.; STELLAR, J. R. Differential activation of cAMP response element binding protein in discrete nucleus accumbens

subregions during early and late cocaine sensitization. **Behav. Neurosci.**, v. 121, p. 212-217, 2007.

BROWMAN, K. E.; BADIANI, A.; ROBINSON, T. E. The influence of environment on the induction of sensitization to the psychomotor activating effects of intravenous cocaine in rats is dose-dependent. **Psychopharmacology**, v. 137, p. 90-98, 1998.

CADONI, C.; PISANU, A.; SOLINAS, M.; ACQUAS, E.; DI CHIARA, G. Behavioral sensitization after exposure to  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. **Psychopharmacology**, v. 158, p. 259-266, 2001.

CADONI, C.; SOLINAS, M.; DI CHIARA, G. Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 388, p. 69-76, 2000.

CAO, J.; et al. Adolescent maturation of cocaine-sensitive neural mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 2279-2289, 2007.

CARLEZON JR, W. A.; NESTLER, E. J. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? **TRENDS in Neuroscience**, v. 25, p. 610-615, 2002.

CARLINI, E. A. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005.** São Paulo: CEBRID, 2006.

CASEY, B. J.; JONES, R. M.; HARE, T. A. The Adolescent Brain. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1124, p. 111-126, 2008.

CHAO, S. Z. et al. D(1) dopamine receptor stimulation increases GluR1 phosphorylation in postnatal nucleus accumbens cultures. **J. Neurochem.**, v. 81, p. 984-992, 2002.

CHURCHILL, L. et al. Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. **Journal of Neurochemistry**, v. 42, p. 2397-2403, 1999.

CICCOCIOPPO, R.; MARTIN-FARDON, R.; WEISS, F. Effect of selective blockade of  $\mu$ 1 or  $\delta$  opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, p. 391-399, 2002.

COLE, R. L. et al. Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. **Neuron**. v. 14, p. 813-823, 1995.

CORNISH, J. L.; KALIVAS, P. W. Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 1-5, 2000.

COVINGTON, H.E.; MICZEK, K.A. Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine: effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration "binges". **Psychopharmacology**, v. 158, p. 399, 2001.

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

CROMBAG, H. S. et al. The ability of environmental context to facilitate psychomotor sensitization to amphetamine can be dissociated from its effect on acute drug responsiveness and on conditioned responding. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 680-690, 2001.

CROMBAG, H. S. et al. Locomotor sensitization to cocaine is associated with increased Fos expression in the accumbens, but not in the caudate. **Behav. Brain Res.**, v. 136, p. 455-462, 2002.

CRUZ, F. C.; DeLUCIA, R.; PLANETA, C. S. Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 80, p. 411-417, 2005.

DACKIS, C. A.; O'BRIEN, C. P. Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. **J. Subst. Abuse Treat.**, v. 21, p. 111-117, 2001.

DACKIS, C.; O'BRIEN, C. Neurobiology of addiction: treatment and public policy ramifications. **Nat. Neurosci.**, v. 8, p. 1431-1436, 2005.

DE JONG, J. G. et al. A single social defeat induces short-lasting behavioral sensitization to amphetamine. **Physiol. Behav.**, v. 83, p. 805-811, 2005.

DE VRIES, T. J. et al. Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. **Eur. J. Neurosci.**, v. 10, p. 3565-3571, 1998.

DIAZ HEIJTZ, R.; KOLB, B.; FORSSBERG, H. Can a therapeutic dose of amphetamine during pre-adolescence modify the pattern of synaptic organization in the brain? **Eur. J. Neurosci.**, v. 18, p. 3394-3399, 2003.

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

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

DOMINO, E.F. Nicotine-induced behavioral locomotor sensitization. **Prog. Neuro-psych.**, v. 25, p. 59-71, 2001.

EDWARDS, S. et al. Region-specific tolerance to cocaine-regulated cAMP-dependent protein phosphorylation following chronic self-administration. **Eur. J. Neurosci.**, v. 25, p. 2201-2213, 2007.

- FENG, M. J.; YAN, S. E.; YAN, Q. S. Cocaine exposure at a sublethal concentration downregulates CREB functions in cultured neuroblastoma cells. **Brain. Res.**, v. 1077, p. 59-66, 2006.
- FERREIRA, P. E. M.; MARTINI, R. K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 23, p. 96-99, 2001.
- FITZGERALD, L.W. et al. Drugs of abuse and stress increased the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 274-282, 1996.
- FRAIOLI, S. et al. Susceptibility to amphetamine-induced locomotor sensitization is modulated by environmental stimuli. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. 533-541, 1999.
- FRANTZ, K. J.; O'DELL, L. E.; PARSONS, L. H. Behavioral and neurochemical responses to cocaine in periadolescent and adult rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 625-637, 2007.
- GARCIA-MIJARES, M.; SILVA, M. T. A. Dependência de drogas. **Psicologia USP**, v. 17, p. 213-240, 2006.
- GALDURÓZ, J. C. F. et al. **V Levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras.** São Paulo: CEBRID, 2005.
- HAGIWARA, M et al. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, p. 4852-4859, 1993.
- HAILE, C. N.; GRANDPRE, T.; KOSTEN, T. A. Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats. **Psychopharmacology**, v. 154, p. 213-220, 2001.
- HEMBY, S. E.; HORMAN, B.; TANG, W. Differential regulation of ionotropic glutamate receptor subunits following cocaine self-administration. **Brain Res.**, v. 1064, p. 75-82, 2005.
- HEMBY, S. E. et al. Cocaine-induced alterations in nucleus accumbens ionotropic glutamate receptor subunits in human and non-human primates. **J. Neurochem.**, v. 95, p. 1785-1793, 2005.
- HENRY, D. J.; WHITE, F. J. The persistence of behavioral sensitization to cocaine parallels enhanced inhibition of nucleus accumbens neurons. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 6287-6299, 1995.
- HOPE, B. T. et al. Neuroadaptations of total levels of adenylate cyclase, protein kinase A, tyrosine hydroxylase, cdk5 and neurofilaments in the nucleus accumbens and ventral tegmental area do not correlate with expression of sensitized or tolerant locomotor responses to cocaine. **J. Neurochem.**, v. 92, p. 536-545, 2005.

- HOPE, B. T. et al. Cocaine-induced locomotor activity and Fos expression in nucleus accumbens are sensitized for 6 months after repeated cocaine administration outside the home cage. **Eur. J. Neurosci.**, v. 24, p. 867-875, 2006.
- HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 29, p. 565-598, 2006.
- JUSTINOVA, Z. et al. Self-administration of cannabinoids by experimental animals and human marijuana smokers. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 81, p. 285-299, 2005.
- KABBAJ, M. et al. Stress during adolescence alters behavioral sensitization to amphetamine. **Neuroscience**, v. 113, p. 395-400, 2002.
- KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area. **J. Neurochem.**, v. 70, p. 1497-1502, 1998.
- KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. Sensitization to repeated morphine injection in the rat: possible involvement of A10 dopamine neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 241, p. 204-12, 1987.
- KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. **J. Neurosci.**, v. 13, p. 266-275, 1993.
- KALIVAS, P. W.; WEBER, B. Amphetamine injection into the ventral mesencephalon sensitizes rats to peripheral amphetamine and cocaine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 245, p. 1095-1102, 1988.
- KARCH, S. B. Cocaine: history, use, abuse. **J. R. Soc. Med.**, v. 92, p. 393-397, 1999.
- KARILA, L. et al. New treatments for cocaine dependence: a focused review. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 11, p. 425-438, 2008.
- KATZ, M.; AMIT, I.; YARDEN, Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1773, p. 1161-1176, 2007.
- KNACKSTEDT, L. A.; KALIVAS, P. W. Extended access to cocaine self-administration enhances drug-primed reinstatement but not behavioral sensitization. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 322, p. 1103-1109, 2007.
- KOLTA, M. G. et al. Time course of the development of the enhanced behavioral and biochemical responses to amphetamine after pretreatment with amphetamine. **Neuropharmacology**, v. 24, p. 823-829, 1985.
- KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 97-129, 2001.



- KOYA, E. et al. Role of ventral medial prefrontal cortex in incubation of cocaine craving. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 177-185, 2009.
- KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S.; AIZENSTEIN, M. L. Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. **J. Neurosci.**, v. 11, p. 2703-2712, 1991.
- 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.
- LAVIOLA, G. et al. Cocaine Sensitization in Periadolescent and Adult Rats. **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, v. 275, p. 345-357, 1995.
- LEPSCH, L. B. et al. Exposure to chronic stress increases the locomotor response to cocaine and the basal levels of corticosterone in adolescent rats. **Addict. Biol.**, v. 10, p. 251-256, 2005.
- LÖF, E. et al. Ethanol-induced dopamine elevation in the rat-modulatory effects by subchronic treatment with nicotinic drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 555, p. 139-147, 2007.
- LONZE, B. E.; GINTY, D. D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. **Neuron**, v. 35, p. 605-623, 2002.
- LORRAIN, D. S.; ARNOLD, G. M.; VEZINA, P. Previous exposure to amphetamine increases incentive to obtain the drug: long-lasting effects revealed by the progressive ratio schedule. **Behav. Brain Res.**, v. 107, p. 9-19, 2000.
- LU, L. et al. Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration. **J. Neurochem.**, v. 85, p.1604-1613, 2003.
- LU, L. et al. Role of ERK in cocaine addiction. **Trends Neurosci.**, v. 29, p. 695-703, 2006.
- LU, L. et al. Reactivation of morphine conditioned place preference by drug priming: role of environmental cues and sensitization. **Psychopharmacology**, v. 159, p. 125-132, 2002.
- MARIN, M. T.; PLANETA, C. S. Maternal separation affects the cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent but not in adult rats. **Brain Res.**, v. 1013, p. 83-90, 2004.
- MASSERANO, J. M. et al. Chronic cocaine administration increases tyrosine hydroxylase activity in the ventral tegmental area through glutaminergic- and dopaminergic D2-receptor mechanisms. **Neurosci. Lett.**, v. 217, p. 73-76, 1996.
- MATTHEWS, R. P. et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, p. 6107-6116, 1994.

- MATTSON, B. J. et al. Cocaine-induced CREB phosphorylation in nucleus accumbens of cocaine-sensitized rats is enabled by enhanced activation of extracellular signal-related kinase, but not protein kinase A. **J. Neurochem.**, v. 95, p. 1481-1494, 2005.
- MATTSON, B. J. et al. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. **Eur. J. Neurosci.**, v. 27, p. 202-212, 2008.
- MAYR, B.; MONTMINY, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 2, p. 599-609, 2001.
- MCCLUNG, C. A.; NESTLER, E. J. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. **Nat. Neurosci.**, v. 6, p. 1208-1215, 2003.
- MCFARLAND, K.; LAPISH, C. C.; KALIVAS, P. W. Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 3531-3537, 2003.
- MCPHERSON, C. S.; LAWRENCE, A. J. Exposure to amphetamine in rats during periadolescence establishes behavioural and extrastriatal neural sensitization in adulthood. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 9, p. 377-392, 2006.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1007S-1015S, 2000.
- MIERZEJEWSKI, P. et al. Intravenous self-administration of morphine and cocaine: a comparative study. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 55, p. 713-726, 2003.
- MISERENDINO, M. J.; NESTLER, E. J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. **Brain Res.**, v. 674, p. 299-306, 1995.
- MULIA, N.; YE, Y.; ZEMORE, S.E.; GREENFIELD, T.K. Social disadvantage, stress, and alcohol use among black, Hispanic, and white americans: findings from the 2005 U.S. National alcohol survey. **J. Stud. Alcohol Drugs**, v. 69, p. 824-833, 2008.
- NAZARIAN, A. et al. Sex differences in basal and cocaine-induced alterations in PKA and CREB proteins in the nucleus accumbens. **Psychopharmacology**, v. 203, p. 641-650, 2009.
- NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature Rev. Neurosci.**, v. 2, p.119-128, 2001.
- NICOLA, S. M.; SURMEIER, D. J.; MALENKA, R. C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 23, p.185-215, 2000.
- NIKULINA, E. M. et al. Long-term behavioral and neuronal cross-sensitization to amphetamine induced by repeated brief social defeat stress: Fos in the ventral tegmental area and amygdala. **Neuroscience**, v. 123, p. 857-865, 2004.

- NOTO, A. R. et al. **Levantamento nacional sobre o uso de drogas entre crianças e adolescentes em situação de rua nas 27 capitais brasileiras – 2003**. São Paulo: CEBRID, 2003.
- O'BRIEN, C.P. Drug addiction and abuse. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11th ed. New York: Pergamon, 2006. p. 621-642.
- O'DONNELL, P. Dopamine gating of forebrain neural ensembles. **Eur. J. Neurosc.**, v. 17, p. 429-435, 2003.
- ORTIZ, J. et al. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. **Neuropsychopharmacol**, v. 14, p. 443-9, 1996.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, v. 54, p. 581-618, 1998.
- PAULSON, P. E.; CAMP, D. M.; ROBINSON, T. E. Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. **Psychopharmacology**, v. 104, p. 140-141, 1991.
- PAXINOS G, WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5. ed. San Diego: Elsevier, 2005.
- PHILLIPS, T. J.; ROBERBS, A. J.; LESSOV, C. N. Behavioral sensitization to ethanol: genetics and the effects of stress. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 57, p. 487-493, 1997.
- PIAZZA, P. V.; LE MOAL, M. L. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 359-378, 1996.
- PIERCE, R. C. et al. Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 1550-1560, 1996.
- PIERCE, R. C. et al. Ibotenic acid lesions of the dorsal prefrontal cortex disrupt the expression of behavioral sensitization to cocaine. **Neuroscience**, v. 82, p. 1103-1114, 1998.
- PLANETA, C. S.; DeLUCIA, R.; AIZENSTEIN, M. L. Behavioral sensitization effect induced by fencamfamine is not related to plasma drug levels. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 667-670, 1995.
- PLANETA, C. S. et al. Ontogênese, estresse e dependência de substâncias psicoativas. **Braz. J. Phar. Sci.**, v. 43, p. 335-346, 2007.
- PLANETA, C. S.; MARIN, M. T. Effects of cocaine in periadolescent rats with or without early maternal separation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1367-1371, 2002.

POST, R. M.; ROSE, H. Increasing effects of repetitive cocaine administration in the rat. **Nature**, v. 260, p. 731-732, 1976.

PRASAD, B. M.; ULIBARRI, C.; SORG, B. A. Stress-induced cross-sensitization to cocaine: effect of adrenalectomy and corticosterone after short- and long-term withdrawal. **Psychopharmacology**, v. 136, p. 24-33, 1998.

REID, M. S.; HSU, K.; BERGER, S. P. Cocaine and amphetamine preferentially stimulate glutamate release in the limbic system: studies on the involvement of dopamine. **Synapse**, v. 27, p. 95-105, 1997.

ROCHE, K. W. et al. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. **Neuron**, v. 16, p. 1179-1188, 1996.

ROBINSON, T. E. Addicted rats. **Science**, v. 305; p. 951-953, 2004.

ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Res. Rev.**, v. 396, p. 157-198, 1986.

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

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res. Rev.**, v. 18, n. 3, p. 247-291, 1993.

ROBINSON, T. E. et al. Modulation of the induction or expression of psychostimulant sensitization by the circumstances surrounding drug administration. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 22, p. 347-354, 1998.

ROUGÉ-PONT, F. et al. Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 7189-7195, 1995.

SAAL, D. et al. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. **Neuron**, v. 37, p. 577-582, 2003.

SAMAHA, A. N.; LI, Y.; ROBINSON, T. E. The rate of intravenous cocaine administration determines susceptibility to sensitization. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 3244-3350, 2002.

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

SCHEGGI, S. et al. Dizocilpine infusion has a different effect in the development of morphine and cocaine sensitization: behavioral and neurochemical aspects. **Neuroscience**, v. 109, p. 267-274, 2002.

- SCHMIDT, E. F. et al. Extinction training regulates tyrosine hydroxylase during withdraw from cocaine self-administration. **J. Neurosc.** v. 21, p. (RC)1-5, 2001.
- SHAHBAZI M. Age- and sex-dependent amphetamine self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v. 196, p. 71-81, 2008.
- SHIM, I. et al. Nicotine-induced behavioral sensitization is associated with extracellular dopamine release and expression of c-Fos in the striatum and nucleus accumbens of the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 121, p. 137-147, 2001.
- SHAHAM, Y.; ERB, S.; STEWART, J. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. **Brain Res. Rev.**, v. 33, p. 13-33, 2000.
- SHRAM MJ, LI Z, LÊ AD. Age differences in the spontaneous acquisition of nicotine self-administration in male Wistar and Long-Evans rats. **Psychopharmacology**, v. 197, p. 45-58, 2008.
- SIMPSON, J. N.; WANG, J. Q.; MCGINTY, J. F. Repeated amphetamine administration induces a prolonged augmentation of phosphorylated cyclase response element-binding protein and Fos-related antigen immunoreactivity in rat striatum. **Neuroscience**, v. 69, p. 441-457, 1995.
- SINHA, R.; CATAPANO, D.; O'MALLEY, S. Stress-induced craving and stress response in cocaine dependent individuals. **Psychopharmacology**, v. 142, n. 4, p. 343-351, 1999.
- SINHA, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? **Psychopharmacology**, v. 158, p. 343-359, 2001.
- SORG, B. A.; CHEN, S. Y.; KALIVAS, P. W. Time course of tyrosine hydroxylase expression after behavioral sensitization to cocaine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 266, p. 424-430, 1993.
- SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 24, p. 417-463, 2000.
- SPEAR, L. P.; BRAKE, S. C. Periadolescent: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. **Dev. Psychobiol.**, v. 16. p. 83-109, 1983.
- STRAKOWSKI, S. M.; SAX, K. W. Progressive behavioral response to repeated d-amphetamine challenge: further evidence for sensitization in humans. **Biol. Psychiatry**, v. 44, p. 1171-1177, 1998.
- 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. et al. Enhanced response to repeated d-amphetamine challenge: evidence for behavioral sensitization in humans. **Biol. Psychiatry**, v. 40, p. 872-880, 1996.

- SUN, P.; LOU, L.; MAURER, R. A. Regulation of activating transcription factor-1 and the cAMP response element-binding protein by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type I, II, and IV. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 3066-3073, 1996.
- TANDA, G.; MUNZAR, P.; GOLDBERG, S. R. Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. **Nat. Neurosci.**, v. 3, p. 1073-1074, 2000.
- TARAZI, F. I.; TOMASINI, E. C.; BALDESSARINI, R. J. Postnatal development of dopamine and serotonin transporters in rat caudate-putamen and nucleus accumbens septi. **Neurosci. Lett.**, v. 254, p. 21-24, 1998.
- TATE, S. R. et al. Comorbidity of substance dependence and depression: role of life stress and self-efficacy in sustaining abstinence. **Psychol. Addict. Behav.**, v. 22, p. 47-57, 2008.
- TEICHER, M. H.; ANDERSEN, S. L.; HOSTETTER, J. C. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. **Develop. Brain Res.**, v. 89, p. 167-172, 1995.
- THOMAS, M. J. et al. Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. **Nat. Neurosci.**, v. 4, p. 1217-1223, 2001.
- TIRELLI, E.; LAVIOLA, G.; ADRIANI, W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. **Neurosc. Biobehav. Rev.**, v. 27, p. 163-178, 2003.
- TODTENKOPF, M. S.; CARLEZON, W. A. Contribution of drug doses and conditioning periods to psychomotor stimulant sensitization. **Psychopharmacology**, v. 185; p. 451-458, 2006.
- TODTENKOPF, M. S.; De LEON, K. R.; STELLAR, J. R. Repeated cocaine treatment alters tyrosine hydroxylase in the rat nucleus accumbens. **Brain Res. Bull.**, v. 52, p. 407-411, 2000.
- 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 Res.**, v. 749, p. 120-126, 1997.
- TRIFFLEMAN, E. G. et al. Childhood trauma and posttraumatic stress disorder in substance abuse inpatients. **J. Nerv. Ment. Dis.**, v. 183, p. 172-176, 1995.
- UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report**. Viena-Austria, 2008.
- UJIKE, H.; SATO, M. Clinical features of sensitization to methamphetamine observed in patients with methamphetamine dependence and psychosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1025, p. 279-287, 2004.
- UJIKE, H. et al. Ontogeny of behavioral sensitization to cocaine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 50, p. 613-617, 1995.

USHIJIMA, I.; CARINO, M. A.; HORITA, A. Involvement of D1 and D2 dopamine systems in the behavioral effects of cocaine in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 52, p. 737-741, 1995.

USLANER, J. et al. Environmental context modulates the ability of cocaine and amphetamine to induce c-fos mRNA expression in the neocortex, caudate nucleus, and nucleus accumbens. **Brain Res.**, v. 920, p. 106-116, 2001.

VALJENT, E. et al. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 8701-8709, 2000.

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

VEZINA, P. D1 dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 2411-2420, 1996.

VEZINA, P. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 27, p. 827-839, 2004.

VEZINA, P. et al. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity promotes the pursuit of amphetamine. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 4654-4662, 2002.

VEZINA, P.; STEWART, J. The effect of dopamine receptor blockade on the development of sensitization to the locomotor activating effects of amphetamine and morphine. **Brain Res.**, v. 499, p. 108-120, 1989.

VOLKOW, N. D. et al. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. **Nature**, v. 386, p. 827-830, 1997.

WALTERS, C. L.; KUO, Y. C.; BLENDY, J. A. Differential distribution of CREB in the mesolimbic dopamine reward pathway. **J. Neurochem.**, v. 87, p. 1237-1244, 2003.

WAYMAN, G. A. et al. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. **Neuron**, v. 59, p. 914-931, 2008.

WISE, R. A. The role of reward pathways in the development of drug dependence. **Pharmac. Ther.**, v. 35, p. 227-263, 1987.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol. Rev.**, v. 94, p. 469-92, 1987.

WOLF, M. E. et al. Differential development of autoreceptor subsensitivity and enhanced dopamine release during amphetamine sensitization. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 264, p. 249-255, 1993.

ZAPATA, A. et al. Behavioural sensitization and enhanced dopamine response in the nucleus accumbens after intravenous cocaine self-administration in mice. **Eur. J. Neurosci.**, v. 17, p. 590-596, 2003.

ZHANG, Y. et al. Comparison of cocaine- and methamphetamine-evoked dopamine and glutamate overflow in somatodendritic and terminal field regions of the rat brain during acute, chronic, and early withdrawal conditions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 937, p. 93-120, 2001.



## **ANEXOS**

## **1. Análise comportamental da sensibilização dependente do ambiente e da fosforilação de proteínas por Western Blotting após administração de dose menor de cocaína (10 mg/kg)**

### **1.1. Procedimento Experimental**

Esse experimento foi conduzido para replicar os resultados do experimento 3 (parte 2 da tese) com uma dose menor de cocaína e também avaliar tanto as alterações neuroquímicas quanto a sensibilização da locomoção nos mesmos animais.

Os ratos foram habituados no ambiente **A** por 30 minutos e desafiados com cocaína (10 mg/kg) ou salina. A distância percorrida pelos animais foi avaliada por 20 minutos seguida da decapitação e retirada rápida dos encéfalos para análise por Western Blotting idêntica ao experimento 3 (N = 11-12 por grupo).

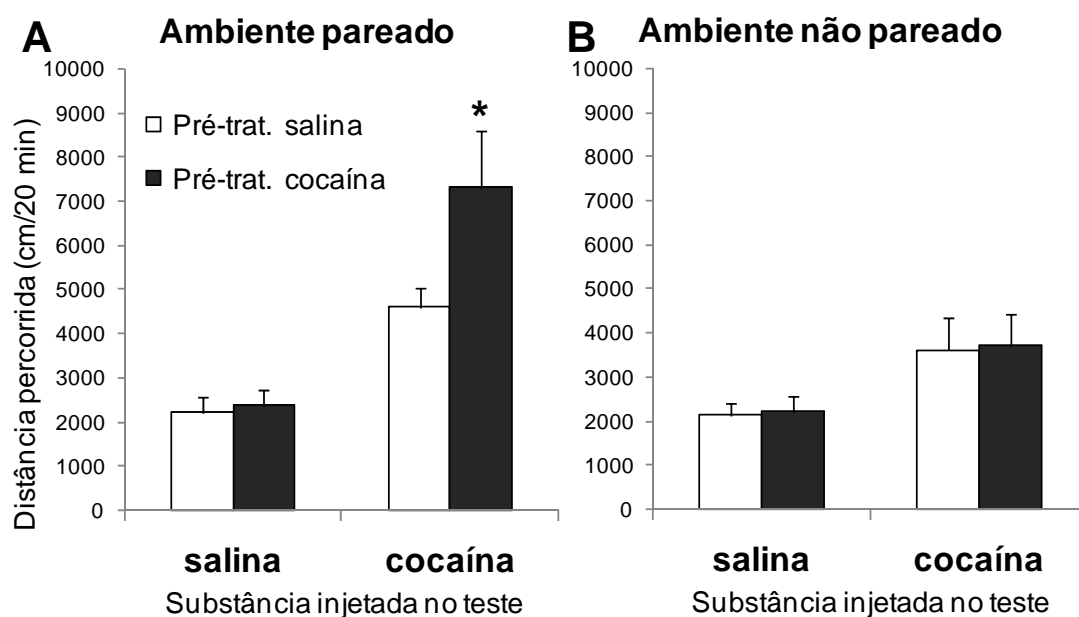
### **1.1. Resultados**

#### **1.1.1. Análise comportamental**

O teste da sensibilização comportamental à cocaína na dose de 10 mg/kg revelou que a distância percorrida pelos animais no ambiente pareado foi significativamente alterado pelos fatores pré-tratamento ( $F_{1,43}=4,92$ ;  $p<0,05$ ) e substância teste ( $F_{1,43}=21,54$ ;  $p<0,001$ ). A interação também foi significativa ( $F_{1,43}=4,00$ ;  $p<0,05$ ). O teste post hoc Newman-Keuls indicou que o pré-tratamento com cocaína aumentou significativamente a distância percorrida pelos animais em resposta à administração de cocaína no dia do teste quando

comparado ao pré-tratamento com salina, ( $p < 0,01$ ) (Fig. 1A). Isso demonstra a sensibilização comportamental à dose de 10 mg/kg de cocaína no ambiente pareado.

A distância percorrida no ambiente não pareado não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,43}=0,03$ ;  $p=0,85$ ). O fator substância teste produziu alterações significativas ( $F_{1,43}=7,51$ ;  $p < 0,01$ ), mas não foi encontrada interação entre os fatores ( $F_{1,43} < 0,01$ ;  $p=0,99$ ). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi detectada pelo teste Newman-Keuls (Fig. 1B).



**Figura 1:** Expressão da sensibilização comportamental à cocaína em resposta à salina ou cocaína 10mg/kg. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (N = 11 - 12 por grupo) da distância percorrida pelos animais pré-tratados por 7 dias com salina ou cocaína (15mg/kg) no (A) mesmo ambiente do teste (ambiente pareado) ou (B) no ambiente diferente do teste (ambiente não pareado). \*  $p < 0,01$ : diferente do grupo pré-tratado com salina e testado com cocaína (Newman-Keuls).

### **1.1.2. Fosforilação das proteínas**

A quantidade total das proteínas investigadas não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento, ambiente ou desafio (dados não mostrados). O nível de fosforilação (expresso como a razão das proteínas na forma fosforilada pela forma total) mostrou alterações menores em resposta à cocaína (10 mg/kg) se comparado ao experimento 3 com a dose de 20 mg/kg.

#### **6.5.2.1. Fosforilação de CREB**

No ambiente pareado, a fosforilação de CREB não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,44}=0,55$ ;  $p=0,46$ ). O fator substância teste foi significativo ( $F_{1,44}=13,69$ ;  $p<0,05$ ) revelando novamente diminuição da fosforilação de CREB no NAc em resposta à cocaína. No entanto, interação entre os fatores não foi detectada ( $F_{1,44}=0,33$ ;  $p=0,57$ ). A análise post hoc Newman-Keuls revelou que a administração de cocaína 10 mg/kg significativamente reduziu a fosforilação de CREB nos animais pré-tratados com cocaína ( $p<0,05$ ). Nos animais pré-tratados com salina essa redução foi próxima ao nível de significância ( $p=0,08$ ) (Fig. 2A).

No ambiente não pareado, a fosforilação de CREB não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,44}=0,65$ ;  $p=0,42$ ). O fator substância teste foi significativo ( $F_{1,44}=5,73$ ;  $p<0,05$ ). No entanto, interação entre os fatores não foi detectada ( $F_{1,44}=0,24$ ;  $p=0,63$ ). O teste Newman-Keuls não revelou diferenças significativas entre grupos específicos (Fig. 2B).

#### **6.5.2.2. Fosforilação da CaMK IV**

O padrão de alterações na fosforilação da CaMK IV foi bastante semelhante ao do CREB no NAc.

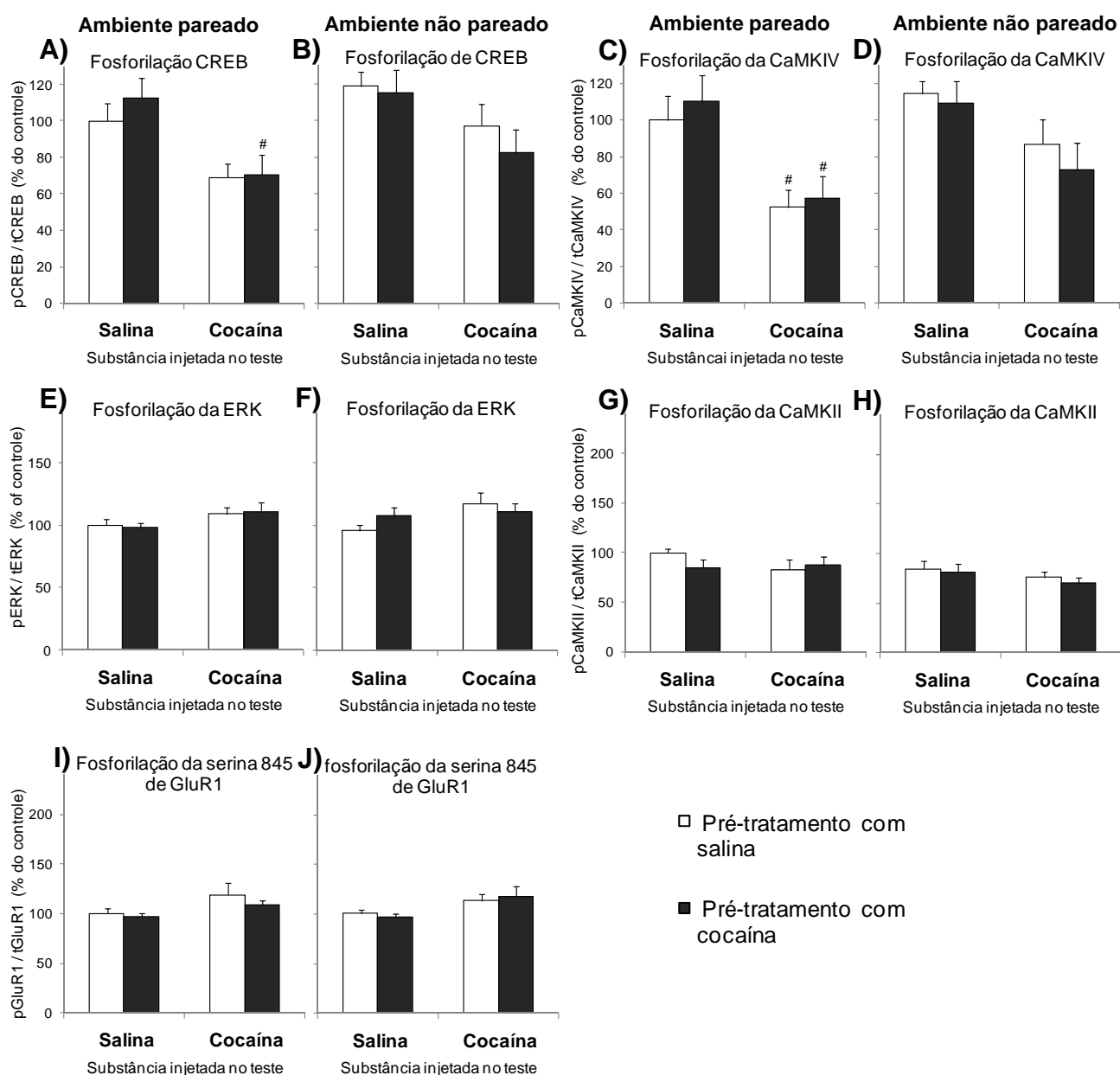
No ambiente pareado, a fosforilação da CaMK IV não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,44}=0,36$ ;  $p=0,55$ ). O fator substância teste foi significativo ( $F_{1,44}=16,21$ ;  $p<0,001$ ) revelando diminuição na fosforilação da CaMK IV no NAc em resposta à cocaína. No entanto, interação entre os fatores não foi detectada ( $F_{1,44}=0,05$ ;  $p=0,83$ ). O teste Newman-Keuls revelou que a administração de cocaína 10 mg/kg significativamente reduziu a fosforilação da CaMK IV nos animais pré-tratados com salina ou cocaína ( $p<0,05$ ) (Fig. 2C).

No ambiente não pareado, a fosforilação da CaMK IV não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento ( $F_{1,44}=0,62$ ;  $p=0,44$ ). O fator substância teste foi significativo ( $F_{1,44}=6,83$ ;  $p<0,05$ ). No entanto, interação entre os fatores não foi detectada ( $F_{1,44}=0,13$ ;  $p=0,72$ ). O teste Newman-Keuls não revelou diferenças significativas entre grupos específicos (Fig. 2D).

### **6.5.2.3. Fosforilação de ERK, CaMK II e da serina 845 de GluR1**

A fosforilação de ERK e da CaMK II não foi significativamente alterada pelos fatores pré-tratamento ou administração de cocaína no dia do teste. Também não foram encontradas interações significativas entre os fatores ou diferenças entre grupos específicos pelo teste Newman-Keuls (Fig. 2 E - H).

A fosforilação do substrato da PKA (serina 845 de GluR1) foi aumentada pelo desafio com cocaína, mas não houve efeito significativo do pré-tratamento ou interação entre os fatores. O teste Newman-Keuls também não revelou diferenças específicas entre os grupos (Fig. 2 I - J).



**Figura 2:** Quantificação por Western Blotting da fosforilação de CREB e cinases no núcleo acumbens dos animais testados em resposta à salina ou cocaína (10mg/kg). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (N = 11 - 12 por grupo) da fosforilação de CREB (A e B), CaMKIV (C e D), ERK (E e F), CaMKII (G e H) e da serina845 de GluR1 (I e J) dos animais pré-tratados por 7 dias com salina ou cocaína (15mg/kg) no mesmo ambiente do teste (ambiente pareado) ou no ambiente diferente do teste (ambiente não pareado). #  $p < 0,01$ : diferente do grupo de mesmo pré-tratamento e testado com salina (Newman-Keuls).



## Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: Lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase

Marcelo T. Marin, Fábio C. Cruz, Cleopatra S. Planeta \*

Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Rod. Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara-SP, Brazil  
Post-Graduation Program in Physiological Sciences, UFSCar/UNESP-Araraquara, Rod. Washington Luís km 235, 13565-905, São Carlos-SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 March 2008

Received in revised form 2 June 2008

Accepted 24 June 2008

Available online 29 June 2008

#### Keywords:

Behavioral sensitization

Cocaine

Adolescence

Glutamate receptors

Tyrosine hydroxylase

### ABSTRACT

Exposure to repeated cocaine induces enduring behavioral sensitization, which has been implicated in the psychostimulant-induced craving and psychosis. Adaptations in dopamine and glutamate neurotransmission in the nucleus accumbens (NAc) and medial prefrontal cortex (mPFC) seem to mediate psychostimulant-induced behavioral sensitization. The abuse of drugs often begins during adolescence; however few studies have been devoted to study the effects of drugs of abuse at this age. The aim of our study was to examine whether repeated cocaine during adolescence could induce behavioral sensitization that endures into adulthood. Moreover, the protein levels of Tyrosine Hydroxylase (TH) and the glutamate receptor subunits GluR1 and NR1 in the NAc and mPFC were measured following the behavioral tests. Adolescent rats were treated with cocaine from postnatal day (PND) 30 to PND34 and behavioral sensitization was verified recording locomotor activity after cocaine challenge injection to adolescent (PND37) or adult (PND64 or 94) rats in separate groups at each time point. TH, GluR1, and NR1 protein levels were measured by Western blotting. Rats exposed to cocaine during adolescence expressed behavioral sensitization when tested on PND37 and PND64. In cocaine sensitized rats GluR1 protein was increased in the mPFC on PND37 but not in other ages. Thus, cocaine-induced behavioral sensitization during adolescence endures into early adulthood. However, cocaine pretreatment during adolescence induced a transient increase of GluR1 in the mPFC only when animals were challenged in the same age.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Drug addiction can be defined as a loss of control over drug use, or the compulsive seeking and taking of drugs despite adverse consequence. This behavioral alteration requires repeated drug exposure and can be a life long condition in which individuals show intense drug craving and increased risk for relapse even after several years of abstinence (Nestler, 2001; Ujike and Sato, 2004).

Repeated administration of cocaine or other drugs of abuse can induce a progressive and enduring enhancement of the motor stimulant effect of these drugs, termed behavioral sensitization. This phenomenon has been implicated in the development of psychostimulant-induced craving and psychosis (Robinson and Becker, 1986; Robinson and Berridge, 1993; Covington and Miczek, 2001). In adult rats, it is well known that the enhanced motor stimulant effect of cocaine can persist for up to 6 months as a result of neuroadaptations in the mesocorticolimbic dopamine pathway engendered by intermittent drug administration (Henry and White, 1995; Vanderschuren

and Kalivas, 2000; Vezina, 2004; Hope et al., 2006). Acute cocaine administration increases synaptic dopamine (DA) in the nucleus accumbens (NAc) and behavioral sensitization has been related to potentiated DA release in this brain region (Kalivas and Stewart, 1991; Cadoni et al., 2000). Moreover, repeated cocaine administration can alter tyrosine hydroxylase (TH; the rate-limiting enzyme for DA synthesis) level in the NAc of adult rats 1 or 2 weeks after the repeated treatment (Todtenkopf et al., 2000; Schmidt et al., 2001).

Emerging data indicate that changes in glutamate transmission are critical for cocaine-induced behavioral sensitization. For example, Zhang et al. (2001) demonstrated enhanced cocaine-induced glutamate release in the NAc after repeated treatment with this drug. Moreover, the increase in glutamate release seems to occur only in sensitized rats (Pierce et al., 1996). Glutamate projections from medial prefrontal cortex (mPFC) appear to be essential to the expression of behavioral sensitization (Pierce et al., 1998). Besides alterations of glutamate release, long-term adaptations of glutamatergic receptors have been demonstrated following repeated cocaine. For example, repeated cocaine administration increased the expression of GluR1, a subunit of AMPA ionotropic glutamatergic receptor, in the NAc of adult rats. Indeed, this increase was observed only in the animals that

\* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 6981; fax: +55 16 3301 6980.

E-mail address: [cplaneta@fcfar.unesp.br](mailto:cplaneta@fcfar.unesp.br) (C.S. Planeta).

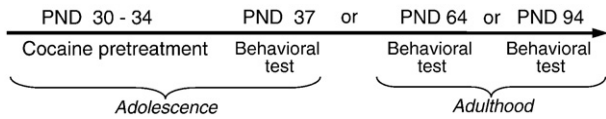


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design.

developed behavioral sensitization (Churchill et al., 1999). In addition, cocaine self-administration not only induces long-term elevation of GluR1 but also increases the protein levels of NR1 (an essential subunit of NMDA ionotropic glutamatergic receptors) in the NAC of adult rats up to 90 days following withdrawal (Ozawa et al., 1998; Lu et al., 2003). In the mPFC, increases of GluR1 and NR1 immunolabeling were also found after psychostimulant administration (Lu and Wolf, 1999; Hemby et al., 2005).

Drug abuse often begins during adolescence, a period of ontogeny that individuals exhibit age specific behavioral characteristics, such as risk taking and novelty seeking, which could predispose them to initiate drug use (Spear, 2000). Brain pathways that play a key role in reward and motor effects of psychostimulant drugs undergo maturational changes during this transitional period and can engender different responsivity to drugs of abuse such as cocaine and amphetamine (Laviola et al., 1995; Bolanos et al., 1998; Kelley et al., 2004; Marin and Planeta, 2004).

Given that long-term behavioral and molecular effects of repeated cocaine exposure during adolescence are poorly investigated, the aim of our study was to examine whether repeated cocaine administration during adolescence could induce behavioral sensitization that endures to adulthood. Moreover, after the behavioral tests, animals were sacrificed to measure the protein levels of TH, GluR1 and NR1 in the NAC and mPFC.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Male Wistar rats were obtained from the animal breeding facility of the São Paulo State University (Botucatu-SP, Brazil) just after weaning, on postnatal day (PND) 21. They were housed in groups of 3–5 animals in a room maintained at  $23 \pm 2$  °C and a 12:12 hour light/dark cycle (lights on at 7:00) with free access to food and water. All experiments were performed during the light phase (between 9:00 and 17:00).

The experimental procedures were approved by the Ethical Committee for Use of Human or Animal Subjects of the School of Pharmaceutical Science-UNESP (CEP-11/2004) and the experiments were conducted according to ethics principles of the Brazilian College of Animals' Experimentation – (COBEA), in compliance with NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

### 2.2. Behavior apparatus

Behavioral testing was conducted in a commercially available (Columbus Instruments, CA) activity monitoring chambers, consisting of Plexiglas cages. The chambers, measuring 44 (width) × 44 (length) × 20 (height) cm, have included 10 pairs of infrared photocells, which were used to measure the horizontal locomotor activity. The consecutive interruption of two beams was recorded as one unit of locomotion count.

### 2.3. Cocaine-induced behavioral sensitization

The cocaine treatment to induce behavioral sensitization was performed as described previously (Planeta and Marin, 2002). Adolescence was defined as the age period between PND 28–42, during which behavior discontinuities from younger to older (PND 60 forward) rats are evident and a time when growth spurt and neuronal changes mainly occur (Spear, 2000).

Rats received intraperitoneal (i.p.) injections of cocaine hydrochloride (10 mg/kg, Sigma®) or saline (1 ml/kg) twice a day (9:00 and 18:00) during 5 consecutive days in their home cages. Animals were treated between PND 30–34. Subsets of animals were tested for behavioral sensitization on PND 37, PND 64 or PND 94, respectively 3, 30 or 60 days after the last injection, as shown in Fig. 1. In the behavioral test the animals from saline pretreated group were given a challenge dose of saline (1 ml/kg, i.p.,  $n=7$  per age, SAL–SAL group) or cocaine (10 mg/kg, i.p.,  $n=7$  per age, SAL–COC group) and the cocaine pretreated group were given a challenge dose of cocaine (10 mg/kg, i.p.,  $n=8$  per age, COC–COC group). Following the challenge injections, locomotion counts accumulated in 5-min intervals were recorded during a 40-min session. The animals were allowed a 20-min adaptation period to the photocell apparatus immediately prior the challenge injections. The dose of cocaine used in these experiments is known to induce locomotor activity in the absence of focused stereotypy (Ushijima et al., 1995; Planeta and Marin, 2002).

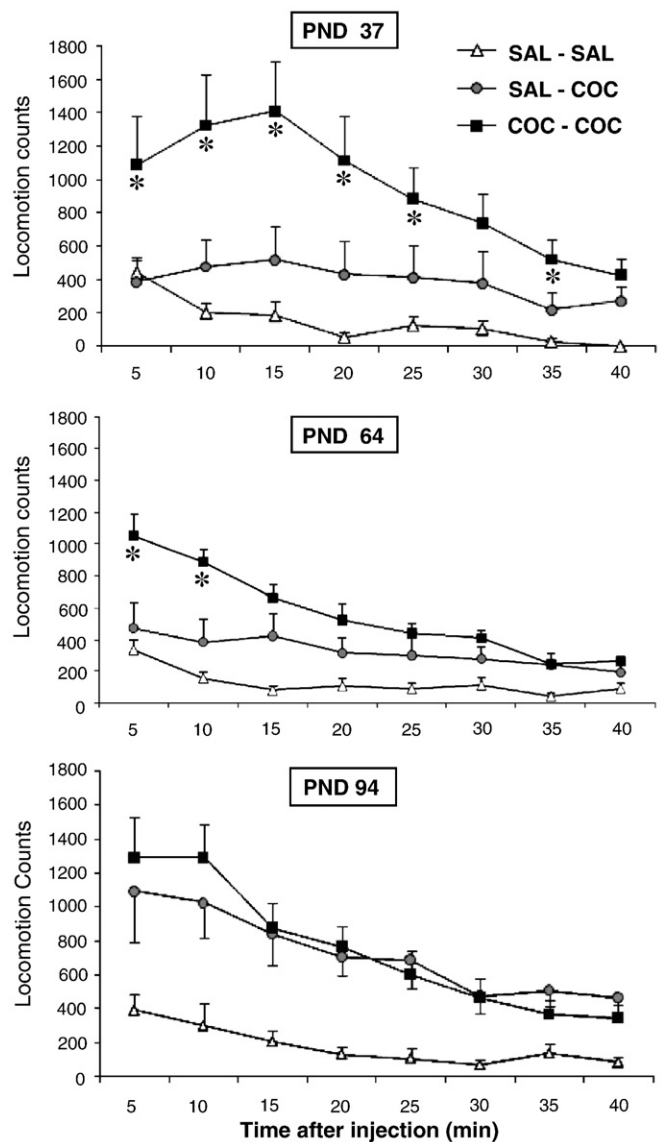
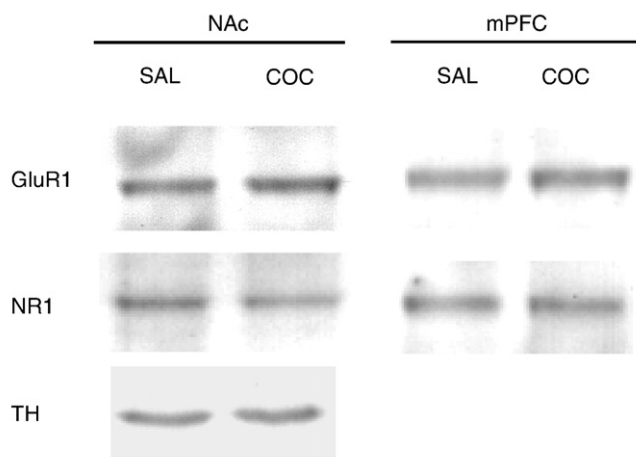


Fig. 2. Locomotor activity following saline or cocaine (10 mg/kg) challenge injection on postnatal day (PND) 37, 64 or 94 of rats pretreated with saline or cocaine during adolescence (PND30–34). Data represent mean  $\pm$  SEM ( $N=7-8$  animals per group) of cumulative locomotion counts in 5-min intervals recorded immediately after the animals received the challenge injection. SAL–SAL, saline pretreatment and saline challenge; SAL–COC, saline pretreatment and cocaine challenge; COC–COC, cocaine pretreatment and cocaine challenge. \* $p < 0.05$ : SAL–COC vs COC–COC (Newman–Keuls post-hoc test).





**Fig. 3.** Representative Immunoblots of GluR1, NR1 and TH in the nucleus accumbens (NAc) and medial prefrontal cortex (mPFC) of adolescent (PND 37) rats. SAL, saline pretreated rats; COC, cocaine pretreated rats.

#### 2.4. Tissue preparation and Western blot analyses

Immediately after the behavioral analysis, the animals were decapitated and their brains were removed and sectioned coronally in slices of 1.5 mm using a brain matrix (Insight®, Ribeirão Preto-SP/Brazil). The appropriate brain slices (approximately +2.5 to +4.0 mm and from +1.0 to +2.5 mm relative to bregma, respectively for mPFC and NAc; Paxinos and Watson, 2005) was ice-cooled in a plate and bilateral brain areas were dissected using a 14-gauge tissue punch and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until Western blot analysis. The punches of mPFC comprised both dorsal and ventral portions of this area. Tissues samples were then sonicated in 250 mM Tris-HCl, 1% SDS, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin-A; 1 mM PMSF and 10 mM EDTA; pH 8. Protein content determination was made using the method of Lowry (Bio-Rad Laboratories). Samples of 30  $\mu\text{g}$  of protein were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane for immunoblotting. PVDF membranes were blocked with 5% nonfat dry milk and 0.1% Tween 20 in Tris buffer (TTBS, pH 7.5) for 1 h at room temperature. The primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology®) were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in TTBS (1:2000, GluR1; 1:3500, NR1; 1:6000, TH). Next, the blots were washed and incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated IgG (1:2000; Amersham Pharmacia Biotech). Protein bands were visualized on a Kodak Biomax Light film with enhanced chemiluminescence (ECL) procedure of Amersham Pharmacia Biotech. Equal protein loading was confirmed by stripping the blots and re-probing them with a monoclonal actin antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology®), followed by incubation with secondary antibody and visualization as described above. The films were scanned in transparenance mode and the volume of the bands was quantified using Image-Master® software (Amersham Pharmacia Biotech) with subtraction of background. Each gel was loaded with at least three samples from each group under analysis (saline and cocaine) and the data were normalized as percentage of the saline values in the same blot. Western blot assays aimed to analyze the effect of cocaine pretreatments on TH, GluR1 and NR1. Thus, samples from rats pretreated with saline and challenged with cocaine (SAL+CO) were compared to samples from animals pretreated with cocaine and challenged with the same drug (CO+CO). The technique and antibodies employed allow measuring the total level of each protein, in spite of intracellular localization, phosphorylation level or activity. Moreover, the time interval between the challenge injections and sacrifice of animals (40 min) is not supposed to be long enough to induce alterations in the total level of such complex proteins.

All assays were conducted under conditions in which densitometric signal intensity was linear with protein concentration, as determined by preliminary experiments.

#### 2.5. Statistical analyses

Behavioral data were analyzed by two-way ANOVA (group and time after injection factors) in each age period. Time was a repeated measure and Newman-Keuls' test was employed for individual post-hoc comparisons. The Western blot data were analyzed using Student's *t* tests between cocaine and saline pretreated groups within the same age. Significant differences are reported for  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Cocaine-induced behavioral sensitization

Fig. 2 depicts the locomotor activity following a cocaine challenge on PND 37, 64 or 94 in rats treated with repeated cocaine during adolescence (PND 30–34).

In adolescent animals (PND 37) two-way ANOVA revealed significant differences in locomotor activity considering both group [ $F_{(2,19)} = 7.16$ ;  $p < 0.005$ ] and time [ $F_{(7,133)} = 13.16$ ;  $p < 0.001$ ] factors. In addition, significant interaction between factors was detected [ $F_{(14,133)} = 4.17$ ;  $p < 0.001$ ]. Pair wise comparisons were then performed by the Newman-Keuls test for each time interval. This comparison detected significant differences between SAL-COC and COC-COC groups on time intervals 5, 10, 15, 20, 25 and 35 ( $p < 0.05$ ), revealing that repeated cocaine treatment induced behavioral sensitization.

In young adult rats (PND 64) there was a main effect of group [ $F_{(2,18)} = 12.47$ ;  $p < 0.001$ ] and time [ $F_{(7,126)} = 21.93$ ;  $p < 0.01$ ] factors. Furthermore, a significant interaction between the factors [ $F_{(14,126)} = 5.36$ ;  $p < 0.001$ ] was detected. Newman-Keuls comparisons for each time interval revealed significant differences between SAL-COC and COC-COC groups at 5 and 10 min after cocaine injections ( $p < 0.05$ ), revealing the expression of behavioral sensitization to cocaine.

At PND 94, ANOVA revealed a main effect of group [ $F_{(2,19)} = 11.66$ ;  $p < 0.001$ ] and time [ $F_{(7,133)} = 14.87$ ;  $p < 0.01$ ], but no interaction between the factors [ $F_{(14,133)} = 1.69$ ;  $p > 0.05$ ]. The significant effect of group was due to differences between SAL-SAL and SAL-COC group ( $p < 0.001$ ; Newman-Keuls) but not between SAL-COC and COC-COC groups ( $p > 0.05$ ). Thus, there was an acute effect of cocaine but at this age animals did not exhibit behavioral sensitization.

#### 3.2. Protein alterations induced by cocaine pretreatment

Representative Western blots of proteins TH, GluR1 and NR1 are shown in the Fig. 3.

**Table 1**  
Results of Western blotting assays of animals from saline or cocaine pretreatment

Age	Protein	NAc		mPFC	
		Saline pretreat.	Cocaine pretreat.	Saline pretreat.	Cocaine pretreat.
PND 37	GluR1	100.0 $\pm$ 5.6	110.9 $\pm$ 7.5	100.0 $\pm$ 3.7	124.5 $\pm$ 8.0 *
	NR1	100.0 $\pm$ 21.5	91.9 $\pm$ 12.6	100.0 $\pm$ 6.0	101.4 $\pm$ 4.6
	TH	100.0 $\pm$ 12.2	112.5 $\pm$ 9.3	ND	ND
PND 64	GluR1	100.0 $\pm$ 4.9	110.9 $\pm$ 14.6	100.0 $\pm$ 8.3	100.9 $\pm$ 6.2
	NR1	100.0 $\pm$ 11.9	127.5 $\pm$ 17.1	100.0 $\pm$ 9.2	100.6 $\pm$ 10.8
	TH	100.0 $\pm$ 16.0	108.6 $\pm$ 12.1	ND	ND
PND 94	GluR1	100.0 $\pm$ 2.6	118.1 $\pm$ 8.6	100.0 $\pm$ 15.2	92.6 $\pm$ 12.2
	NR1	100.0 $\pm$ 8.9	88.9 $\pm$ 4.6	100.0 $\pm$ 18.4	98.5 $\pm$ 16.9
	TH	100.0 $\pm$ 7.3	95.9 $\pm$ 11.8	ND	ND

Values are expressed as percentage of the mean values from the animal group pretreated with saline and challenged with cocaine (mean $\pm$ SEM;  $n = 7-8$  per group). ND=Non-detectable; \* $p < 0.05$  compared to Saline pretreated group (Student's *t* test).

Three days after cocaine treatment during adolescence (PND 37) a significant increase of GluR1 protein was detected in the mPFC ( $p < 0.05$ , Student's *t* test). This increase was not enduring and vanished in adulthood (PND 64 and 94). No significant change of GluR1 receptor subunit was detected in the NAc ( $p > 0.05$ ). NR1 or TH proteins in the NAc and mPFC were not altered in response to cocaine pretreatment in any age, as shown in Table 1. The bands of TH protein in the mPFC were not detectable in our assay and probably reveal small amount of this protein in the mPFC.

#### 4. Discussion

We investigated the long-lasting behavioral and molecular effects of cocaine exposure during adolescence. Our results show that repeated cocaine administration to adolescent rats induces cocaine behavioral sensitization in this age period, which endures until early adulthood, while changes in GluR1, NR1 and TH in the NAc or mPFC were not associated with long-lasting behavioral sensitization.

Repeated cocaine administration during adolescence produced behavioral sensitization when the challenge injection of cocaine was administered during the same age period (PND 37). This result is in line with previous results from our and others' laboratories (Laviola et al., 1995; Planeta and Marin, 2002; Frantz et al., 2007). The major finding of our study is the observation that cocaine-induced sensitization during adolescence endures to early adulthood (PND 64). This is particularly relevant considering the lack of investigations on the long-lasting sensitization to cocaine when animals were exposed to the drug during adolescence. Only one early study (Ujike et al., 1995) showed that cocaine administration from PND 28 to 32 induced behavioral sensitization that lasted until nearly adulthood (PND 53). Our study extended the withdrawal period and showed the sensitized cocaine response beyond the adulthood boundary of PND 60. Recently, McPherson and Lawrence (2006) have shown similar enduring behavioral sensitization after amphetamine administration to adolescent rats.

Behavioral sensitization has been implicated in the development of drug addiction and relapse to drug-seeking behavior (Robinson and Becker, 1986; Robinson and Berridge, 1993; De Vries et al., 1998). The neuroadaptations related to behavioral sensitization are involved in craving and relapse to drug taking (Kalivas et al., 1998; Nestler, 2001). Considering the great risk of initiation of drug abuse and addiction during adolescence (Spear, 2000), our results suggest that exposure to cocaine during adolescence could predispose individuals to cocaine addiction and relapse later in life. Moreover, these results highlight the importance of investigating psychostimulant effects throughout ontogeny.

On PND 94 (i.e. when the test was performed 60 days after the last cocaine injection) behavioral sensitization was not detected following the cocaine challenge. The absence of sensitized behavioral response might be related to the fact that on PND 94 acute cocaine (SAL-COC group) caused more pronounced increase of locomotion as compared to younger rats. It could be pointed out that this enhanced acute locomotion could impair the observation of sensitization measured only by locomotor activity, since on PND 94 the occurrence of stereotyped behavior could emerge in sensitized rats. However, the dose of cocaine used (10 mg/kg) is known to induce locomotor activity in the absence of focused stereotypy (Ushijima et al., 1995) and we have previously demonstrated locomotor sensitization with the same dose of cocaine in adult rats (Araujo et al., 2003). Thus, we can argue that 60 days after withdrawal, neuronal alterations induced by cocaine pretreatment in adolescent rats are no longer present with the same intensity. In adult animals, Henry and White (1995) have reported a similar time course of cocaine-induced behavioral sensitization. They have shown that behavioral sensitization is evident up to 1 month, but it is no longer present following 2 months of withdrawal from repeated (10 mg/kg) cocaine administration. Nevertheless, most studies on cocaine-induced

behavioral sensitization were performed in adult rats with drug challenge after withdrawal periods ranging from 1 to 30 days of repeated drug treatment (Ujike et al., 1995; De Vries et al., 1998; Cadoni et al., 2000; Scheggi et al., 2002; Hope et al., 2005). Differently from our experiments, in studies using the environment-paired sensitization protocol, the sensitized behavior can be seen for up to 6 months following repeated cocaine administration (Hope et al., 2006). Then, procedures of cocaine treatment in the testing apparatus could induce a more enduring sensitized behavior in adolescents and is a good target for future studies.

Administration of cocaine (10 mg/kg) to adolescent rats that have never received cocaine (SAL-COC group at PND 37) did not significantly increase locomotor activity in nearly all time intervals after cocaine injection. On the other hand, the same dose of cocaine yielded a pronounced increase in locomotion of adult rats (PND 94). The finding that adolescent rats are less sensitive to the acute effects of cocaine is consistent with previous reports, which indicated that adolescent rats have a characteristic hyporesponsivity relative to adults to the effects of acute administration of psychostimulants on locomotor activity (Laviola et al., 1995; Bolanos et al., 1998; Adriani and Laviola, 2000). Maturation changes such as pruning of dopamine receptors and increase of monoamine transporters occur in the NAc and caudate putamen during adolescence (Teicher et al., 1995; Tarazi et al., 1998). These changes in brain pathways, which play key role in reward and motor effects of drugs of abuse, can engender different acute responsivity to psychostimulants.

A great deal of interest has been devoted characterizing cellular neuroadaptations associated with behavioral sensitization (Kalivas et al., 1998; Nestler, 2001). Our results showed that TH levels were not altered in the NAc when rats received cocaine during adolescence. Similar results in adult rats were described by Hope et al. (2005). These authors described no alteration on TH levels in the NAc of adult rats 1, 7 or 21 days after cocaine treatment, despite the development of behavioral sensitization to cocaine. Taken together these results indicate that behavioral sensitization to cocaine can develop without changes of TH in the NAc. However, contradictory results are reported in the literature. It has been shown that a cocaine treatment similar to ours in adult rats decreased TH immunoreactivity in the NAc core 2 days after withdrawal, but increased TH immunoreactivity in the NAc shell 14 days following withdrawal (Todtenkopf et al., 2000). On the other hand, Schmidt et al. (2001) have described decreased levels of TH in the NAc shell 7 days after cocaine self-administration. In addition, some studies have pointed out that cocaine-induced alterations on TH occur mainly in the cell bodies of dopaminergic neurons in the Ventral Tegmental Area (VTA), instead of dopaminergic terminal in the NAc (Sorg et al., 1993; Masserano et al., 1996). The absence of TH alteration in our study might be related to the fact that we did not dissect apart NAc core from shell or due to the age period of cocaine exposure.

Concerning GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits in the NAc, our results showed no changes 3, 30 or 60 days following withdrawal from repeated cocaine administrations to adolescent rats. Churchill et al. (1999) showed no changes on GluR1 or NR1 in the NAc 1 day after treatment with cocaine during 7 days. Conversely, the same authors showed increased expression of GluR1 in the NAc of adult rats 3 weeks following cocaine treatment. Their GluR1 alteration was only shown in the animals that developed behavioral sensitization. Other study demonstrated that both GluR1 and NR1 subunits were increased 17 days following the cocaine treatment for 14 days (Scheggi et al., 2002). Thereby, it seems that the increase of GluR1 and NR1 in the NAc does not occur after short-term withdrawal from non-contingent cocaine administration. This observation could explain the absence of glutamate receptor alterations 3 days after cocaine treatment in this study. However, the lack of changes 30 and 60 days after cocaine treatment could be due to the innumerable neuroadaptations in the dopaminergic and glutamatergic systems that adolescent animals undergo until they reach adulthood (Spear, 2000; Crews et al., 2007).

Furthermore, the studies that showed GluR1 or NR1 increase in the NAc used cocaine doses of 30 or 40 mg/kg, which is higher than the one used in our experiments (10 mg/kg, twice a day) (Churchill et al., 1999; Scheggi et al., 2002). Studies of cocaine self-administration have also shown glutamate receptor subunit alterations. Lu et al. (2003) revealed that GluR1 and NR1 protein levels were increased for up to 90 days in the NAc of adult rats after cocaine self-administration. In contrast, no significant alterations were observed on GluR1 or NR1 in the NAc 15–16 h following the end of the cocaine self-administration (Hemby et al., 2005). In other experiments, cocaine self-administration did not alter glutamate receptor subunits *per se*, but one week of extinction training during withdrawal increased GluR1 subunit in the NAc (Sutton et al., 2003).

Our results demonstrated increased GluR1 level in the mPFC 3 days after cocaine repeated injections in the adolescence. However, this alteration was small (only 24.5% increase) and did not remain until early adulthood as observed for sensitized behavior. Thus, we can argue that GluR1 increase in the mPFC can be related to development or short-term expression of cocaine-induced behavioral sensitization. Studies with cocaine sensitization in adult rats have shown no alterations of GluR1 in the mPFC (Fitzgerald et al., 1996; Churchill et al., 1999; Scheggi et al., 2002). Then, this alteration might be specific of adolescent animals. Besides glutamate receptor alterations in the NAc and mPFC, it has been reported that those proteins were altered in other brain regions, such as the VTA (Fitzgerald et al., 1996; Churchill et al., 1999; Lu et al., 2003; Hemby et al., 2005). Thus, alterations in other brain areas related to behavioral sensitization and drug addiction are good targets to further investigations using this animal model of adolescence.

The studies cited above were performed following withdrawal from repeated drug treatment but no drug challenge. In our study receptor subunit levels were measured shortly (40 min) after a cocaine challenge. Thus is also important to consider whether this procedure could affect our results. The literature about cocaine effect on total level of these proteins report alterations only after repeated cocaine administration (Churchill et al., 1999; Scheggi et al., 2002; Lu et al., 2003; Hemby et al., 2005). Moreover, a study of Fitzgerald et al. (1996) showed no alteration 16 to 18 h following acute cocaine (20 mg/kg) injection. Thus, we believe that the cocaine challenge of our experiment (10 mg/kg cocaine injected 40 min before sacrifice of the animals) do not change total levels of those proteins. Short term alterations, such as protein phosphorylation, receptor internalization, mRNA synthesis or enzyme activity could happen in this period of time. However, synthesis of such complex proteins takes a longer time. In spite of this, we performed Western blots of animal groups with same challenge injection and differing from each other only in the pretreatment procedure (SAL–COC group vs COC–COC group).

Boudreau and Wolf (2005) evaluated the contribution of glutamate receptor trafficking associated with behavioral sensitization. They showed that behavioral sensitization to cocaine is associated with increased GluR1 and GluR2/3 AMPA receptor subunits specifically in the cell surface into NAc. This redistribution occurs in the absence of changes in the total levels of these receptor subunits. Then, our results do not exclude the participation of glutamate receptors in the behavioral sensitization, because other alterations besides total protein, such as subunit composition, localization or function; can occur in glutamatergic signaling.

Therefore, our results showed that repeated cocaine administration during adolescence could have long-term consequences, producing enduring behavioral sensitization that lasts into early adulthood. Considering that behavioral sensitization is induced by neuroadaptations, which may render the organism more susceptible to drug craving and relapse, this study highlights the importance of drug exposure during adolescence and its consequence on drug abuse and relapse latter in life. Moreover, investigations into neuroadaptations

underlying long-term behavioral sensitization induced by cocaine in the adolescence need to be extended.

## Acknowledgements

The authors appreciate the excellent technical assistance by Elisabete Z. P. Lepera and Rosana F. P. Silva. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) PhD fellowship 04/01894-6 to MTM and grant 04/01606-0 to CSP. FCC is a CAPES fellowship recipient. CSP is a CNPq Research Fellow.

## References

- Adriani W, Laviola G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology* 2000;39:334–46.
- Araujo APN, DeLucia R, Scavone C, Planeta CP. Repeated predictable or unpredictable stress: effects on cocaine-induced locomotion and cyclic AMP-dependent protein kinase activity. *Behav Brain Res* 2003;139:75–81.
- Bolanos CA, Glatt SJ, Jackson D. Subsensitization to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. *Dev Brain Res* 1998;111:25–33.
- Boudreau AC, Wolf ME. Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 2005;25:9144–51.
- Cadoni C, Solinas M, Di Chiara G. Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. *Eur J Pharmacol* 2000;388:69–76.
- Churchill L, Swanson CJ, Urbina M, Kalivas PW. Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J Neurochem* 1999;42:2397–403.
- Covington HE, Miczek KA. Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine: effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration “binges”. *Psychopharmacology* 2001;158:388–98.
- Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;86:189–99.
- De Vries TJ, Schoffelmeier AN, Binnekade R, Mulder AH, Vanderschuren LJMJ. Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *Eur J Neurosci* 1998;10:3565–71.
- Fitzgerald LW, Ortiz J, Hamedani AG, Nesther EJ. Drugs of abuse and stress increased the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. *J Neurosci* 1996;16:274–82.
- Frantz KJ, O Dell LE, Parsons LH. Behavioral and neurochemical responses to cocaine in periadolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:625–37.
- Hemby SE, Horman B, Tang W. Differential regulation of ionotropic glutamate receptor subunits following cocaine self-administration. *Brain Res* 2005;1064:75–82.
- Henry DJ, White FJ. The persistence of behavioral sensitization to cocaine parallels enhanced inhibition of nucleus accumbens neurons. *J Neurosci* 1995;15:6287–99.
- Hope BT, Crombag HS, Jedynak JP, Wise RA. Neuroadaptations of total levels of adenylyl cyclase, protein kinase A, tyrosine hydroxylase, cdk5 and neurofilaments in the nucleus accumbens and ventral tegmental area do not correlate with expression of sensitized or tolerant locomotor responses to cocaine. *J Neurochem* 2005;92:536–45.
- Hope BT, Simmons DE, Mitchell TB, Kreuter JD, Mattson BJ. Cocaine-induced locomotor activity and Fos expression in nucleus accumbens are sensitized for 6 months after repeated cocaine administration outside the home cage. *Eur J Neurosci* 2006;24:867–75.
- Kalivas PW, Stewart J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Rev* 1991;16:223–44.
- Kalivas PW, Pierce RC, Cornish J, Sorg BA. A role for sensitization in craving and relapse in cocaine addiction. *J Psychopharmacol* 1998;12:49–53.
- Kelley AE, Schochet T, Landry CF. Risk taking and novelty seeking in adolescence: introduction to part I. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1021:27–32.
- Laviola A, Wood RD, Kuhn C, Francis R, Spear LP. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:345–57.
- Lu W, Wolf ME. Repeated amphetamine administration alters AMPA receptor subunit expression in rat nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *Synapse* 1999;32:119–31.
- Lu L, Grimm JW, Shaham Y, Hope B. Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration. *J Neurochem* 2003;85:1604–13.
- Marin MT, Planeta CS. Maternal separation affects the cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent but not in adult rats. *Brain Res* 2004;1013:83–90.
- Masserano JM, Baker I, Natsukari N, Wyatt RJ. Chronic cocaine administration increases tyrosine hydroxylase activity in the ventral tegmental area through glutamatergic and dopaminergic D2-receptor mechanisms. *Neurosci Lett* 1996;217:73–6.
- McPherson CS, Lawrence AJ. Exposure to amphetamine in rats during periadolescence establishes behavioural and extrastriatal neural sensitization in adulthood. *Int J Neuropsychopharmacol* 2006;9:377–92.
- Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:119–28.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;54:581–618.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.

- Pierce RC, Bell K, Duffy P, Kalivas PW. Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci* 1996;16:1550–60.
- Pierce RC, Reeder DC, Hicks J, Morgan ZR, Kalivas PW. Ibotenic acid lesions of the dorsal prefrontal cortex disrupt the expression of behavioral sensitization to cocaine. *Neuroscience* 1998;82:1103–14.
- Planeta CS, Marin MT. Effects of cocaine in periadolescent rats with or without early maternal separation. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1367–71.
- Robinson TE, Becker JB. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res Rev* 1986;396:157–98.
- Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 1993;18:247–91.
- Scheggi S, Mangiavacchi S, Mais F, Gambarana C, Tagliamonte A, De Montis MG. Dizocilpine infusion has a different effect in the development of morphine and cocaine sensitization: behavioral and neurochemical aspects. *Neuroscience* 2002;109:267–74.
- Schmidt EF, Sutton MA, Schad CA, Karanjan DA, Brodtkin ES, Self DW. Extinction training regulates tyrosine hydroxylase during withdraw from cocaine self-administration. *J Neurosci* 2001;21:1–5 RC.
- Sorg BA, Chen SY, Kalivas PW. Time course of tyrosine hydroxylase expression after behavioral sensitization to cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266:424–30.
- Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24:417–63.
- Sutton MA, Schmidt EF, Choi KH, Schad CA, Whisler K, Simmons D, Karanian DA, Monteggia LM, Neve RL, Self DW. Extinction-induced upregulation in AMPA receptors reduces cocaine-seeking behaviour. *Nature* 2003;421:70–5.
- Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ. Postnatal development of dopamine and serotonin transporters in rat caudate-putamen and nucleus accumbens septi. *Neurosci Lett* 1998;254:21–4.
- Teicher MH, Andersen SL, Hostetter Jr JC. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Dev Brain Res* 1995;89:167–72.
- Todtenkopf MS, De Leon KR, Stellar JR. Repeated cocaine treatment alters tyrosine hydroxylase in the rat nucleus accumbens. *Brain Res Bull* 2000;52:407–11.
- Ujike H, Sato M. Clinical features of sensitization to methamphetamine dependence and psychosis. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1025:279–87.
- Ujike H, Tsuchida K, Akiyama K, Fujiwara Y, Kuroda S. Ontogeny of behavioral sensitization to cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;50:613–7.
- Ushijima I, Carino MA, Horita A. Involvement of D1 and D2 dopamine systems in the behavioral effects of cocaine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;52:737–41.
- Vanderschuren LJMJ, Kalivas PW. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 2000;151:99–120.
- Vezina P. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;27:827–39.
- Zhang Y, Loonam TM, Noailles PA, Angulo JA. Comparison of cocaine- and methamphetamine-evoked dopamine and glutamate overflow in somatodendritic and terminal field regions of the rat brain during acute, chronic, and early withdrawal conditions. *Ann N Y Acad Sci* 2001;937:93–120.